

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Selektive Aldosteronsynthaseinhibitoren in der funktionellen
Bildgebung zur Differenzialdiagnose des Primären
Hyperaldosteronismus**

-

**Entwicklung eines Testsystems und Evaluation geeigneter
Substanzen**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Katharina Lang

aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2013



Referentin: Priv.-Doz. Dr. Stefanie Hahner

Korreferent: Prof. Dr. Andreas K. Buck

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2014

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern,
Helmut und Evi mit Jörg

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Entwicklung und Anatomie der Nebenniere	1
1.2 Physiologie der Nebennierenrinde	4
1.2.1 Steroidhormone	4
1.2.1.1 Sexualsteroiden	4
1.2.1.2 Glukokortikoide	4
1.2.1.3 Mineralokortikoide	5
1.2.2 Enzyme der Steroidhormonbiosynthese	7
1.2.2.1 Cytochrom P450	7
1.2.2.1.1 CYP 11A, 17, 19, 21	7
1.2.2.1.2 CYP 11B1 und CYP 11B2	8
1.2.2.2 Hydroxysteroiddehydrogenasen	9
1.2.3 Die Hypophysen- Nebennieren- Achse	10
1.2.4 Das Renin- Angiotensin- Aldosteron- System	11
1.3 Nebenniereninzidentalome	13
1.4 Primärer Hyperaldosteronismus	14
1.4.1 Historisches	14
1.4.2 Subtypen und Ätiologie	15
1.4.3 Prävalenz und Klinik	16
1.4.4 Diagnostik	17
1.4.4.1 Screening	17
1.4.4.2 Bestätigungstests	18
1.4.4.3 Subtyppdifferenzierung	18
1.4.5 Therapie	20
1.5 Inhibitoren von CYP11B1 und CYP11B2	21
1.5.1 Etomidat und Derivate	21

1.5.2	Entwicklung selektiver Aldosteronsynthaseinhibitoren	23
1.6	Nebennierenbildung.....	23
2.	Fragestellung dieser Arbeit	26
3.	Material	27
4.	Methoden.....	31
4.1	Auswertung der Patientendaten.....	31
4.2	RNA- Extraktion	31
4.2.1	RNA- Extraktion aus Zellen	31
4.2.2	RNA- Extraktion aus Gewebe.....	32
4.3	Die Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR).....	32
4.3.1	Reverse- Transkriptase (RT) PCR zur Herstellung von cDNA.....	34
4.3.2	Real- time quantitative PCR (quantitative Polymerase- Ketten- Reaktion, RTq PCR).....	35
4.4	Klonierung eines Vektors.....	38
4.4.1	Elektrotransformation von Plasmiden zur Konservierung und Weiterverarbeitung	38
4.4.1.1	Elektrotransformation von Bakterienzellen	39
4.4.1.2	Plattenkulturen.....	39
4.4.1.3	Flüssigkulturen	40
4.4.1.4	Glycerinkulturen.....	40
4.4.1.5	Lyse der transformierten Bakterienzellen	40
4.4.2	Amplifikation der DNA mit Einbau geeigneter Restriktionsstellen....	42
4.4.2.1	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure- Konzentration.....	42
4.4.2.2	PCR zur Amplifikation der DNA	42
4.4.2.3	Gelelektrophorese	43
4.4.2.4	Aufreinigung von Nukleinsäuren über ein „PCR Purification- Kit“	44
4.4.3	Präparieren von Vektor und DNA- Insert.....	45
4.4.3.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	45

4.4.3.2	Dephosphorylierung von 5' Enden des Vektors	46
4.4.3.3	Aufreinigung der DNA im Agarosegel.....	47
4.4.4	Ligation von DNA- Fragmenten mit Vektoren	47
4.4.5	Hitzetransformation von Bakterienzellen	47
4.4.6	Kontrollverdau und Sequenzierung	48
4.5	Zellkulturtechniken	49
4.5.1	Y1- Zellen	50
4.5.2	NCI h295- Zellen	50
4.5.3	Zellzahlbestimmung.....	51
4.6	Herstellung einer stabil transfizierten Zelllinie.....	52
4.6.1	Ermittlung der optimalen Antibiotikakonzentration zur Selektion	52
4.6.2	Kationische Liposomenkomplexe zur Transfektion eukaryotischer Zellen.....	53
4.6.3	Vereinzelung selektionsresistenter Zellen	55
4.6.4	Lagerung von eukaryotischen Zellen.....	55
4.6.5	Einfrieren von Zellen zur RNA- Extraktion	56
4.7	Semiquantitative Proteindarstellung mittels Western Blot.....	56
4.7.1	Proteindarstellung aus eukaryotischen Zellen mit Lämmli- Puffer ...	57
4.7.2	Analyse von Proteinen in SDS- Polyacrylamidgelen	57
4.7.3	Westernblot	58
4.7.4	Immundetektion der transferierten Proteine.....	59
4.8	Hormonanalysen aus Zellkulturüberständen.....	60
4.8.1	Analyse der Hormonproduktion nach Zugabe von Inhibitor- substanzen	61
4.8.2	Messung der Aldosteronkonzentration im Zellkulturüberstand	61
4.8.3	Messung der Cortisolkonzentration im Zellkulturüberstand	62
4.8.4	Ermittlung von Selektivität und Potenz der Inhibitorsubstanzen	63
4.9	MTT- Test	63

4.10	Statistische Auswertung.....	64
5.	Ergebnisse	65
5.1	Subtyppdifferenzierung bei Patienten mit Primärem Hyperaldosteronismus – eine klinikinterne Statistik	65
5.2	Quantitative Analyse der Expression von CYP11B1 und CYP11B2 mittels RTq PCR	67
5.3	Klonierung der pcDNA3.1zeo(+)- CYP11B1/CYP11B2- Plasmide.....	71
5.4	Herstellung einer stabil transfizierten Y1- CYP11B1 und Y1- CYP11B2 Zelllinie	75
5.5	Untersuchung der Enzymaktivität in den stabil transfizierten Y1- CYP11B- Zelllinien.....	79
5.5.1	Cortisolproduktion der Y1- CYP11B1- Kolonien	79
5.5.2	Aldosteronproduktion der Y1- CYP11B2- Kolonien	80
5.5.3	Hemmung der Enzymaktivität durch ETO und METO	82
5.6	Testung von Aldosteronsynthaseinhibitoren in NCI- h295 Zellen	84
5.7	Testung von Aldosteronsynthaseinhibitoren und fluorierten Derivaten in den Y1- CYP11B1 und Y1-CYP11B2- Zellen	85
5.8	Wirkung der potentesten Inhibitoren auf das Proliferationsverhalten in NCI- h295 Zellen.....	89
6.	Diskussion	92
6.1	Stellenwert einer neuen und selektiven funktionellen Bildgebung in der Differenzialdiagnose des Primären Hyperaldosteronismus.....	92
6.2	Funktionale adrenalen Bildgebung basierend auf Etomidat und Derivaten	94
6.2.1	C11- Meto-/ F18-FETO- PET und 123I-IMTO- SPECT als neuere Bildgebungsverfahren zur Detektion adrenaler Tumoren	94
6.2.2	<i>In vitro</i> - Testung von Etomidat und Derivaten.....	96
6.3	Radioaktiv markierte Aldosteronsynthaseinhibitoren	97
6.3.1	Grundsätzliche Eignung zur funktionellen Bildgebung bei Primärem Hyperaldosteronismus	97
6.3.2	Aldosteronsynthaseinhibitoren als Basis für die Entwicklung eines selektiven Tracers	99

6.4	Das geeignete Testsystem zur Evaluation von Aldosteronsynthese-Inhibitoren	100
6.4.1	Evaluation der Aldosteronsyntheseinhibitoren in NCI- h295 Zellen.....	101
6.4.2	Herstellung einer stabil transfizierten Y1-CYP11B1 und Y1-CYP11B2- Zelllinie	102
6.4.3	Vergleichende Eignung der verwendeten Testsysteme.....	103
6.5	Selektivität und Potenz der getesteten Inhibitorsubstanzen.....	104
6.6	Antiproliferativer Effekt der Enzyminhibitoren in NCI- h295 Zellen	105
6.7	Weiterführende Studien und Ausblick	106
6.8	Limitationen	107
7.	Zusammenfassung	109
8.	Anhang	111
	Literaturverzeichnis	111
	Verzeichnis von Abbildungen und Tabellen	127
	Abkürzungen.....	129
	Enzyme der Steroidogenese	131

1. Einleitung

1.1 Entwicklung und Anatomie der Nebenniere

Die paarigen Nebennieren, Glandulae suprarenales, sind Organe, die vom Fettgewebe der Capsula adiposa renalis umgeben, dem oberen Pol der beiden Nieren aufsitzen. Eine Nebenniere wiegt beim gesunden Erwachsenen etwa 4,0 – 4,2 g. [1] Die rechte Nebenniere ist von vorne gesehen von dreieckiger Gestalt, die linke stellt sich eher halbmondförmig dar. Beide Nebennieren liegen retroperitoneal, die rechte etwas weiter kaudal als die linke, und projizieren sich auf die hintere Bauchwand in Höhe des 11. und 12. Rippenhalses. Auf der dorsalen Seite besitzt jede Nebenniere ein Hilum aus dem Venen und Lymphgefäße austreten. Schon makroskopisch lässt sich die Nebenniere anhand eines Schnittes durch das Organ in Rinde und Mark gliedern, wobei die aufgrund ihres Lipidreichtums goldgelb gefärbte Rinde etwa zwei Millimeter dick ist und damit ca. 80% des Organvolumens einnimmt. [1, 2]

Die arteriellen Zuflüsse erfolgen über ein an der Oberfläche ausgebildetes Arteriennetz, welches aus drei Quellen gespeist wird: der A. suprarenalis sup. aus der A. phrenica inf., der A. suprarenalis media aus der Aorta und der A. suprarenalis inf. aus der A. renalis. Aus diesem oberflächlichen Arteriennetz fließt das Blut einerseits über kurze Arteriolen in die Sinus der Nebennierenrinde, welche ihrerseits wiederum die fenestrierten Kapillaren des Nebennierenmarks speisen. Andererseits durchdringen sogenannte Aa. perforantes die Nebennierenrinde und versorgen somit direkt das Nebennierenmark. Damit erhält das Nebennierenmark einen erheblichen Anteil von Blut, das zuvor durch die Sinus der Rinde geflossen ist. Entsprechend belegen experimentelle Befunde eine Beeinflussung der Hormonbiosynthese im Nebennierenmark durch Hormone der Nebennierenrinde. Umgekehrt wird die

Steroidhormonbiosynthese in der Nebennierenrinde parakrin und durch nervale Stimulation über das Nebennierenmark mit reguliert [3].

Nach der Passage durch die Marksinus sammelt sich das venöse Blut zunächst in den sogenannten Drosselvenen und anschließend in jeweils einer V. centralis, welche als V. suprarenalis aus dem Hilus austritt. Diese münden auf der rechten Seite direkt in die V. cava und auf der linken Seite zunächst in die V. renalis.

Die ausgedehnte Nervenversorgung erfolgt größtenteils aus dem Plexus suprarenalis, aber auch über Fasern des N. splanchnicus, N. phrenicus und N. vagus. [1]

Die Nebennierenrinde lässt sich gemäß der räumlichen Anordnung der Zellen, von außen nach innen, in drei Zonen einteilen: Zona glomerulosa, Zona fasciculata und Zona reticularis. Hier werden akut und bedarfsgerecht aus in Lipidtröpfchen gespeichertem Cholesterinester Steroidhormone synthetisiert. Die für die Hormonsynthese benötigten Enzyme sind in der inneren Membran der Mitochondrien und des glatten Endoplasmatischen Retikulums (ER) gespeichert. Allen steroidhormonproduzierenden Zellen sind daher folgende Eigenschaften gemeinsam: hoher Gehalt an Lipidtröpfchen, Mitochondrien häufig tubulären Typs und eine reiche Ausstattung mit glattem ER.

Die Zona glomerulosa macht ca. 15% der Nebennierenrinde aus und liegt in einer schmalen Schicht direkt unter der bindegewebigen Organkapsel. Ihre Zellen sind relativ klein, enthalten vergleichsweise nur wenige Lipidgranula und liegen in Gruppen zusammen. Im feinen bindegewebigen Stroma, welches die Zellgruppen umgibt, verlaufen in unregelmäßiger Form die Kapillarsinus.

Die beim erwachsenen Menschen breite Zona fasciculata macht 70% des Nebennierenrindenvolumens aus. Sie schließt ohne scharfe Begrenzung an die Zona glomerulosa an und zeichnet sich durch die radiär strangförmig verlaufenden Zellen aus. Diese sind größer als die Zellen der Zona glomerulosa

und erhalten durch ihren Reichtum an Lipidtröpfchen lichtmikroskopisch ein schaumiges Aussehen. Die Zellstränge werden durch radiär verlaufende Sinus mit fenestriertem Endothel begleitet.

Die Zona reticularis macht beim erwachsenen Menschen ca. sieben Prozent der Nebennierenrinde aus und besteht aus netzartig verlaufenden Zellsträngen zwischen denen weite Sinus verlaufen. Die Zellen sind kleiner als die der Zona fasciculata und aufgrund des hohen Gehalts an Lipofuszingranula azidophil angefärbt.

Das Mark besteht aus großen epitheloiden Zellen, welche in Gruppen und Strängen angeordnet sind. Diese sind von spärlichem Bindegewebe und weiten fenestrierten Blutsinus umgeben. Ferner enthält das Nebennierenmark reichlich dicke Bündel von vegetativen Nervenfasern, die an den Parenchymzellen mit axosomatischen Synapsen endigen. Diese chromaffinen oder phäochromen Zellen besitzen keine Nervenfortsätze, enthalten fein granuliertes Zytoplasma und färben sich mit Chromsalzen braun. [1, 4]

Die Nebennierenrinde entwickelt sich mit den Steroid- sezernierenden Zellen der Gonaden aus einer gemeinsamen Zelllinie des Mesoderms [5]. Bereits in der 5. Entwicklungswoche differenzieren sich die ersten Zölomepithelzellen zu großen Zellen der fetalen Nebennierenrinde. Kurz darauf werden diese von einem zweiten Stamm kleinerer Zellen aus dem Zölomepithel umwachsen, welche später die definitive Nebennierenrinde bilden. Die äußere Schicht der fetalen Nebennierenrinde wandelt sich in die Zona reticularis um, während der Rest sich nach der Geburt schnell zurückbildet. Erst kurz vor der Pubertät ist der definitive Aufbau der Nebennierenrinde abgeschlossen. [6]

Das Nebennierenmark entwickelt sich aus dem Ektoderm und kann aufgrund seiner Entwicklungsgeschichte als ein modifiziertes sympathisches Ganglion angesehen werden. [1]

1.2 Physiologie der Nebennierenrinde

1.2.1 Steroidhormone

Der *de novo* Synthese aller Steroidhormone dient Cholesterol als Ausgangssubstanz. Dieses kann, quantitativ am bedeutsamsten, aus dem Lipoprotein LDL gewonnen oder aus Azetat neu synthetisiert werden, wobei das Enzym HMG CoA – Reduktase den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt katalysiert [7]. Während die Akutregulation der Steroidhormonbiosynthese über die Verfügbarkeit der jeweiligen Substrate erfolgt, wird auf längere Sicht die Quantität der beteiligten Enzyme angepasst [8]. Der erste Schritt der Steroidogenese ist der Transport von Cholesterol an die innere Mitochondrienmembran, getriggert durch das „steroidogenic acute regulatory“ (StAR) Protein [9]. Die Überexpression von StAR dient der Akutregulation der Steroidhormonbiosynthese und wird vor allem über cAMP und die Erhöhung der intrazellulären Calcium – Konzentration reguliert [10, 11].

1.2.1.1 Sexualsterioide

Die Androgene der Nebennierenrinde dienen als Vorstufen für die Synthese von Östrogenen. Das hauptsächliche Androgen ist Dehydroepiandrosteron (DHEA) und sein Sulfat (DHEAS), welches in den Zielgeweben zu Testosteron, Dehydrotestosteron und Östrogen umgewandelt werden kann. Bei der Frau stellen die Androgene aus der Nebennierenrinde den Hauptteil der männlichen Geschlechtshormone dar. [12] DHEA, DHEAS und Androstendion werden in der Zona fasciculata und vor allem in der Zona reticularis synthetisiert. [7]

1.2.1.2 Glukokortikoide

Glukokortikoide regulieren eine Vielzahl vitaler Funktionen und dienen dem Erhalt der Körper- Homöostase. Sie wirken diabetogen indem sie die Glukoneogenese in der Leber fördern und gleichzeitig den Glukosetransport

und die Glukoseverwertung hemmen. Zudem üben sie katabole Wirkung auf die Muskulatur, die Haut, den Knochen und das lymphatische Gewebe aus. Darüber hinaus hemmen Glukokortikoide viele Immunprozesse und alle Entzündungsprozesse. Im Sinne eines permissiven Effektes erhöhen Glukokortikoide die Potenz einiger wichtiger endogener Signalsubstanzen. So wird die Katecholaminwirkung am Adrenozeptor und an den Fettzellen potenziert. Ebenso wird parakrin die Katecholaminproduktion im benachbarten Nebennierenmark gesteigert. Außerdem bestehen Effekte auf das ZNS, wie die Induktion von Alterungsprozessen, die Erhöhung der Reizwahrnehmung und die Generierung von Emotionen. [12] Diese Effekte werden durch Bindung der Glukokortikoide an den im Zytoplasma lokalisierten Glukokortikoidrezeptor initiiert [9].

Glukokortikoide, zu 95% Cortisol und zu fünf Prozent Corticosteron, werden in der Zona fasciculata und weniger in der Zona reticularis der Nebennierenrinde synthetisiert. Das neu synthetisierte Cortisol diffundiert ins Plasma und wird dort zu 90% an Corticosteroid- bindendes Globulin (CBG) und zu sieben Prozent an Albumin gebunden und liegt nur zu drei bis vier Prozent als freies Cortisol vor. [7]

1.2.1.3 Mineralokortikoide

Aldosteron wirkt auf das extrazelluläre Volumen durch Beeinflussung der renalen Natriumexkretion bzw. -rückresorption. Als osmotisch bedeutsamstes Partikel hält Natrium im Extrazellulärraum Wasser zurück. Da das Extrazellulärvolumen ein wichtiger Regulator des Blutdrucks ist, kommt dem Aldosteron eine tragende Rolle in der Blutdruckregulation zu. Es gibt darüber hinaus Hinweise auf eine direkte vasokonstriktorische Aktivität [13]. Aldosteron wirkt vor allem an der Niere aber auch im Colon, sowie den Speichel- und Schweißdrüsen. Entscheidend dabei ist die Interaktion mit dem Mineralokortikoid- Rezeptor, welcher auch im Myokard, der Leber, dem Gehirn und anderen Geweben zu finden ist. In der Niere hat dieser allerdings eine etwa

10fach höhere Affinität zum Cortisol. An den Glukokortikoid- Rezeptor bindet Aldosteron nur schwach affin. Durch die Interaktion mit dem Mineralokortikoid- Rezeptor wird im renalen Tubulus die Aktivität von sieben Schlüsselproteinen erhöht, die am Natrium- Transport beteiligt sind. Dies beinhaltet unter anderem die Erhöhung der Transkription der Natrium- Kalium- Pumpe, der apikalen Natrium- Kanäle und des Natrium- Kalium- Chlorid- Kotransporters. Dabei besteht keine fixierte stöchiometrische Beziehung zwischen Kalium- Sekretion und Natrium- Reabsorption. Die Kalium- Exkretion ist vielmehr als Sekundäreffekt zur Natrium- Reabsorption zu verstehen. Hinsichtlich der Kalium- Balance spielt die Aldosteron- Wirkung jedoch eine entscheidende Rolle. [7] Interessanterweise besteht kaum Einfluss auf die Serum- Natrium- Konzentration, da bei einem erhöhten Gesamtnatriumgehalt im Körper die natriumretinierende Wirkung von Aldosteron verloren geht (Mineralokortikoid- Escape- Phänomen) [14].

Die Aldosteron- Produktion ist auf die Zona glomerulosa beschränkt. 37% des zirkulierenden Aldosterons liegen frei im Plasma vor, der Rest ist schwach an CBG (21%) und Albumin (42%) gebunden. [7]

Mineralokortikoide Wirkung üben auch Glukokortikoide und Vorstufen, wie Cortisol, Desoxycorticosteron und Cortison aus [7].

1.2.2 Enzyme der Steroidhormonbiosynthese

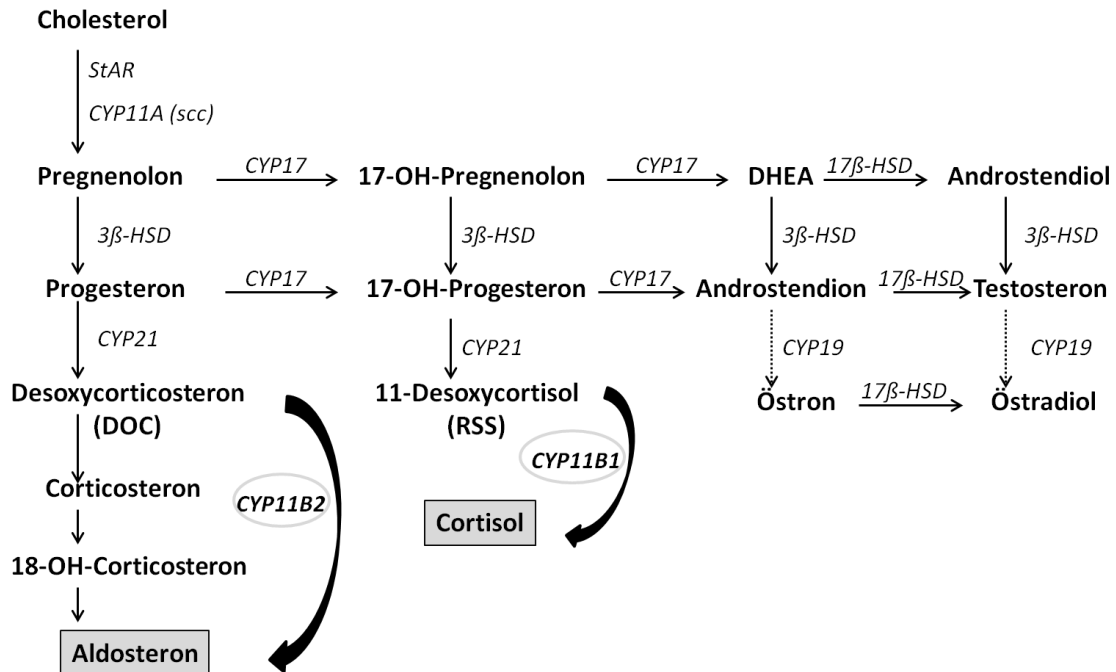


Abb. 1.1. Steroidhormonbiosynthese. Modifizierte Darstellung nach [15]. Die Pfeile stellen die Synthese von Cortisol aus 11-Desoxycortisol (RSS) durch CYP11B1 und die Synthese von Aldosteron aus 11-Desoxycorticosteron (DOC) in 3 enzymatischen Schritten durch CYP11B2 dar.

1.2.2.1 Cytochrom P450

Bei den Cytochrom P450 (CYP) – Enzymen handelt es sich um Häm-enthaltende, membrangebundene Monooxygenasen [16].

1.2.2.1.1 CYP 11A, 17, 19, 21

Der erste und zeitlimitierende Schritt der Steroidhormonbiosynthese wird von Cytochrom P450 „side- chain cleavage“ (scc) bzw. CYP11A katalysiert. Dieses

Enzym katalysiert 3 sequenzielle Oxidationen und dient damit der Konversion von Cholesterol zu Pregnenolon. Es wird in allen drei Zonen der Nebennierenrinde sowie dem Ovar, den Testes, der Plazenta und dem zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert. [16] Postnatal ist die Expression von CYP11A damit überlebensnotwendig [17].

CYP17 katalysiert zwei mischfunktionelle Oxidationsreaktionen, welche der Produktion der C19- Steroide DHEA und Androstendion dient. Es wird in allen klassischen steroidogenen Geweben, aber nicht der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde exprimiert. [16]

CYP19, die sogenannte Aromatase, dient der Konversion der C19- Androgene Androstendion und Testosteron zu den C18- Östrogenen Östron und Östradiol. Es ist vor allem in der Plazenta und den Ovarien zu finden. [16]

CYP21 katalysiert die Hydroxylation des C21 von Progesteron und 17 α -Progesteron und ist damit an der Produktion von 11- Desoxycorticosteron (DOC) und 11- Desoxycortisol (RSS) beteiligt. Dieses Enzym wird alleinig in der Nebennierenrinde exprimiert und dort, da es essenziell für die Synthese von Glukokortikoiden und Mineralokortikoiden ist, in allen drei Zonen. [16]

1.2.2.1.2 CYP 11B1 und CYP 11B2

Die beiden CYP11B Enzyme sind an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. CYP11B1 katalysiert hier die 11 β - Hydroxylation von RSS und DOC zu Cortisol und Corticosteron. Es kann, wenig potent, auch das C18 hydroxylieren. [16] Entgegen früherer Vermutungen besitzt CYP11B1 aber nicht die Kapazität zur weiteren 18- Oxidation. Es gelang die Identifikation einer zweiten Isoform von CYP11B1, nämlich CYP11B2 oder Aldosteronsynthase, welches als einziges Enzym sowohl die 11 β - Hydroxylation als auch die 18- Hydroxylation mit weiterer Oxidation katalysieren kann, und sich damit als absolut essenziell für die Aldosteronbiosynthese herausstellte. [18] Somit ist bei der Aldosteronbiosynthese keine sequenzielle Katalyse durch CYP11B1 von

Nöten, da alle drei Reaktionen, die 11 β - Hydroxylierung von DOC, sowie die Hydroxylierung und anschließende Oxidierung am C18, durch die Aldosteronsynthase katalysiert werden können. [16]

Die für die beiden Enzyme kodierenden Gene, welche in die gleiche Richtung transkribiert werden, liegen eng verbunden, getrennt durch etwa 40kb, auf dem Chromosom 8q 21-22. Sie weisen etwa 95% Homologie in der kodierenden Sequenz und 90% im Bereich der Introns auf und besitzen eine zu 93% identische Aminosäuresequenz. Dabei sind beide Enzyme aus der gleichen Anzahl von Aminosäuren aufgebaut. CYP11B1 weist ein Molekulargewicht von 51kDA, CYP11B2 von 49kDA auf. [16]

Die Expression der beiden CYP11B- Enzyme ist auf die Nebenniere beschränkt, wobei CYP11B2 rein in den Glomerulosazellen, CYP11B1 jedoch vor allem in den Fasciculata- und Reticulariszellen und in geringerem Ausmaß auch in den Glomeruloaszellen exprimiert wird. Die Expression von CYP11B1 ist damit insgesamt quantitativ wesentlich bedeutsamer als die von CYP11B2. [16]

1.2.2.2 Hydroxysteroiddehydrogenasen

Die Hydroxysteroiddehydrogenasen (HSD) sind in ihren zahlreichen Isoformen jeweils Produkt eines spezifischen Gens [16]. Sie besitzen keine Häm- Gruppe und benötigen NAD⁺ oder NADP⁺ als Kofaktoren. *In vitro* agieren diese Enzyme typischerweise bidirektional, neigen in intakten Zellen jedoch - abhängig vom verfügbaren Kofaktor - zur unidirektionalen Arbeitsweise [19].

Die enzymatische Aktion der 3 β - HSD ist absolut essenziell für die Synthese aller Steroidhormone, da sie in zwei sequenziellen Reaktionen die Umwandlung von Pregnenolon, 17 α - Hydroxypregnenolon und DHEA zu Progesteron, 17 α - Hydroxyprogesteron und Androstendion katalysiert. Im Menschen existieren zwei Isoformen der 3 β - HSD, welche auf zell- und gewebsspezifische Weise exprimiert werden. [16] Die fehlende Expression der 3 β - HSD in der fötalen

Nebenniere [20] erklärt das Fehlen der Cortisol- und Aldosteronsynthese bis in die Spätschwangerschaft.

Die 17 β -HSDs katalysieren den finalen Schritt in der Biosynthese der aktiven gonadalen Steroidhormone Testosteron und Östradiol, sind an der Biosynthese der adrenalen Steroidhormone jedoch nicht beteiligt. [16]

Cortisol wird durch die 11 β -HSD der Leber zu Cortison abgebaut. Dieser Schritt funktioniert auch in der umgekehrten Richtung, was entscheidend für Cortison als therapeutische Substanz ist. Die 11 β -HSD 2 im distalen Tubulus und Sammelrohr der Niere dagegen katalysiert die irreversible Konversion von Cortisol zu Cortison. Dies hat zur Folge, dass Aldosteron dort den relativ unspezifischen Mineralokortikoidrezeptor ohne Interferenz durch Cortisol, trotz dessen quantitativer Bedeutsamkeit und höherer Affinität zum Rezeptor, regulieren kann. [7]

1.2.3 Die Hypophysen- Nebennieren- Achse

Hypothalamische Neurone im Nucleus paraventricularis produzieren Corticoliberin (CRH), ein 41 Aminosäuren Peptidhormon im Rahmen der zirkadianen Rhythmik oder akut, im Sinne einer Stressreaktion. Auch in weiteren Geweben, wie Zellen des Gastrointestinaltraktes, der Lunge, den Testes, den Nebennieren oder anderer Bereiche des ZNS kann CRH sezerniert werden. Die Interaktion von CRH mit seinem G- Protein gekoppelten Rezeptor auf der Membran corticotroper Zellen stellt den Stimulus für die Exozytose von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) im Hypophysenvorderlappen und über Gentranskription die Bildung von Proopiomelanocortin (POMC) dar. Darüber hinaus beeinflusst CRH als Neurotransmitter/ Neuromodulator unter anderem auch die zentrale Steuerung des autonomen Nervensystems. Auch durch Adiuretin (ADH), Cholecystokinin, Noradrenalin, Angiotensin oder Vasoaktivem Intestinalen Peptid (VIP) kann im Rahmen einer Stressreaktion die ACTH-Sekretion stimuliert werden. Somatostatin dagegen wirkt hemmend auf die ACTH-Freisetzung.

Das 39 Aminosäuren Peptidhormon ACTH entsteht aus POMC. Neben dem Hauptprodukt ACTH entstehen aus POMC durch Spaltung an basischen Aminosäuren auch noch γ -lipotropes Hormon, melanozytenstimulierendes Hormon (MSH) und β - Endorphin. [12] ACTH bindet an den Melanokortinrezeptor Typ 2, einen G- Protein gekoppelten Rezeptor [21] auf allen 3 Typen steroidhormonproduzierender Zellen, was zur Aktivierung eines cAMP/PKA-abhängigen Pfades führt. Hierdurch erfolgt die Stimulation des zeitlimitierenden Faktors der Cortisolsynthese (katalysiert durch CYP11A) und die Synthese von an der Cortisolsynthese beteiligten Proteinen wie der CYP- Enzyme, StAR, dem LDL- Rezeptor und HMG- CoA. Hierüber wird die Akutsynthese von Cortisol und in geringerer Bedeutung auch Aldosteron getriggert. Die Corticoide werden ca. 15 Minuten nach ACTH- Stimulation direkt in die Blutbahn sezerniert [12] und bleiben unter chronischer Stimulation durch ACTH dauerhaft erhöht [22]. Ein Dauerstimulus durch POMC- Abkömmlinge kann deshalb zur Nebennierenrinden- Hypertrophie führen [23]. Es besteht eine Hemmwirkung im Sinne eines negativen Feedbacks durch Cortisol sowohl auf die CRH- als auch auf die ACTH- Produktion. [7] Weitere durch POMC- Abkömmlinge vermittelte Wirkungen sind die Lipolyse und Intensivierung der Hautpigmentation. [12]

ACTH wirkt über seine Rezeptorinteraktion gering auch auf die Aldosteronsekretion, jedoch wird primär die Sekretion von Glukokortikoiden stimuliert. [7]

1.2.4 Das Renin- Angiotensin- Aldosteron- System

Das Renin- Angiotensin- Aldosteron- System (RAAS) ist der Hauptregulator des intravasalen Volumens und des Blutdrucks. Fehlregulationen des RAAS sind mit verschiedenen Formen von Bluthochdruck vergesellschaftet. [24, 25]

Im Unterschied zur Regulation der Cortisolsekretion existiert kein Speicherpool für Aldosteron, die Sekretion wird alleinig durch die Syntheseleistung limitiert. Sekretagoga stellen hierfür ACTH und, physiologisch wesentlich bedeutsamer, Angiotensin II und Kalium dar. Diese steigern die Sekretion durch

Aktivitätserhöhung jener Enzyme, welche die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte katalysieren, CYP11A und CYP11B2. [7]

Der Regulationsmechanismus zur Freisetzung von Renin läuft über das aktiv zirkulierende Volumen bzw. den systemischen arteriellen Druck. Über den Barorezeptor- Reflex und damit medulläre Kontrollzentren kommt es zur Katecholaminfreisetzung und β -adrenergen Stimulation der Reninsekretion aus den Zellen des juxtaglomerulären Apparates, welche die afferenten Arteriolen der renalen Glomeruli umgeben. Dies kann auch durch renale Barorezeptoren, freies Kalium oder Prostaglandine direkt stimuliert werden. [7, 26]

Renin bewirkt die Umwandlung des in der Leber synthetisierten und in der Blutbahn zirkulierenden Angiotensinogens zum inaktiven Dekapeptid Angiotensin I. Dieses wird durch das in vielen Geweben lokalisierte „Angiotensin converting enzyme“ (ACE) zum Oktapeptid Angiotensin II umgewandelt. [26]

Angiotensin II und Kalium üben dann direkte Wirkung auf die Glomerulosa-zelle der Nebennierenrinde aus. Beide wirken synergistisch über die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Ersteres über Interaktion mit dem G-Protein gekoppelten Angiotensin (AT) 1 – Rezeptor und letzteres über Depolarisation der Plasmamembran und Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle. [7] Hierbei scheint Angiotensin die Aldosteronproduktion eher akut zu stimulieren und Kalium der hauptsächliche Stimulus für die Anpassung der Aldosteronsekretion als Antwort auf Kaliumzufuhr oder Natriummangel zu sein [27, 28].

Der AT 2 – Rezeptor dagegen stellt zumindest hinsichtlich vieler biologischer Aktivitäten den Gegenpart zum AT 1 – Rezeptor dar [26]. Dass die Stimulation der Aldosteronsekretion via ACTH und damit Erhöhung von cAMP eher sekundär ist, zeigt sich an den unter chronischer ACTH- Stimulation vorübergehend steigenden, innerhalb 48 Stunden jedoch noch unter den Ausgangswert fallenden Aldosteron- Spiegeln [22].

Angiotensin übt über negatives Feedback eine direkte und über seine vasokonstriktorische Eigenschaft eine indirekte Hemmwirkung auf die Reninsekretion aus. Aldosteron übt diese Hemmwirkung über Beeinflussung des Salz- und Wasserhaushaltes aus [7]. Atriopeptin hemmt als Gegenspieler von Angiotensin II direkt und indirekt die Aldosteronsekretion [12]. Eine Hemmwirkung auf die Reninsekretion besitzen außerdem Dopamin und α -adrenerge Stimulation [26].

Es existieren noch eine Reihe anderer Mitglieder der Angiotensin- Peptid-Familie. Für die Nebennierenrinde am bedeutsamsten ist AT III, welches ein schwächerer Vasokonstriktor als AT II ist, aber die Aldosteronsekretion ebenso potent stimuliert. [29]

1.3 Nebenniereninzidentalome

„Ein Nebennierentumor, der in der bildgebenden Diagnostik entdeckt wird, ohne dass zuvor ein klinischer Verdacht bestand, wird als „Inzidentalom“ oder „zufällig entdeckte Nebennierenraumforderung“ bezeichnet.“ [30]

Die Evaluation von 25 Autopsiestudien belegt, dass die Häufigkeit des Auftretens von Nebenniereninzidentalomen mit dem Alter steigt und im Schnitt bei 5,9% liegt [31]. In einer alternden Bevölkerung mit großflächigem Zugang zu hochauflösenden bildgebenden Verfahren wird die Inzidenz von Nebenniereninzidentalomen in Zukunft weiter zunehmen [32]. Therapeutisch entscheidend ist die Frage nach der Dignität der Raumforderung und ob eine autonome Hormonsekretion vorliegt. Sowohl der relative Anteil der sogenannten endokrin aktiven Inzidentalome als auch der primären Nebennierenrinden- Karzinome steigt mit der Größe der Raumforderung. In ca. 20% der Inzidentalome ist eine autonome Hormonsekretion nachweisbar. In der Schnittbildgebung haben Karzinome häufig unscharf begrenzte Ränder, eine höhere Dichte und zeigen öfter Einblutungen, Calcificationen und Inhomogenität [33]. Bei Auffälligkeit eines dieser Aspekte sollte daher zusätzliche Diagnostik erwogen werden. Malignitätskriterien können weiterhin eine hohe

Kontrastmittelaufnahme und geringer Kontrastmittel- Washout im CT, eine hohe Aktivität im FDG- PET oder autonome Androgen- Sekretion sein. Bei bilateralen adrenalen Raumforderungen sind insbesondere folgende Differentialdiagnosen zu erwägen: Metastasen einer malignen Grunderkrankung, eine kongenitale Nebennierenrindenhypertrophie, bilaterale Nebennierenrindenadenome oder Infiltration von außen [34].

Je nach Autor wird ab einer Größe von mehr als einem Zentimeter zumindest die Evaluation bzgl. einer potentiell bestehenden autonomen Cortisol- (z.B. mittels niedrig dosiertem Dexamethason- Hemmtest), Katecholamin- (Bestimmung der Plasma- Metanephrine oder Katecholamine/ Metanephrine im angesäuerten 24h Sammelurin) und Aldosteron- Produktion (Aldosteron- Renin- Quotient) empfohlen. Bei hypertensiven Patienten mit Inzidentalom sollten diese Testungen unabhängig von der Tumorgöße bzw. bereits bei kleineren Inzidentalomen durchgeführt werden. [30, 34, 35]

Insgesamt besteht allerdings kein klarer Konsens bezüglich der Diagnostik und Therapie von Nebenniereninzidentalomen [33, 34].

1.4 Primärer Hyperaldosteronismus

1.4.1 Historisches

Erstmals 1954 beschrieb Jerome W. Conn ein Krankheitsbild, das er bei einer 34jährigen Frau beobachtete. Diese litt an arterieller Hypertonie, Hypokaliämie, milder Hyponatriämie und metabolischer Alkalose. Auf der Basis eines Aldosteron- produzierenden- Nebennierenrindenadenoms ging dieser Symptomkomplex als „Conn- Syndrom“ in die Literatur ein. [36] Conn ging schon damals von einer Prävalenz dieses Syndroms bei 20% aller Hypertoniker aus [37]. In den ersten Jahren nach Conns Erstbeschreibung sah man den Primären Hyperaldosteronismus (PA) als klassische und von Conn beschriebene hypokaliämische Verlaufsform und fand dabei eine Prävalenz von < 1% aller Hypertoniker [38]. Conn konnte schließlich 10 Jahre nach seiner

Erstbeschreibung zeigen, dass die Hypokaliämie als Folge eines Primären Hyperaldosteronismus erst als Spätsymptom der Erkrankung zu verstehen ist [39], womit von einer wesentlich höheren Prävalenz des PA auszugehen war.

1.4.2 Subtypen und Ätiologie

Der Primäre Hyperaldosteronismus gehört in die Gruppe des Mineralokortikoidhochdrucks [14]. Diese umfasst Störungen, in welchen eine überproportional hohe und relativ autonome Aldosteronproduktion vorherrscht, die sich auch durch ein Überangebot an Kochsalz nicht supprimieren lässt [40]. Die Hauptcharakteristika sind eine vermehrte Resorption von Natrium und freiem Wasser sowie eine Exkretion von Kalium und Protonen im distalen Tubulus und in den Sammelrohren der Niere. [14]

Rossi et al. unterscheiden zwischen operativ zu therapierenden und nicht operativ angebbaren Formen des Mineralokortikoidhochdrucks [41].

Operativ zu therapierende Formen
<ul style="list-style-type: none"> • Aldosteron- produzierendes Adenom (APA) • Unilaterale Hyperplasie (PAH) • Multinoduläre unilaterale adrenokortikale Hyperplasie (MUAN) • Ovarieller Aldosteron- sezernierender Tumor • APA oder Bilaterale Hyperplasie mit konkomitantem Phäochromozytom • Aldosteron- produzierendes Karzinom (APC)
Nicht operativ zu therapierende Formen
<ul style="list-style-type: none"> • Bilaterale Hyperplasie (BAH) • Unilaterales APA mit BAH • Familiärer Hyperaldosteronismus Typ I bzw. Glukokortikoid- supprimierbarer Hyperaldosteronismus

- Familiärer Hyperaldosteronismus Typ II
- Apparenter Mineralokortikoid- Exzess/ Pseudohyperaldosteronismus
- Chronischer Lakritz- oder Antazida- Abusus

Tab. 1.1. Formen des Mineralokortikoidhochdrucks modifiziert nach [41]

In mehr als 99% der Fälle wird ein PA entweder durch ein Aldosteronproduzierendes Adenom (APA) oder eine bilaterale Hyperplasie der Nebennierenrinde (BAH) verursacht [42], Untersuchungen reduzieren sich daher zumeist auf diese beiden Hauptentitäten. In etwa 2/3 der Fälle liegt eine BAH vor [43].

1.4.3 Prävalenz und Klinik

Die Prävalenz des Primären Hyperaldosteronismus wird mit 5 – 13% aller hypertensiven Patienten, vor allem aber Patienten mit schwerer arterieller Hypertonie, beschrieben [44]. Eine große prospektive multizentrische Studie untersuchte 1125 Patienten mit neu diagnostiziertem arteriellen Hypertonus und fand eine Prävalenz des PA von 11,2% ohne wesentlichen Unterschied in der Geschlechterverteilung. Dabei fand sich folgende Verteilung bezüglich der bedeutendsten Subtypen: In 42,8% lag ein APA vor, in 57,2% eine BAH. [45]

Die inadäquate Überproduktion von Aldosteron verursacht kardiovaskuläre Schäden, Suppression des Plasma- Renins, arterielle Hypertension, Kochsalz-Retention und vermehrte Kalium- Exkretion. Wenn letztere andauert und entsprechend ausgeprägt ist, führt sie im Zeitverlauf zu Hypokaliämie. [40] Eine spontane Hypokaliämie findet sich somit nur bei etwa 10% der Patienten mit neu diagnostiziertem PA aber deutlich häufiger bei Vorliegen eines APA [45]. Klassische Symptome des PA wie Muskelschwäche, Parästhesien oder Polyurie sind auf die Hypokaliämie zurückzuführen und stellen damit wenn überhaupt erst ein Spätsymptom der Erkrankung dar. Laborchemisch kann in

diesen Fällen neben der Hypokaliämie, wie bei Conn beschrieben, eine metabolische Alkalose auffällig werden. [14]

Aus dem Aldosteronexzess resultieren schließlich weitere Komplikationen: am häufigsten kardiovaskulärer Genese (z.B. Apoplex, Myokardinfarkt, Rhythmusstörungen); seltener renale Endorganschäden und schließlich, am wenigsten bedeutsam, metabolischer Genese. Hierbei konnten reine Hypertonus- assoziierte Komplikationen statistisch bereinigt werden, ebenso weitere relevante Faktoren wie Alter, Geschlecht und BMI. [46]

1.4.4 Diagnostik

In der Diagnostik des PA ist es wichtig, in jedem Fall die Stufendiagnostik zu beachten [14].

1.4.4.1 Screening

Empfohlen wird, vor allem Risikokollektive zu screenen. Dies umfasst Hypertoniker ab Grad 2 der Joint National Commission (RR > 160-179/100-109 mmHg) oder mit therapierefraktärer Hypertonie. Außerdem Hypertoniker mit Hypokaliämie, Nebenniereninzidentalom, positiver Familienanamnese für früh einsetzende arterielle Hypertonie oder mit dem Auftreten eines zerebrovaskulären Ereignisses in relativ jungen Jahren (< 40 Jahre). Darüber hinaus wird das Screening allen Verwandten ersten Grades von Patienten mit Primärem Hyperaldosteronismus empfohlen. [40]

Als allgemein verlässlichstes verfügbares Screening- Instrument gilt der Aldosteron- Renin- Quotient (ARR). Dieser wird jedoch durch zahlreiche externe Faktoren beeinflusst, wie dem Natrium- Kalium- Haushalt, viele Medikamente (vor allem Antihypertensiva und Aldosteron- Antagonisten), die Tageszeit, Orthostase, Methode der Blutentnahme, Nierenfunktion, Schwangerschaft und das Alter des Patienten. Genaue Anleitung zur

Bestimmung des Aldosteron- Renin- Quotienten gibt die „Clinical Practice Guideline“ der Endocrine Society. [40]

Weniger klare Richtlinien sind allerdings zur laborchemischen Bestimmung von Renin und Aldosteron sowie zur Interpretation des ARR verfügbar. Unterschiedliche diagnostische Protokolle und die Vielzahl verschiedener Testsysteme zur Hormonbestimmung erfordern von Zentrum zu Zentrum unterschiedliche cut-off- Werte und Interpretationen, die auch die klinische Wahrscheinlichkeit des Vorliegens eines PA mit berücksichtigen. [40]

1.4.4.2 Bestätigungstests

Ein pathologisch erhöhter Aldosteron- Renin- Quotient genügt nicht für die Diagnose eines Primären Hyperaldosteronismus. Daher sollte bei auffälligem Quotienten im Anschluss an das Screening ein sogenannter „Suppressions-Test“ durchgeführt werden, um zu bestätigen, dass eine inadäquat hohe und nicht supprimierbare Aldosteronsekretion besteht. Mehr oder minder etablierte Tests hierfür sind der intravenöse- und orale Kochsalzbelastungstest, der Fludrocortison- Suppressionstest und der Captopril- Test. [40, 47]

Während in den von der Endocrine Society 2008 publizierten Leitlinien die vier Bestätigungstests als gleichwertig angesehen werden [40], wird von anderen Autoren primär der intravenöse Kochsalzbelastungstest empfohlen [48].

Für die Durchführung des Kochsalzbelastungstests sind dieselben Störfaktoren zu berücksichtigen wie schon für den Aldosteron- Renin- Quotienten beschrieben.

1.4.4.3 Subtyppdifferenzierung

Die Endocrine Society empfiehlt allen Patienten mit bestätigtem Primärem Hyperaldosteronismus, sich für die Subtyppdifferenzierung initial einer CT- Bildgebung der Nebennieren zu unterziehen. [40]

In den späten 1960ern wurde der selektive Nebennierenvenenkatheter (NNVK) als diagnostischer Test eingeführt, um zwischen unilateraler und bilateraler Erkrankung zu unterscheiden [44]. Dieser gilt nach wie vor als Goldstandard der Subtyppdifferenzierung, so dass empfohlen wird, dass sich alle Patienten mit bestätigtem PA, die einer operativen Intervention grundsätzlich zugänglich sind, einem NNVK, durchgeführt von einem geübten Interventionalisten, unterziehen [40]. Hierbei erfolgt die Blutentnahme aus beiden Nebennierenvenen und peripher, z.B. aus der Vena cava unterhalb des Mündungsbereiches der Nebennierenvenen, der Vena iliaca oder eine Cubitalvene. Dies geschieht mit Hilfe eines femoral-venösen Zuganges, wobei die Position der Katheterspitze mittels Injektion kleiner Mengen Kontrastmittels und röntgenologischer Dokumentation verifiziert wird. [49]

Allerdings herrscht hierbei große Unstimmigkeit bezüglich des cut-off-Wertes für die Selektivität und der anzuwendenden Lateralisierungs-Kriterien. Zur Feststellung der selektiven und damit technisch erfolgreichen Durchführung wird der Quotient aus Cortisol der jeweiligen NNV zu Cortisol der Peripherie (z.B. V. cava unterhalb der Nebennierenvenen) verwendet mit einem cut-off – Wert je nach Zentrum zwischen 1,1 und 5. Zur Lateralisierungs-Diagnostik und damit Detektion einer unilateralen Aldosteronproduktion dient meist der Aldosteron-Cortisol-Quotient der verschiedenen Lokalisationen. Verglichen wird der Quotient der dominanten NNV mit dem der nicht-dominanten, wobei je nach Zentrum ein Lateralisierungs-Faktor von 2 – 5 als Diagnosekriterium einer unilateralen Erkrankung dient. Andere Autoren verlangen als Lateralisierungskriterium zusätzlich einen im Vergleich zur Peripherie supprimierten Quotienten der nicht-dominanten NNV. [44] Auch die technische Durchführung des NNVK ist keinesfalls standardisiert. Je nach Autor wird mit sequenzieller oder simultaner Nebennieren-Blutentnahme mit oder ohne kontinuierlicher oder bolusweiser ACTH-Stimulation gearbeitet [40]. Als technische Neuerung wurde an einigen Zentren bereits die Cortisol-Schnellmessung eingeführt, welche zu deutlich verbesserten Erfolgsquoten führt [50-52]. Durchschnittlich ist die Durchführung des NNVK jedoch nach wie vor in etwa 20% aller Fälle nicht erfolgreich [44].

Für den derzeitigen Goldstandard der Differenzialdiagnostik des PA ist neben der erläuterten technischen Problematik auch keinesfalls eine 100%ige Genauigkeit für die Subtypdifferenzierung anzunehmen. Einige Autoren berichten von falsch positiven NNVK- Ergebnissen, und damit eingeschränkter Spezifität bezüglich der Diagnostik einer unilateralen autonomen Aldosteron-Produktion [53-55]. Die falsch- negativen NNVK- Ergebnisse dürften unterschätzt werden , da in diesem Falle meist von einer operativen Therapie abgesehen und daher keine histologische Diagnosesicherung erhalten wird [44].

1.4.5 Therapie

Für das APA ist die laparoskopische Adrenalektomie, idealerweise selektive Adenomektomie, die Therapie der Wahl [14]. In nahezu allen Fällen normalisiert sich nach dem Eingriff die präoperativ bestehende Hypokaliämie [56, 57]. Von einer Remission der arteriellen Hypertonie (definiert als ein Blutdruck < 140/90 mmHg ohne antihypertensive Medikation) ist in etwa 50% aller Fälle auszugehen (je nach Kollektiv 35% - 60%). Hierbei wird bei jüngerem Alter und kürzerer Hypertoniedauer eine höhere Remissionsrate erzielt. [40]

Bevorzugte Therapie der BAH bzw. bei Kontraindikationen für die Operation ist die medikamentöse Therapie mit dem Mineralokortikoid- Rezeptor-Antagonisten Spironolacton. Leider weist dieses Medikament vor allem in der Dauertherapie antiandrogene und progestagene Nebenwirkungen, wie Gynäkomastie, Libidoverlust, Zyklusstörungen und Mastodynie auf und wird daher speziell bei Männern oft nur in submaximaler Dosierung toleriert. Der selektive Mineralokortikoid- Rezeptor- Antagonist Eplerenon zeigt in vivo nur ca. 25 – 75% der Potenz des Spironolacton und ist für die Therapie des PA noch nicht zugelassen. Bei wesentlich geringerer antiandrogener und progestagener Wirkung ist dieser jedoch mit deutlich weniger Nebenwirkungen assoziiert. [14] Die verbesserte Toleranz steht hierbei den höheren Kosten und der fehlenden klinischen Evidenz gegenüber. Bei Spironolacton- Intoleranz wird daher

empfohlen, als zweite Option unter kontrollierten Bedingungen, auf Eplerenon auszuweichen [40].

Die Applikation von Mineralokortikoidrezeptor- Antagonisten sollte bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ab Stadium 4 vermieden werden [40].

Zusätzlich kann die Gabe der kaliumsparenden Diuretika Amilorid oder Triamteren erwogen werden, da diese den vom Mineralokortikoidrezeptor induzierten luminalen Natriumkanal inhibieren [14].

1.5 Inhibitoren von CYP11B1 und CYP11B2

1.5.1 Etomidat und Derivate

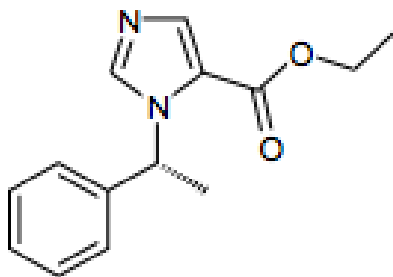


Abb. 1.2. Strukturformel Etomidat

Etomidat, ein substituiertes Imidazolderivat, wird derzeit als Kurzzeitanästhetikum bzw. zur Narkoseeinleitung angewandt. Die Wirkung ist GABA- agonistisch mit entsprechend dämpfendem Effekt auf die Formatio reticularis ohne Wirkung auf das zentrale autonome Nervensystem. Die Wirkdauer liegt bei ca. 4 – 8 Minuten, wobei der Vorteil für die praktische Anwendung in der fehlenden kardiodepressiven Wirkung liegt. [58, 59] Etomidat fand sich 1972 erstmalig in der klinischen Anwendung, zunächst zur Narkoseeinleitung und Langzeitsedierung von Intensivpatienten [60, 61]. Darüber hinaus findet die Substanz Anwendung in der kurzfristigen Therapie des Cushing- Syndromes [62, 63].

Nachdem 1983 durch Ledingham und Watt erstmals ein Anstieg der Mortalität bei Intensivpatienten nach Langzeitsedierung mit Etomidat dokumentiert wurde [64], konnten mehrere Studien eine Suppression der Cortisol-, Corticosteron- und Aldosteronspiegel, einhergehend mit erhöhtem Plasma- ACTH (mit Akkumulation von Vorläufersteroiden) und fehlender Aktivierung der Cortisol-Synthese nach ACTH- Stimulation, auch bereits nach einmaliger Dosis, belegen [65-67].

In zahlreichen *in- vitro* und *in- vivo* – Studien konnte daraufhin gezeigt werden, dass Etomidat CYP11B1 und CYP11B2 sowie CYP11A(scc) dosisabhängig hemmt. Außerdem fand sich ein schwacher inhibitorischer Effekt auf CYP17. Die stärkste inhibitorische Wirkung übt Etomidat jedoch auf die beiden CYP11B- Enzyme aus, wobei die Cortisol- Synthese bereits weit unterhalb der sedierend wirkenden Dosierung effektiv supprimiert wird. [68-71]

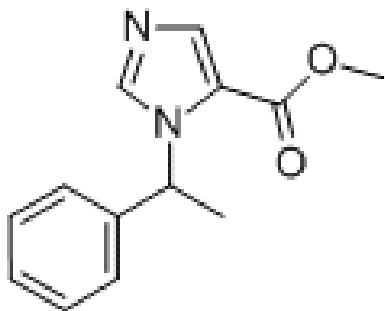


Abb. 1.3. Strukturformel Metomidat

Metomidat wurde 1965 von Janssen Pharmaceutica entwickelt und 1970 initial als Anästhetikum in der Tiermedizin eingesetzt. Es handelt sich hierbei um das Methyl- Ester- Derivat von Etomidat mit ähnlichen inhibitorischen Eigenschaften auf die Enzyme der Steroidhormonbiosynthese. [72]

1.5.2 Entwicklung selektiver Aldosteronsynthaseinhibitoren

Bereits seit Längerem ist bekannt, dass Aldosteron eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz spielt [73, 74]. Die 1999 veröffentlichte RALES- Studie konnte zeigen, dass die Blockade des Mineralokortikoidrezeptors durch Spironolacton die Morbidität und Mortalität von Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz signifikant reduziert [75]. Neben den bereits beschriebenen antiandrogenen Nebenwirkungen des Spironolactons wurde jedoch eine Korrelation zwischen dem zunehmenden Gebrauch der Aldosteronantagonisten und Hyperkaliämie- assoziierter Mortalität beschrieben [76]. Darüber hinaus könnte ein aus der Mineralokortikoidrezeptor- Blockade resultierender reaktiver Hyperaldosteronismus [77] zu einer Aktivierung Mineralokortikoidrezeptor- unabhängiger Mechanismen führen [78, 79].

Eine selektive Blockade von CYP11B2 zeigt vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der Reduktion von Morbidität und Mortalität bei herzinsuffizienten Ratten, welche zum Teil noch über die Effekte von Spironolacton hinausgehen [80]. Auch in der Behandlung des Primären Hyperaldosteronismus zeigt sich in einer klinischen Studie eine signifikante Blutdrucksenkung unter Therapie mit einem Aldosteronsynthaseinhibitor [81].

Es konnten bereits einige vielversprechende Substanzen synthetisiert werden, wobei nicht- steroidale Inhibitoren bevorzugt wurden, da diese mutmaßlich weniger Nebenwirkungen auf das endokrine System haben sollten [82-87].

1.6 Nebennierenbildgebung

Prinzipiell kann bei der Nebennierenbildgebung die funktionelle von der morphologischen unterschieden werden.

Zentraler Bestandteil der **morphologischen Bildgebung** ist das CT, vor und nach i.v. Kontrastmittel- Gabe, bzw. das MRT. Hierbei ist nicht nur die Detektion adrener Tumoren sondern vor allem auch eine Einstufung hinsichtlich der Dignität von entscheidender Bedeutung. [88] Die MRT- Bildgebung ist die

zeitlich und finanziell aufwändigere Untersuchung bei allerdings im Vergleich zum CT fehlender Strahlenbelastung, bietet jedoch hinsichtlich Spezifität und Sensitivität keinen Vorteil [89, 90]. Eine aktuelle Zusammenfassung von 38 Studien, welche insgesamt 950 Patienten beschreiben, die sich sowohl einem NNVK als auch einer CT oder MRT- Bildgebung unterzogen, zeigte, dass in 37,8% aller Fälle das Ergebnis der Schnittbildgebung nicht mit dem des NNVK übereinstimmte. Davon ausgehend, dass der technisch korrekt durchgeführte Nebennierenvenenkatheter mit sehr großer Genauigkeit eine Subtypdifferenzierung ermöglicht, wäre eine Differenzialdiagnose allein auf Basis einer bildgebenden Diagnostik damit in vielen Fällen falsch. [44]

Die im Kindesalter relativ großen Nebennieren lassen sich sonographisch noch gut darstellen. Im Erwachsenenalter ist die sonographische Darstellung bei häufiger Darmgasüberlagerung allerdings nur noch eingeschränkt möglich. [91]

Ist eine adäquate Klassifizierung adrenaler Tumoren mittels Schnittbildgebung nicht möglich, bietet die **funktionelle Bildgebung** die Möglichkeit einer weiterführenden Evaluation. Hier stehen die konventionelle planare Szintigraphie, die „single photon emission computed tomographic“ (SPECT) Szintigraphie sowie die „positron emission tomographic“ (PET) Szintigraphie zur Verfügung. Die Szintigraphie bestimmt die räumliche/ zeitliche Verteilung eines zuvor applizierten Radiopharmakons im Körper. Bei der SPECT werden gammastrahlende Radiopharmaka eingesetzt, wobei eine Gammakamera durch Rotation aus verschiedenen Winkelprojektionen planare Bilder aufzeichnet, welche dann zu Schnittbildern rekonstruiert werden. Der PET-Scanner registriert mittels Koinzidenzmessung ein Paar diametral ausgesandte Gammaquanten, welche durch Positronenzerfall entstehen. [92] Insgesamt bieten SPECT und PET die bessere räumliche Auflösung und den besseren Kontrast. Die Fusionsbildtechnik SPECT/CT bzw. PET/CT vereint funktionelle mit anatomisch detailgetreuer Information. Die SPECT ist im Vergleich zur PET weniger aufwändig und billiger, besitzt aber auch die geringere räumliche Auflösung und geringere Sensitivität der Kameras. Bei der PET kommen extrem

kurzlebige Radionuklide zum Einsatz, welche in unmittelbarer Nähe zum Scanner hergestellt werden müssen. [88, 89]

Als möglicher Tracer zur Darstellung der Nebennieren und entsprechend auch aldosteronproduzierender Tumoren wird das Cholesterol- Analogon 131I- 6-iodomethyl- 19- norcholesterol (NP- 59) eingesetzt. Dieses wird entsprechend der Ausgangssubstanz in LDL eingebunden und RAAS- bzw. ACTH- mediiert in der Nebennierenrinde eingelagert. Dabei ist die Aufnahme von NP- 59 quantitativ abhängig von der Aktivität der Steroidhormonbiosynthese. Die Detektion in den funktionell aktiven Bereichen erfolgt mittels planarer Szintigraphie, SPECT oder SPECT/CT. [90] Die mehrtägige Vorbehandlung mit Dexamethason soll dabei die physiologische ACTH- gesteuerte Aufnahme des Radio- Cholesterols unterdrücken [90, 93] Eine aktuelle Studie beschreibt für das SPECT/CT hinsichtlich des postoperativen Outcomes bzw. der histopathologischen Untersuchung eine Sensitivität von 100% bzw. 81,8% bei einer Spezifität von 53,8% bzw. 66,7% für die Detektion unilateraler Adenome. [89] Früher routinemäßig eingesetzt, ist die NP- 59 Szintigraphie aufgrund ihres erheblichen Aufwandes, der hohen Strahlendosis und der technischen Limitationen in der gängigen Praxis heute nicht mehr von Relevanz [25, 94, 95].

Als neuere Ausgangssubstanz steht Metomidat zur Verfügung, welches spezifisch an CYP11B1 und CYP11B2 bindet. Eingesetzt wird die Substanz bereits im Rahmen der ¹¹C-Metomidat-PET und ¹²³Jod-Metomidat- SPECT. [94]

2. Fragestellung dieser Arbeit

Die Differenzialdiagnose des Primären Hyperaldosteronismus (PA), vereinfacht ausgedrückt, die Unterscheidung zwischen unilateraler und bilateraler Aldosteron- Übersekretion, wird schon lange kontrovers diskutiert. Als Goldstandard in der Differenzialdiagnose gilt aktuell der selektive Nebennierenvenenkatheter. Der dieser Arbeit zugrunde liegende Gedanke ist die Entwicklung eines funktionellen Bildgebungsverfahrens zur Differenzierung zwischen unilateraler und bilateraler Form des PA. Folgende Fragestellungen wurden daher im Speziellen behandelt:

- Darstellung von derzeitiger Praxis und Limitationen in der Subtypdifferenzierung des PA anhand der Analyse von 59 in Würzburg durchgeführten Nebennierenvenenkathetern
- Eignung der Aldosteronsynthase, CYP11B2, als Ansatzpunkt für die funktionelle Bildgebung
- Entwicklung eines Testsystemes für die Evaluation von Aldosteronsynthaseinhibitoren bezüglich deren selektiver Bindung an CYP11B2
- Testung erster Aldosteronsynthaseinhibitoren und für die PET-Bildgebung geeigneter fluorierter Derivate in dem etablierten Testsystem

In diesem Zusammenhang war die zentrale Aufgabe dieser Arbeit die Etablierung einer, die humanen CYP11B Enzyme stabil exprimierenden murinen Y1- Zelllinie zur Testung der Aldosteronsynthaseinhibitoren. Eine weiterführende Evaluation der Inhibitorsubstanzen erfolgte in der humanen Nebennierenkarzinom- Zelllinie NCI- h295.

3. Material

Verbrauchsmaterialien, Lösungen, Reagenzien	
<p>β- Mercaptoethanol, Glucose, Glycin, MTT, DMSO, Orange G, Ammoniumperoxodisulfat APS 10%,</p> <p>EDTA, TD – EDTA,</p> <p>Tris- Base, PBS</p> <p>Desoxycortisol RSS, Desoxycorticosteron DOC</p>	Sigma, Deisenhofen
<p>Ethanol, Isopropanol, Methanol, Tween 20, Glycerin, Borsäure</p> <p>SDS, 10% SDS</p> <p>Caseinhydrolysat, Yeast-Extrakt, Agar, Ampicillin, Ethidiumbromid, Agarose</p>	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
GeneRuler™ DNA Ladder 1kb	Thermo Fisher Scientific, Fermentas GmbH, St. Leon- Rot
Lipofectamine, Zeocin, Trypanblau	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
ECL- Western blotting detection reagents	Amersham Biosciences, Freiburg
Filterpapier (Gel- Blotting- Papier)	A. Hartenstein, Würzburg
Nitrocellulosemembran (Hybond ECC)	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
Etomidat (Hypnomidate®)	Janssen- Cilag, Neuss, Belgien
NaCl, HCl, Bromphenolblau	Merck, Darmstadt

Acrylamid/Bisacrylamid 30%, TEMED, Magermilch (BioRad Blotting Grade Blocker Non- Fat Dry Milk)	BioRad, München
Kits	
TaqMan® Gene Expression Assays	Applied Biosystems, Darmstadt
iScript™ cDNA Synthesis Kit	BIO-RAD, München
RNeasy Mini Kit, QIAprep® Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
RIA Assay für Aldosteron	DPC Biermann, Bad Nauheim
Enzyme mit Puffer	
SynergyN™ DNA Polymerase, SynergyN™ Reaction Buffer	Genecraft, Ares Bioscience GmbH, Köln
EcoRI, ApaI, BglII, React® Buffers, T4 DNA- Ligase, Ligasepuffer	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Shrimp alkalische Phosphatase (SAP), SAP- Puffer	Thermo Fisher Scientific, Fermentas GmbH, St. Leon- Rot
Trypsin	Sigma, Deisenhofen
Plasmide, Oligonukleotide und Antikörper	
pSVL- CYP11B1/11B2- Plasmid	Prof. R. Bernhardt, Saarbrücken
pcDNA3.1(zeo)	Invitrogen, Eggenstein

Oligonukleotid- Primer	Thermo Electron GmbH, Ulm
dNTPs	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Antikörper gegen β - Actin	Sigma, Deisenhofen
Anti- rabbit Zweitantikörper	Amersham Pharmacia, Biotech, Buckinghamshire, GB
CYP11B Antikörper gegen humanes CYP11B1 und CYP11B2	Dr. H. Takemori, Osaka, Japan
Bakterien und Zelllinien	
Hitzekompetente Zellen XL10 GOLD Elektrokompetente Zellen XL1 BLUE	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
NCI- h295- Zellen	American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA
Y1- Zellen	Cell Line Service, Heidelberg
Seren, Puffer und Medien	
LB- Platten	1% Caseinhydrolysat; 0,5% Yeast- Extrakt; 0,5% NaCl; 0,1% Glucose; 1% Agar ggf. 50 μ g/ml Ampicillin
LB- Medium	1% Caseinhydrolysat; 0,5% Yeast- Extrakt; 0,5% NaCl; 0,1% Glucose; ggf. 50 μ g/ml Ampicillin
TBE- Puffer zur Gelelektrophorese	54g Tris- Base; 27,5g Borsäure; 20ml 0,5 M EDTA pH 8,0; mit H ₂ O auf 1000ml aufgefüllt (5x)
TBS- Puffer	20mM Tris- Base, 200mM NaCl, 0,05% Tween 20

RPMI 1640, fötales Kälberserum FCS, bovines Serumalbumin BSA	Invitrogen, Life Technologies, Eggenstein
Insulin, Selenium, Transferrin, DMEM/HAMS F12, DMEM, Nutrient Mixture F12 HAM	Sigma, Deisenhofen
Nu- Serum	BD Biosciences, Heidelberg
Lämmli- Puffer	10 ml Glycerin (87%); 12,5 ml Upper Tris Puffer; 30 ml 10% SDS; 5 ml β -Mercaptoethanol; Bromphenolblau; 100 ml H ₂ O
Upper Tris Puffer (4x)	2g SDS; 30,28 g Tris; 1l H ₂ O

4. Methoden

4.1 Auswertung der Patientendaten

Patientendaten wurden mithilfe einer gezielten Abfrage der Arztbriefablage ermittelt und in eine Excel- Tabelle eingefügt. Die Auswertung erfolgte ebenfalls in Excel, wobei die Daten deskriptiv als absolute und relative Werte prozentual in Bezug auf die jeweilige Ausgangsmenge angegeben wurden.

4.2 RNA- Extraktionen

Alle RNA- Extraktionen wurden nach einem modifizierten Protokoll der Firma Qiagen (RNeasy® Mini Handbook, second edition, 05/1999) durchgeführt, wobei sämtliche Reagenzien im Rneasy® Mini Kit enthalten waren.

4.2.1 RNA- Extraktion aus Zellen

Die Zellen in Suspension wurden bei 900 rpm (Megafuge 1.0R, ThermoScientific) für sieben Minuten zentrifugiert und komplett vom Überstand befreit. Anschließend wurden die Zellen sofort in 600µl des mit β -Mercaptoethanol (Endkonzentration 10µl/ml) versetzten Lysis- Puffer RLT resuspendiert. β - Mercaptoethanol führt zur Denaturierung der RNAsen. Die optimale Lyse und RNA- Ausbeute wurde durch Homogenisation (Ultra- Turrax) der Suspension für 30 Sekunden erzielt.

Anschließend wurde das Lysat auf zwei RNeasy- Zentrifugenröhrchen gegeben. In diesen Röhrchen ist eine mit Silikat- Kugeln beschichtete Membran eingelassen, die unter bestimmten Salzbedingungen RNA in einer Mindestgröße von 200 Basen binden kann.

Nach anschließendem dreimaligen Waschen mit Waschpuffern unterschiedlicher Salzkonzentrationen (700 µl Puffer RW1 und zweimalig 500 µl Puffer RPE) konnte die RNA mit RNase- freiem Wasser aus der Membranbindung eluiert werden. Der RNA- Gehalt des Eluats wurde spektrophotometrisch (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg) ermittelt und die RNA auf 250 ng/µl verdünnt.

4.2.2 RNA- Extraktion aus Gewebe

Von dem bei -80°C tiefgefrorenen Gewebe (nach Entnahme unmittelbares Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff) wurde in flüssigem Stickstoff ein idealerweise ca. 10mg schweres Stück abgeschnitten und in ein ebenfalls in flüssigem Stickstoff lagerndes Homogenisatorröhrchen gegeben. Bei humanem Tumorgewebe wurde dabei nach Möglichkeit jeweils eine Probe aus dem Tumorgewebe und der normalen Nebenniere verarbeitet. Dabei galt es, ein Auftauen des Gewebes vor Homogenisierung streng zu vermeiden. Anschließend wurden 600µl des mit β- Mercaptoethanol (Endkonzentration 10µl/ml) versetzten Lysis- Puffer RLT zugesetzt und das Gemisch sofort für 30 Sekunden homogenisiert (Ultra- Turrax). Das Lysat wurde dann bei 13000 rpm für drei Minuten zentrifugiert und der Überstand sorgfältig in ein neues Röhrchen abpipettiert. Nach Zugabe von 600 µl 70% Ethanol und sofortigem Durchmischen mit der Pipette wurde die Suspension auf ein RNeasy- Zentrifugenröhrchen gegeben und mit dem Protokoll ab 4.1.2, Absatz 2, fortgefahren.

4.3 Die Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR)

Das von K.B. Mullis eingeführte Konzept der Polymerase- Ketten- Reaktion zur Amplifikation von spezifischen DNA- Sequenzen entwickelte sich in den 80er Jahren zu einer der grundlegenden molekularbiologischen Techniken [96]. Sie dient der enzymatischen Synthese spezifischer DNA Sequenzen *in vitro*.

Zunächst muss eine doppelsträngige DNA (Matrizen- oder Template- DNA) denaturiert werden. Grundlage der Methodik sind schließlich zwei komplementäre Oligonukleotid- Primer, die jeweils in 5´ und 3´ Position an den vereinzelt DNA- Strang hybridisiert werden und damit den zu amplifizierenden Bereich flankieren. Hierdurch kann mithilfe einer thermostabilen DNA- Polymerase (z.B. Taq- Polymerase aus *thermus aquaticus*) der komplementäre DNA- Strang synthetisiert werden [97]. Eine repetitive Folge von DNA- Denaturierung, Primer- Hybridisierung und DNA- Synthese (Elongation) führt zu einer exponentiellen Akkumulation der Ziel- DNA, deren Enden durch die 5´- Enden der Primer definiert sind. [98, 99]

Durchgeführt wurden sämtliche Standard- PCR- Reaktionen in einem Thermocycler, dem Mastercycler® gradient, von Eppendorf. Alle PCRs liefen mit einem Reaktionsvolumen von 30µl (aufgefüllt mit H₂O) in einem 0,2ml Eppendorfgefäß ab. Die in Tabelle 3.1 dargestellten Materialien wurden jeweils pro Ansatz verwendet.

Synergy N (Polymerase)	0,5 µl
Synergy Puffer	3 µl
DNA (cDNA, Plasmid- DNA)	150 – 300 ng
Primer Mix (180 µl H ₂ O, 10µl Primer 1, 10 µl Primer 2)	6 µl
NTPs (jew. 10 mM)	2 µl

Tab. 4.1. Eingesetzte Volumina an Reagenzien für ein Gesamtvolumen von jew. 30µl

Die Reaktion wurde zunächst zwei Minuten bei 94° C inkubiert und durchlief dann 35x die in Tabelle 4.2 dargestellte Schleife im Thermocycler.

Denaturierung	93°C	30s
Primer- Hybridisierung	Ta	30s
Elongation	72°C	~ 1 Min. / 1000bp

Tab. 4.2. Standard- Programm für die im Thermocycler durchgeführten PCR- Reaktionen

Die Hybridisierungstemperatur (Annealing- Temperatur, Ta) richtet sich nach der Schmelztemperatur Tm des Primer- Paares. Die folgende Formel dient der orientierenden Bestimmung von Tm:

$$Tm = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

Dabei liegt das Optimum für Ta meist etwa 5 – 10 °C niedriger als Tm. [98]

Anschließend wurde der Ansatz zur finalen Elongation sieben Minuten bei 68°C inkubiert und auf 4°C gekühlt.

4.3.1 Reverse- Transkriptase (RT) PCR zur Herstellung von cDNA

Die RT PCR wurde mithilfe des iScript™cDNA Synthesis Kit (BIO- RAD) nach dem entsprechenden Protokoll durchgeführt. Das Set enthält die MMLV- (aus dem *Moloney murine leukemia virus*) RNase H⁺ (mit geringer intrinsischer RNase- H- Aktivität), Reverse Transkriptase, eine RNA- abhängige DNA- Polymerase, sowie unter anderem einen RNase Inhibitor und ein Gemisch aus Oligo- dT- und zufälligen Hexamer- Primern. Die Reaktion wurde in einem 0,2 ml Eppendorfgefäß nach dem in Tab. 4.3 dargestellten Protokoll hergestellt,

wobei mit RNase- freiem H₂O auf ein Reaktionsvolumen von insgesamt 20µl aufgefüllt wurde, und unverzüglich gemäß dem in Tab. 4.4 erläuterten Programm im Thermocycler durchgeführt.

iScript Reaction Mix	4 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
tRNA	250 ng – 1 µg

Tab. 4.3. Ansatz der iScript RT PCR mit RNase freiem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl

Primer- Hybridisierung	25 °C	5 Min.
cDNA- Synthese	42 °C	30 Min.
Inaktivierung der RT	85 °C	5 Min.

Tab. 4.4. Programm für die iScript RT PCR

Die so erhaltene cDNA wurde zunächst im Thermocycler auf 4°C gekühlt und anschließend auf eine Konzentration von 100 ng/µl verdünnt, entweder direkt für die RTq PCR weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

4.3.2 Real- time quantitative PCR (quantitative Polymerase- Ketten- Reaktion, RTq PCR)

Die RTq PCR ist die gebräuchlichste Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Es wurde hierfür das TaqMan® Prinzip angewandt. Dieses

vereint den sogenannten Fluoreszenz- Resonanz- Energie- Transfer (FRET) mit der Verwendung kommerziell erhältlicher Sonden. Diese enthalten auf einem Oligonucleotid zwei Fluorochrome: einen Reporter und einen Quencher, vorzugsweise am 5´ und am 3´ Ende. Durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge geben diese die Energie in Form von Licht einer anderen Wellenlänge wieder ab. Werden die beiden Fluorochrome schließlich durch die 5´- 3´ - Exonuclease- Aktivität der Taq- Polymerase getrennt, kann das charakteristische Emmissionsspektrum des Reporters, welches zuvor durch die räumliche Nähe zum Quencher "ausgelöscht" wurde, aufgezeichnet werden. Nach der Initiierung findet in den frühen Zyklen der PCR noch eine exponentielle und damit gut quantifizierbare Vermehrung der DNA- Fragmente statt. Grundlage für die quantitative Darstellung der eingesetzten spezifischen DNA ist daher der in diesen Zeitraum fallende C_T- Wert (C_T = threshold cycle), welcher die Zykluszahl darstellt, in der sich das Fluoreszenzsignal gerade vom Hintergrund abhebt. [99, 100]

Die Ansätze wurden gemäß des Protokolls des TaqMan® Gene Expression Assays hergestellt. Dieser vorgefertigte Assay (bereits alle relevanten Substanzen wie Nukleotide, Polymerasen, usw. enthaltend) mit spezifischem Sonden- Primer- Mix wurde bei Applied Biosystems bestellt. Die in Tab. 4.5 dargestellten Assays kamen im Folgenden zum Einsatz.

Gen	Assay Nr.	Amplifikat	Lage
CYP11B1	<i>Hs01596406_gH</i>	99 bp	exonüberspannend
CYP11B2	<i>Hs02511106_s1</i>	79 bp	Exon 9
Eukaryotische 18s rRNA	<i>Hs99999901_s1</i>	187 bp	-

Tab. 4.5. Bei Applied Biosystems kommerziell erworbene Assays mit Gen- spezifischem Sonden- Primer- Mix

Die Analyse wurde in einer 96- Well Platte jeweils in Duplets durchgeführt. Hierbei wurden immer etwa 250ng cDNA der verschiedenen Zell-, Tumor- und Gewebeproben eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten H₂O und cDNA aus menschlicher Leber, Niere und Testes. Für jeden Assay wurde zur Erstellung einer Standardkurve ein spezieller Standard hergestellt (100µg/µl cDNA). Als Standard für CYP11B2 kam gepoolte cDNA aldosteronproduzierender Tumoren, für CYP11B1 gepoolte cDNA aldosteron- und cortisolpoduzierender Tumoren, zum Einsatz. Als Standard für den 18s Assay diente cDNA aus Leukozyten. Der erste Standard enthielt die cDNA in einer 1:100- Verdünnung, die weiteren vier dann als Verdünnungsreihe mit 1:10 Verdünnung.

Es wurde nach dem in Tab. 4.6 dargestellten Pipettierschema ein Gesamtvolumen von 25µl pro Well angesetzt.

TaqMan® Universal PCR Master Mix	12,5 µl
Gene Expression Assay Mix	1,25 µl
cDNA (50 ng/µl)	5 µl
H ₂ O RNase- frei	6,25 µl

Tab. 4.6. Eingesetzte Volumina an Reagenzien für jeweils 25 µl Gesamtvolumen

Die Experimente wurden durchgeführt in einem iCycler Thermocycler (BioRad, München) nach dem in Tab. 4.7 dargestellten Programm.

Initiierung		Für jeden der 50 Zyklen	
		Denaturierung	Annealing/Elongation
2 Min. 50°C	10 Min. 95°C	15s 95°C	1 Min. 60°C

Tab. 4.7 Programmierung des iCycler Thermocyclers

Die Auswertung der Daten erfolgte vollautomatisch mithilfe des iQ Real Time Detection- Systems. Dies geschah durch Erstellung einer Standardkurve, welche die möglicherweise unterschiedliche Effizienz der beteiligten PCR-Reaktionen als Variable ausschließt [101]. Grundlegend hierfür ist die lineare, umgekehrte Beziehung zwischen der eingesetzten Menge des Zielgenes und dem C_T Wert [102]. Zum Ausgleich von Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten mRNA wurde eukaryontische 18s rRNA als Referenzgen eingesetzt. Diese sogenannte Normierung erfolgt, indem man die Ausgangsmenge an Zielgen durch die Ausgangsmenge an Referenzgen dividiert. [101, 103] Bei fehlender Kenntnis der genauen Ausgangsmenge der in den Standard- Proben enthaltenen cDNA dient das Ergebnis dann der relativen Quantifizierung.

4.4 Klonierung eines Vektors

4.4.1 Elektrotransformation von Plasmiden zur Konservierung und Weiterverarbeitung

Die zur Klonierung eingesetzte cDNA von CYP11B1 und CYP11B2, nach der von Bechtel *et al.* publizierten Sequenz [104-107], lag jeweils als Plasmid in dem pSVL- Vektor (Pharmacia Biotech Inc.), mit durch den SV40- Promotor niedriger Transkriptionsrate, in relativ geringer Ausgangsmenge vor [104]. Aus diesem Grunde erfolgte vor der weiteren Verarbeitung zunächst eine Elektrotransformation der Plasmide.

4.4.1.1 Elektrotransformation von Bakterienzellen

Zur Vervielfältigung wurden die Plasmide zunächst in XL1 BLUE- Zellen transformiert. Dieser kommerziell erhältliche elektrokompetente E.coli- Stamm wurde bei -80 °C gelagert und für die Transformation auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 20µl Bakterienzellen in ein ebenfalls auf Eis lagerndes 0,2ml Eppendorfgefäß überführt und mit 2µl des zu transformierenden Plasmids durch Pipettieren sorgfältig vermischt. Zur Anlagerung des Plasmids an die Zellwand der Bakterien wurde das Gemisch für eine Minute auf Eis inkubiert und anschließend in eine eisgekühlte Elektrotransformations- Küvette überführt. Die Transformation wurde in einem Eppendorf Elektroporator mit einem 5ms dauernden Spannungspuls von 2,5kV bei 200Ω und 25µF, welcher eine temporäre Permeabilitätssteigerung der Zellmembran zur Aufnahme des Plasmids bewirkt, durchgeführt. Das Transformations- Produkt musste nun schnell mit 1ml LB- Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37 °C und 225 – 250 rpm in einem Schüttler (Edmund Bühler) belassen werden. [108] Die Bakterien wurden danach auf LB- Platten mit Ampicillin ausgestrichen, um die Kolonien zu selektionieren, welche den pSVL- Vektor mit dem Ampicillin- Resistenz- Gen aufgenommen hatten.

4.4.1.2 Plattenkulturen

Gemäß des Resistenzprofils des pSVL- Vektors wurde dem LB- Agar im Anschluss an das Sterilisieren im Autoklaven nach Abkühlung auf eine Temperatur von 60°C pro 500ml 25mg Ampicillin hinzugefügt. Zum Erhalt eines Vereinzlungsausstriches wurden die Bakterien nach der Elektrotransformation auf dem nun vollständig erkalteten, Ampicillin enthaltenden LB- Agar- Nährboden ausgestrichen. Die Platten wurden dann invertiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien auf Flüssigkulturen übertragen.

4.4.1.3 Flüssigkulturen

Zur Konservierung oder Weiterverarbeitung wurden zunächst einzelne Bakterienkolonien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und Kulturen in 3ml LB- Flüssigmedium angeimpft, wobei der Zahnstocher in der Kultur verblieb. Analog der Herstellung antibiotikahaltiger LB- Platten enthielt dieses Medium zur Selektionierung ebenfalls Ampicillin in einer Konzentration von 50 µg/ml. Die Flüssigkulturen wurden schließlich bei 37°C und 225 – 250 rpm für 12 – 16 Stunden im Schüttler inkubiert.

4.4.1.4 Glycerinkulturen

Um eine Bakterien- Dauerkultur zu erhalten, wurde aus einer der 3ml Flüssigkulturen eine 40%ige Glycerinkultur angelegt, welche bei -20°C in sterilen Dauerkulturröhrchen aufbewahrt wurde. Die Bakterien sind unter den angegebenen Bedingungen für mehrere Jahre haltbar. Um sie weiter zu verarbeiten ist mit 500 – 1000µl der Glycerinkultur eine neue Flüssigkultur wie oben beschrieben anzuimpfen.

4.4.1.5 Lyse der transformierten Bakterienzellen

Zur Gewinnung einer nukleinsäurehaltigen Lösung aus einer Flüssigkultur und um die Plasmide damit der Weiterverarbeitung zugänglich zu machen, galt es zunächst die Bakterienzellen in der Flüssigkultur zu lysieren und die darin enthaltenen Nukleinsäuren aufzureinigen. Dies erfolgte mithilfe des QIAprep® Miniprep Kits von Qiagen gemäß des entsprechenden Protokolls (QIAprep® Miniprep Handbook, second edition, Nov. 2005). Prinzipiell unterteilt sich das Protokoll in drei Schritte: Die Lyse der Bakterienzellen, die Adsorption der DNA an eine Membran und die Elution der adsorbierten DNA um diese wieder in Lösung zu bringen.

Für die initiale **Lyse der Bakterienzellen** bedient sich das QIAprep® Miniprep Protokoll der modifizierten alkalische Lyse nach Birnboim und Doly [109]. Hierfür wurde die Hälfte einer 3ml Flüssigkultur in ein 1,5ml Eppendorfgefäß pipettiert und zwei Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen, der Rest der Flüssigkultur zugegeben und wieder zwei Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Nach erneutem vorsichtigem Abgießen des Überstandes wurde mit 250 µl Puffer P1 (nach vorheriger Zugabe von RNaseA) resuspendiert. Danach wurden 350 µl Puffer P2 zugegeben und das Eppendorfgefäß sofort 4 – 6 x vorsichtig invertiert. Nach anschließender Zugabe von 350µl Puffer N3 und Eintrüben der Lösung wurde nochmals mehrfach invertiert und dann 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin direkt auf die QIAprep®- Membran einer im Set enthaltenen Säule pipettiert.

Zur **Adsorption der DNA** wird sich einer speziellen Silica- Membran bedient. Die Plasmid- DNA wird in salzreichem Puffer selektiv adsorbiert und kann mit salzarmem Puffer wieder eluiert werden. Das beladene Säulchen wurde nun eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und die Flüssigkeit abgegossen. Zelluläre Proteine, RNA und Metaboliten werden in der Membran nicht zurückgehalten. Nach Zugabe von 750µl Puffer PE (welcher zuvor gemäß der Angabe des Herstellers mit 100%igem Ethanol versetzt wurde), erneutem Zentrifugieren und Abgießen der Flüssigkeit wurde nochmals abschließend eine Minute bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert.

Zur **Elution der aufgereinigten Plasmid- DNA** wurde das Säulchen dann in ein 1,5ml Eppendorfgefäß gegeben. Nach Zugabe von 50µl doppelt destilliertem H₂O und einminütigem Belassen bei Raumtemperatur wurde erneut für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Die somit in dem Eppendorfgefäß aufgefangene, aufgereinigte Plasmid- DNA konnte nun weiter verarbeitet werden.

4.4.2 Amplifikation der DNA mit Einbau geeigneter Restriktionsstellen

4.4.2.1 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Konzentration von nukleinsäurehaltigen Lösungen wurde durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260nm (BioPhotometer plus, Eppendorf) ermittelt. Hierbei werden die gemessenen Extinktionswerte direkt über das Gerät mittels spezifischer Faktoren in Konzentrationswerte umgerechnet. Dabei entspricht eine A260-Einheit einer Nukleinsäure-Konzentration von 50µg/ml für doppelsträngige DNA, 40µg/ml für RNA, 37 µg/ml für einzelsträngige DNA und 30µg/ml für Einzelstrangoligonukleotide.

4.4.2.2 PCR zur Amplifikation der DNA

Zur Amplifikation der in den pcDNA3.1zeo- Vektors zu klonierenden cDNA-Fragmente für CYP11B1 und CYP11B2 wurde eine PCR nach dem unter 4.3 genannten Protokoll durchgeführt. Als Template wurden jeweils 3µl der pSVL-CYP11B1 und pSVL-CYP11B2 Plasmide eingesetzt (c ~ 60 ng/µl).

Die in Tab. 4.8 dargestellten Oligonukleotide wurden als Primer synthetisiert.

CYP11B1	3´	5´- TATT GAATTC TTAGTTGATGGCTCTGAAGGTGAGGAG – 3´
	5´	5´- TATT GAATTC ATGGCACTCAGGGCAAAGG – 3´
CYP11B2	3´	5´- TATT GAATTC CCTAGTTAATCGCTCTGAAAGTGAGGA – 3´
	5´	5´- TATT GAATTC ATGGCACTCAGGGCAA – 3´

Tab. 4.8 Bei ThermoElectron bestellte Oligonukleotide als PCR Primer mit Restriktionsstellen für EcoRI

Analog der im pcDNA3.1zeo(+)- Vektor vorhandenen Restriktionsschnittstellen wurden die Basen **GAATTC** als Schnittstelle für des Restriktionsenzym EcoRI, sowie vorgeschaltet einige beliebige zusätzliche Basen, die für die Wirksamkeit des Enzyms vonnöten sind, angefügt. Die ermittelte Schmelztemperatur der Primer lag zwischen 63 und 67°C. Die Länge der cDNA- Fragmente für CYP11B1 und CYP11B2 liegt bei 1512 bp. Folgende variablen Parameter wurden für die PCR- Reaktion gewählt:

Ta (Annealing- Temperatur): 60°C

Elongationszeit: 5 Minuten

Ein Aliquot (5- 10 µl) der PCR wurde auf einem 1%igen Agarosegel (siehe Kapitel 4.4.3.3) analysiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der PCR-Produkte.

4.4.2.3 Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurden 1,5 g Agarose in 150ml TBE- Puffer (Tris- Borat- EDTA- Puffer) aufgeköcht, nach Abkühlen auf ca. 60 °C mit 4µl Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) versetzt und in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Für 1%ige Agarose in TBE- Puffer liegt der Trennbereich zwischen 250 und 7000 bp [110]. Zur Darstellung des Gellaufs und als Laufpuffer wurde Orange G (6x) verwendet, wobei jew. 5µl DNA- Lösung mit 1µl Orange G versetzt und gut vermischt wurden. Die so in Orange G aufgenommene DNA wurde sorgfältig in die Gelkammern pipettiert (jew. 3 – 5 µl) und in einer Joule Box™ (120 VAC; 0,8 A; 50/60 Hz) elektrophoretisiert. Zur Identifikation des gewünschten DNA- Fragments mittels Größenbestimmung wurde eine entsprechende DNA- Leiter mit elektrophoretisiert. Nach der

Elektrophorese konnte die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA unter UV- Licht visualisiert und fotografiert werden (Kodak IBI Quickshooter).

4.4.2.4 Aufreinigung von Nukleinsäuren über ein „PCR Purification-Kit“

Zur direkten Aufreinigung von PCR- Produkten bzw. zur Aufreinigung der DNA aus Agarosegelen wurde der „GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ und das entsprechenden Protokoll (Amersham Biosciences, 2004) verwendet. Hierbei werden mittels einer chaotropen Substanz Proteine denaturiert, Agarose zersetzt und mithilfe spezifischer Bindung von Doppelstrang- DNA Primer und Oligonukleotide ausgewaschen.

Zur **Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen** wurde die entsprechende Gel-Bande unter der UV- Lampe mit einem sauberen Skalpell möglichst exakt ausgeschnitten, in ein leeres 1,5ml Eppendorfgefäß gegeben und gewogen. Je 10mg Gel wurden 10mg Bindungspuffer hinzu gegeben. Das verschlossene Gefäß wurde anschließend durch vortexen gut gemischt und auf dem Thermoblock auf 60 °C erhitzt, bis sich die Agarose vollständig in Lösung befand (etwa 5 – 10 Minuten). Nach kurzem Zentrifugieren bei höchster Drehzahl wurde die Lösung auf ein in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß gestelltes GFX Säulchen pipettiert und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde für eine Minute bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert und das Eppendorfgefäß geleert. Nach Zugabe von 500µl Waschpuffer (zuvor mit 48ml 100% Ethanol versetzt) auf das Säulchen wurde erneut für eine Minute bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Säulchen wurde daraufhin in ein frisches 1,5ml Eppendorfgefäß gestellt und 50µl H₂O direkt auf dessen Glasfibernmatrix pipettiert. Es wurde erneut bei Raumtemperatur für eine Minute inkubiert und anschließend nochmals eine Minute bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert um die aufgereinigte DNA in dem Eppendorfgefäß aufzufangen.

Zur **Aufreinigung von PCR- Produkten** wurden diese (mit einem Volumen von maximal 100µl) direkt auf ein sich in einem 1,5ml Eppendorfgefäß befindliches Sälchen gegeben, mit 500µl Bindungspuffer versetzt und durch vorsichtiges Pipettieren vermischt. Nach anschließendem Zentrifugieren für 30 Sekunden bei voller Geschwindigkeit wurde das Protokoll wie oben beschrieben mit der Zugabe des Waschpuffers weiter befolgt.

Die so gewonnene DNA- Lösung wurde nach Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration entweder bei -20°C konserviert oder direkt weiter verarbeitet.

4.4.3 Präparieren von Vektor und DNA- Insert

4.4.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Sowohl das amplifizierte und über Gelelektrophorese aufgereinigte DNA- Insert als auch der pcDNA3.1zeo- Vektor wurden für die Ligation mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten.

Alle Restriktionsspaltungen wurden jeweils mit einem Reaktionsvolumen von 20 µl und mit einer DNA- Konzentration von maximal 0,5µg/µl durchgeführt. Die Reaktionsdauer betrug zwei Stunden bei 37°C, wobei jeweils 2U des Enzyms pro µg DNA eingesetzt wurden. Entsprechend der Herstellerangaben wurden Menge und Art des Reaktionspuffers gewählt. Von Vektor und Insert wurden so jeweils 2 – 4 Ansätze gleichzeitig verdaut und anschließend gepoolt. Verdäue mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen (siehe Kap. 4.4.6) wurden mit beiden gleichzeitig durchgeführt.

Nach dem Verdau wurden sämtliche Reaktionsprodukte zunächst einer Sälchenaufreinigung, wie oben beschrieben, unterzogen.

4.4.3.2 Dephosphorylierung von 5´ Enden des Vektors

Wenn der Vektor mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten wurde, besteht das Risiko der Bildung von Religanden. Aus diesem Grunde muss vor Durchführung der eigentlichen Ligation die Entfernung von Phosphatgruppen am 5´-Ende des linearisierten Vektors, welche für eine Ligation benötigt werden, durch die alkalische Phosphatase aus arktischen Garnelen (*P. borealis*) erfolgen. Eine Ligation mit dem gewünschten Insert kann aufgrund der hier noch vorhandenen Phosphatreste weiterhin gelingen. [111] Der in Tab. 4.9 dargestellte Reaktionsansatz mit einem Reaktionsvolumen von 20µl wurde für 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

Vektor DNA	~1 µg
SAP- Puffer	2 µl
Alkalische Phosphatase	5 µl

Tab. 4.9. Eingesetzte Volumina an Reagenzien für jeweils 20µl Gesamtvolumen (aufgefüllt mit H₂O)

Zur kompletten Inaktivierung wurde die alkalische Phosphatase 15 Minuten auf 65°C erhitzt (gemäß den Herstellerangaben, ThermoScientific) und alle Reaktionsansätze wie oben beschrieben über Säulchen aufgereinigt und für die anschließend zu erfolgende Gelaufreinigung wieder gepoolt.

4.4.3.3 Aufreinigung der DNA im Agarosegel

Der linearisierte und dephosphorylierte Vektor und das geschnittene cDNA-Insert wurden nun einer Aufreinigung mittels Gelelektrophorese, wie oben beschrieben, unterzogen, um Nebenprodukte der Enzymreaktion und überflüssige DNA- Fragmente und Nukleinsäuren zu entfernen.

Die jeweiligen, anhand ihrer Größe identifizierten, DNA- Banden im Gel wurden nach der Aufreinigung gepoolt und die Konzentration der Lösung bestimmt.

4.4.4 Ligation von DNA- Fragmenten mit Vektoren

Die Ligation des pcDNA3.1zeo- Vektors mit der cDNA für CYP11B1 und CYP11B2 wurde durch das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert. Hierfür wurden 50 ng Vektor- DNA mit einem 5-10fachen molaren Überschuss des zu ligierenden Fragments in 20µl Reaktionsvolumen mit 4µl 5x Ligationspuffer und 1U der T4-DNA-Ligase über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ligationsansatz ohne weitere Aufreinigung zur Hitzetransformation kompetenter Bakterienzellen eingesetzt.

4.4.5 Hitzetransformation von Bakterienzellen

Zur Hitzetransformation wurden die bei -80 °C aufbewahrten kompetenten XL10 GOLD- Zellen zunächst auf Eis aufgetaut. Die Transformation wurde analog des entsprechenden Herstellerprotokolles durchgeführt (XL10-Gold® Ultracompetent Cells, Stratagene, 2004). Nach Zugabe von 4µl des im Set enthaltenen β- Mercaptoethanol- Mix wurde die Zellsuspension 10 Minuten auf Eis inkubiert und dabei alle zwei Minuten durch Pipettieren vorsichtig gemischt. Anschließend wurden 2µl des Ligationsansatzes zu jeweils 100µl Bakterienzellen zugegeben und nach vorsichtigem Durchmischen nochmals 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte der Hitzepuls in dem auf 42°C vorgewärmten Wasserbad für exakt 30 Sekunden, wonach sofort wieder für

zwei Minuten im Eisbad abgekühlt wurde. Nach Zugabe von 900 µl, auf 42 °C vorgewärmtem, LB- Medium ohne Selektionsantibiotika wurden die Bakterien dann für eine Stunde bei 37°C mit 225-250 rpm geschüttelt. Die Bakterien wurden anschließend zentrifugiert, mit wenig LB- Medium resuspendiert und, entsprechend dem Resistenzgen des pcDNA3.1zeo – Vektors auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.4.6 Kontrollverdau und Sequenzierung

Von den auf der Agarplatte entstandenen Kolonien wurde jede mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und damit sowohl eine LB- Platte als auch eine Flüssigkultur, jeweils versetzt mit Ampicillin, angeimpft. Die angeimpfte LB- Platte wurde im Kühlschrank aufbewahrt und aus der Flüssigkultur, wie oben beschrieben, mittels Miniprep die Plasmid- DNA isoliert. Diese wurde dann mit jeweils einem im Vektor und asymmetrisch im Insert schneidenden Restriktionsenzym verdaut. Mithilfe der anschließenden Gelelektrophorese konnte schließlich anhand der Größe der Bande für das ausgeschnittene Insert zum einen der Erfolg der Ligation generell kontrolliert werden und zum anderen, ob das cDNA- Fragment auch in der richtigen Richtung in den Vektor kloniert wurde.

Entsprach eine Gelbande der bei erfolgreicher Klonierung zu erwartenden, wurde eine Probe des isolierten Plasmids zur Sequenzierung verschickt.

Außerdem wurde der entsprechende Bakterienklon von der analytisch angeimpften LB- Platte gepickt und in Flüssigkultur amplifiziert, aufgereinigt, in Glycerinkultur konserviert sowie auf einer neuen LB- Platte zur Konservierung ausgestrichen.

4.5 Zellkulturtechniken

Sämtliche nachfolgend beschriebene Zellkulturmethoden wurden unter sterilen Bedingungen an einer Flow- Hood (MSC-Advantage, Thermo Scientific) durchgeführt. Alle Zellkulturen wurden in sensorgesteuerten Brutschränken bei 37°C mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100% und einem definierten CO₂ Gehalt von 5% in Zellkulturschalen bzw. -flaschen gezüchtet. Verwendete Medien und Lösungen wurden durch steriles Abfüllen keimfrei gehalten, autoklaviert bzw. im Falle von hitzelabilen Reagenzien steril filtriert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl adhärenente, am Boden der Schale haftende Zellen, als auch Suspensionszellen verwendet.

Durch die hohe Stoffwechselaktivität der verwendeten Zellen werden die Inhaltsstoffe des Mediums durch die Zellen schnell metabolisiert und das Medium durch die Abfallprodukte angesäuert, was zu einem Farbumschlag von rötlich nach gelb führt.

Alle 2–3 Tage wurde daher das verbrauchte Medium entfernt und durch frisches ersetzt. Hierbei wurde jeweils ca. 1/3 des alten Medium belassen, um z.B. autokrin produzierte proliferationsfördernde Zytokine und Wachstumsfaktoren zu erhalten.

Wenn die Zellen zum Zeitpunkt des Mediumwechsels entsprechend dicht gewachsen waren, wurden sie im Verhältnis 1:3 gesplittet, das heißt die Zellen einer Schale oder Flasche wurden auf drei neue verteilt. Hierfür mussten die adhärenenten Zellen zunächst mit dem Enzym Trypsin vom Untergrund abgelöst werden. Nach Abpipettieren des Mediums wurde der Zellrasen zunächst mit PBS gewaschen und danach für maximal 2–3 Minuten bei 37°C, entsprechend des Wirkmaximums des Enzyms, mit Trypsin inkubiert. Anschließend wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt, um eine Zerstörung der Zellen zu verhindern. Diese wurden dann wieder mit frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden danach auf drei frische Gefäße gleicher Größe überführt und im bereits vorgelegten Medium gleichmäßig verteilt. Suspensionszellen wurden sowohl zum Mediumwechsel

als auch zum Splitten zunächst zentrifugiert. Bei den adhärennten Zellen wurde ein Drittel des alten Mediums belassen und die Zellen nach Resuspension in eine oder mehrere Zellkulturflaschen mit vorgelegtem Medium verteilt.

4.5.1 Y1- Zellen

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine adhärennt wachsende, hormonproduzierende Nebennierenkarzinomzelllinie der Maus. Die Etablierung erfolgte 1966 durch Yasumura *et al.* [112]. Die Zelllinie stammt von dem sehr differenzierten Tumor einer adulten, männlichen LAF1 (C57L x A/HeJ) Maus ab. Viele Enzyme der Steroidbiosynthese fehlen in dieser Zelllinie, so liegen auch die Expressionslevel der murinen CYP11B- Enzyme unter der Nachweisgrenze. Dennoch zeigen die Zellen viele Nebennierenrinden- spezifische Eigenschaften, weisen hochaffine Rezeptoren für ACTH und Angiotensin II auf und produzieren eine Vielzahl an Steroidhormonen [113-115].

Y1- Zellen wuchsen in definiertem DMEM- Medium mit fötalem Kälberserum (FCS) 10%. Im Falle der stabil transfizierten Y1- CYP11B1 und Y1-CYP11B2 Zelllinien wurde noch Zeocin als Antibiotikum zur Selektion in einer definierten Konzentration, wie im Folgenden beschrieben, hinzugefügt. Für die Experimente wurde der Gehalt an FCS auf 2% reduziert.

4.5.2 NCI- h295 Zellen

Die NCI- h295 Zellen stellen eine stabile humane Nebennierenkarzinomzelllinie dar. Sie wurden 1980 aus dem später metastasierenden Nebennierenrindenkarzinom einer 48jährigen schwarzen Patientin mit Glukokortikoid-, Mineralokortikoid- und Androgenexzess isoliert [116]. Hierbei handelt es sich um differenzierte Zellen, welche zur Synthese des für die Steroidbiosynthese benötigten Cholesterols befähigt sind [116]. NCI-h295 Zellen synthetisieren nahezu alle für die adrenale Steroidbiosynthese relevanten Enzyme, einschließlich CYP11B1 und CYP11B2 und mehr als 30

verschiedene Steroide, einschließlich Cortisol, Aldosteron, Androstendion und Dehydroepiandrosteronsulfat [116-118]. Die Produktion von Aldosteron ist über physiologische Stimuli wie Angiotensin II und extrazelluläres Kalium reguliert, weshalb diese Zelllinie unter anderem als geeignetes Model der Glomerulosazelle gilt [117, 119-122].

Die NCI- h295 Populationen weisen eine relativ lange Verdoppelungszeit von >96h auf und sind als adhärenente und Suspensionszellen erhältlich [119]. Für diese Arbeit wurden beide Typen verwendet.

Die adhärenent wachsenden NCI- h295 Zellen wuchsen als Monolayer in 250ml Zellkulturflaschen in definiertem DMEM/Ham´s F12- Medium mit 15mM HEPES. Als Zusätze wurden Insulin (6,25 µg/ml), Transferrin (1 mg/ml), Selenium (6,4 ng/ml), bovines Serumalbumin BSA (1,25 mg/ml) und Nu- Serum 2,5% ergänzt.

Die Suspensionszellen wuchsen in 750ml Zellkulturflaschen in RPMI 1640 Medium mit Transferrin (0,1mg/ml), Insulin (5µg/ml), Selenium (5,2µg/ml) und fötales Kälberserum FCS 5%.

Auch in dieser Zelllinie wurde für die Experimente der Gehalt an FCS auf 2% reduziert.

4.5.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzählungen wurden mithilfe der Trypanblau- Färbung in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Bei Trypanblau handelt es sich um einen Azofarbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Der Farbstoff kann selektiv nur in tote Zellen eindringen, deren Membran durchlässig geworden ist. Vitale Zellen stellen sich im Mikroskop leuchtend hell dar. [123]

Die Zellen einer Zellkulturflasche wurden, nach Abtrypsinisieren und erneuter Aufnahme in Medium im Falle von adhärenenten Zellen, zunächst zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen, um ein Anfärben der darin enthaltenen Proteine durch Trypanblau zu vermeiden, mit 5 ml PBS- Puffer gewaschen und

anschließend mit 2ml PBS Puffer resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 500 µl in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 500µl Trypanblau vermischt. Nach Inkubation für maximal zwei Minuten wurde genau so viel der Lösung an das gereinigte und dicht aufliegende Deckglas pipettiert, bis sich die gesamte Kammer durch Kapillarkräfte gefüllt hatte.

Zur Zellzahlbestimmung wurden die vitalen Zellen in vier großen (bestehend aus jeweils 16 kleinen), einander gegenüberliegenden Quadraten gezählt. Es wurde der Mittelwert (Z) an Zellen in einem großen Quadrat ermittelt und die Zellkonzentration nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Gesamtzahl der Zellen}/\mu\text{l} = Z \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10^4$$

4.6 Herstellung einer stabil transfizierten Zelllinie

4.6.1 Ermittlung der optimalen Antibiotikakonzentration zur Selektion

Um die, mit dem pcDNA3.1zeo- CYP11B1/CYP11B2 Vektor stabil transfizierten Zellen analog des auf dem Vektor vorhandenen Resistenzgens für Zeocin zu selektionieren, musste hierfür zunächst die geeignete Antibiotikakonzentration ermittelt werden. Diese ergibt sich aus der niedrigsten Konzentration, bei der zwar alle Zellen, die keine Resistenz in Form des transfizierten Vektors tragen absterben, die erfolgreich transfizierten Zellen jedoch nicht unnötig belastet werden. Hierfür wurde die niedrigste Antibiotikakonzentration im Kulterumedium ermittelt, bei der nach vier bis fünf Tagen die überwiegende Mehrzahl der Zellen in einer Kulturschale abgestorben waren und sich vom Schalenboden abgelöst hatten. Die Y1- Zellen wurden in 6- Well- Kulturplatten mit einer Konfluenz von ca. 50% in serumhaltigem Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Antibiotikum Zeocin in verschiedenen Konzentrationen hinzu gegeben. Aus der Zahl der abgestorbenen Zellen ergab sich dann die optimale Antibiotikakonzentration von 1000 µg/ml.

4.6.2 Kationische Liposomenkomplexe zur Transfektion eukaryotischer Zellen

Bei der Lipofektion wird genetisches Material mithilfe von Liposomen, die sehr leicht mit der Zellmembran fusionieren, in die Zelle eingebracht. Lipofectamine stellt ein kommerziell erhältliches, kationisches Lipid- Reagenz dar, welches in wässrigen Lösungen kleine unilaminare Vesikel (Liposomen) bildet, deren Oberfläche positiv geladen ist. Diese werden sowohl vom Phosphat- Rückgrat der DNA als auch von der negativ geladenen Oberfläche der Zellmembranen elektrostatisch angezogen. Auf diese Weise tritt die zu transfizierende Plasmid-DNA über Liposomen mit der Zielzellmembran in Kontakt und wird, verpackt in Endosomen, in das Zellinnere geschleust. [124, 125]

Die Transfektionen mit Lipofectamine wurden analog des Herstellerprotokolles (Invitrogen, 2000) durchgeführt. Das folgende Protokoll wurde zur Herstellung der Y1- CYP11B1 Zelllinie und analog auch für die Y1- CYP11B2 Zelllinie verwendet.

Zunächst wurden die Y1- Zellen einer sehr dicht bewachsenen Zellkulturflasche im Verhältnis 1:8 gesplittet und in 10ml antibiotikafreiem Medium aufgenommen. In jeweils drei Zellkulturflaschen wurden 10ml Medium und in jeweils zwei 6-Well- Platten (BD, Primaria™) pro Well 2ml Medium vorgelegt. Von der Zellsuspension wurden pro Zellkulturflasche 1,5ml und pro Well 150µl zugegeben, gleichmäßig verteilt und über Nacht im Brutschrank belassen.

Am folgenden Morgen wurden die nun adhärennten Zellen morgens mit Medium ohne FCS oder Antibiotika zweimal gewaschen. In den Flaschen wurden dann 0,8ml und in den Wells 6,4ml dieses Mediums bis zur Transfektion belassen. Auch zur Vorbereitung des Transfektionsansatzes wurde serumfreies Medium verwendet, da manche Serumproteine die Bildung von DNA- Liposomen-Komplexen beeinträchtigen.

Anschließend wurde in 1,5ml Eppendorfgefäßen die Plasmid- DNA, wie in Tabelle 4.10 dargestellt, vorbereitet.

	CYP11B1		CYP11B2		
Pro	Klon 8 (90 ng/μl)	133 μl	Klon 1 (130 ng/μl)	92,3 μl	jew. + 800 μl sfM
Flasche	Klon 11 (150 ng/ μl)	80 μl	Klon 11 (130 ng/ μl)	92,3 μl	
Pro	Klon 8 (90 ng/μl)	16,6 μl	Klon 1 (130 ng/μl)	11,5 μl	jew. + 100 μl sfM
Well	Klon 11 (150 ng/ μl)	10 μl	Klon 11 (130 ng/ μl)	11,5 μl	

Tab. 4.10. Für die pcDNAzeo- CYP11B1 und –CYP11B2 Plasmide wurden für jeden Klon jeweils Ansätze zur Aussaat in einer Flasche und 5 Wells mit der dargestellten Menge an Plasmid- DNA und serumfreiem Medium (sfM) hergestellt.

Das Lipofectamine wurde wie folgt vorbereitet:

Pro Flasche 100μl Lipofectamine in 800μl serumfreiem Medium

Pro Well 10μl Lipofectamine in 100μl serumfreiem Medium

Plasmid- DNA und Lipofectamine wurden gevortext und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid- DNA beider Klone für CYP11B1 und CYP11B2 jeweils als ein Transfektionsansatz pro Flasche und fünf Wells mit dem Lipofectamine vereinigt. Dieser Transfektionsmix wurde lediglich durch leichtes Anschnippen vermischt und erneut 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert um die Bildung der DNA- Liposomen- Komplexe zu ermöglichen.

Zu den bereits am Morgen vorbereiteten Y1- Zellen wurden pro Well 200μl und pro Flasche 1,6ml Transfektionsmix pipettiert. Als Kontrolle wurden eine Flasche und pro 6- Well- Platte ein Well ohne Zugabe des Transfektionsmix belassen. Zum Vermischen wurden die Platten und Flaschen vorsichtig geschwenkt. Die Zellen wurden dann über Nacht bei 37°C bebrütet.

Früh am nächsten Morgen erfolgte ein Mediumwechsel mit regulärem Y1-Kulturmedium, wobei pro Flasche 10ml und pro Well 2ml Medium zugegeben wurden.

Mit der Selektion wurde 48 Stunden nach Transfektion (Tag drei) begonnen. Entsprechend der unter 4.6.1 ermittelten optimalen Antibiotikakonzentration von 1000µg/ml wurde analog der Resistenzkassette des transfizierten Vektors die entsprechende Menge Zeocin zugegeben. Ein erneuter Mediumwechsel unter Zugabe von Zeocin erfolgte wieder an jedem zweiten Tag, entsprechend Tag fünf, sieben, neun u.s.w..

4.6.3 Vereinzlung selektionsresistenter Zellen

Ab Tag 15 konnten die ersten Kolonien unter dem Mikroskop identifiziert und isoliert werden. Um die auf einer 6- Well- Zellkulturschale gewachsenen resistenten Klone zu vereinzeln, wurden diese zunächst unter dem Mikroskop auf der Zellkulturschale mit einem Stift kreisförmig markiert. Dann wurde das Medium abgenommen, mit PBS vorsichtig gespült und pro Well 1 ml TD- EDTA hinzugegeben und zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Klone wurden dann einzeln mit der Pipette aufgesaugt und jeder Klon in ein separates Well einer vorher beschrifteten 24- Well- Platte mit bereits vorgelegtem Zeocin- haltigen Medium überführt. Bei geeigneter Zelldichte wurden die Zellen in 6- Well- Platten bzw. 10 und 20 cm Zellkulturschalen und schließlich in Zellkulturflaschen weiter kultiviert.

4.6.4 Lagerung von eukaryotischen Zellen

Zum Einfrieren wurden Zellen verwendet, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die Zellen einer Zellkulturflasche wurden abtrypsinisiert und durch Zentrifugation pelletiert. Das Zellpellet wurde in 2ml eines 1:1- Gemisches aus Medium (DMEM) und Einfriermedium (10% DMSO, 20%FCS, 70% serumhaltiges Zellkulturmedium) durch vorsichtiges Pipettieren

aufgenommen und in 1ml Aliquots steril in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden zunächst eine Stunde bei -20°C gekühlt, über Nacht bei -80°C gelagert und dann am darauffolgenden Tag in flüssigen Stickstoff transferiert und bis auf Weiteres entsprechend gelagert.

Um die eingefrorenen Zellen später wieder in Kultur zu nehmen, wurden die tiefgekühlten Zellsuspensionen bei Raumtemperatur langsam aufgetaut und in 20 ml Medium, welches in einer Zellkulturflasche vorgelegt wurde, verteilt. Sobald die Zellen adhärent waren, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt um das DMSO aus dem Kulturmedium zu entfernen.

4.6.5 Einfrieren von Zellen zur RNA- Extraktion

Zur späteren RNA- Extraktion wurden die Zellen einer Zellkulturflasche abtrypsinisiert, mit Medium aufgenommen und einer Zellzählung unterzogen. 10 Millionen Zellen wurden dann in ein 15ml Falcon- Röhrchen überführt, zentrifugiert und vom Überstand befreit. Das entstandene Zellpellet wurde sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

Zur RNA- Extraktion wurden die Zellen dann bei Raumtemperatur aufgetaut und wie unter 4.2.1 weiter verarbeitet.

4.7 Semiquantitative Proteindarstellung mittels Western Blot

Das Verfahren des Western Blot ermöglicht die Identifizierung und relative Quantifizierung spezifischer Proteine innerhalb eines Proteingemisches. Hierbei binden Antikörper an antigene Epitope des auf der Membran fixierten Zielproteins, weshalb man auch von einem Immunoblot spricht. Durch das Blotten auf eine spezielle Membran gelingt eine dauerhafte Fixierung der Proteine. [126]

4.7.1 Proteindarstellung aus eukaryotischen Zellen mit Lämmli- Puffer

Der kommerziell erhältliche Lämmli- Puffer wurde 1970 erstbeschrieben [127] und enthält SDS, 2- Mercaptoethanol zur Denaturierung der Proteine, Bromphenolblau als Farbindikator und Glycerol um die Dichte der Probe zu erhöhen.

Die Zellen einer Zellkulturflasche wurden zunächst abtrypsinisiert, in Medium aufgenommen und nach Zellzählung jeweils eine Million Zellen in zwei 1,5ml Eppendorfgefäße gegeben. Nach Zugabe von 100 µl Lysepuffer (Lämmli) wurde durch Vortexen gemischt. Die Zellen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Weiterverarbeitung so gelagert.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen für fünf Minuten bei 95 °C gekocht und zentrifugiert.

4.7.2 Analyse von Proteinen in SDS- Polyacrylamidgelen

Die diskontinuierliche SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) ist eine von Ullrich Lämmli entwickelte Methode zur Analyse von Proteinen. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Tensid, welches die Eigenladung der Proteine maskiert, so dass diese nach Denaturierung und Linearisierung durch Aufkochen nach ihrer Kettenlänge im Gel aufgetrennt werden können. [127]

Zur Auftrennung von Proteinen wurden zunächst 7,3 x 8 x 0,05cm Mini- SDS- Gele gegossen (Mini PROTEAN II, BioRad). Die in dieser Arbeit verwendeten Gele bestanden aus einem unteren 10%igen Polyacrylamid- Trenngel und einem oberen 5%igen Sammelgel. Für das 10%ige Trenngel wurde unter dem Abzug eine Lösung aus 5ml einer 30% Acrylamid- Lösung (29% Acrylamid, 1% Bisacrylamid), 3,75ml Pufferlösung pH 8,8 (4g SDS und 181,72g Tris- Base in 1000ml ddH₂O) und 6,25ml ddH₂O hergestellt. Nach kurzem Entgasen wurden 150µl einer 10%igen Ammoniumperoxodisulfat- Lösung und 15µl TEMED zugesetzt. Nach dem Schütteln wurde das Gel zügig mit einer 1000µl Pipette zwischen die Scheiben bis etwa 1cm unterhalb des Taschenformers gegeben

und zur Ausbildung einer planaren Oberfläche sofort mit H₂O überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels (ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur) wurde das Wasser abgegossen, das Gel mit Sammelgel- Lösung bis etwa 0,5 cm unter den Rand der Glasscheibe überschichtet und der Taschenformer eingesetzt. Das 5%ige Sammelgel setzt sich zusammen aus 1,2ml 30% Acrylamid- Lösung, 2,25ml Pufferlösung pH 6,8 (2g SDS und 30,28 g Tris- Base in 1000 ml ddH₂O), 5,7ml H₂O, 150µl 10%ige Ammoniumperoxodisulfat- Lösung und 10µl TEMED und wurde wie für das Trenngel beschrieben hergestellt.

Nach Polymerisation des Sammelgels (ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur) wurde der Taschenformer vorsichtig entfernt und die Taschen mit Wasser ausgewaschen. Die entstandenen Gelkammern wurden vorsichtig mit Laufpuffer (15,1g Tris- Base, 94g Glycin und 50ml 10% SDS in 1000 ml ddH₂O) aufgefüllt. Von den wie unter 4.7.1 beschrieben vorbereiteten Proben wurden je 20µl pro Gelkammer aufgetragen. In die erste Gelkammer kam der nicht mit Lämmli- Puffer versehene Proteinmarker.

Die Auftrennung der Proben erfolgte schließlich bei 80 Volt innerhalb des Sammelgels (Dauer ca. 15 Minuten) und anschließend bei 180 Volt innerhalb des Trenngels (Dauer ca. 60-90 Minuten). Der blaue Farbstoff sollte hierbei bis knapp vor das untere Ende des Abstandhalters laufen.

4.7.3 Westernblot

Nach Auftrennung der Proteinproben über das SDS- Polyacrylamidgel mussten diese nach der Semi- Dry- Transfer- Methode auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden. Für den Transfer wurde die Transblot SD Semi- Dry Transfer Cell- Apparatur von BioRad verwendet. Pro Gel wurden 20 Filterpapiere 8,9 x 5,5 cm und eine auf dieselbe Größe zurechtgeschnittene Nitrocellulosemembran benötigt.

Die Filterpapiere, die Nitrocellulosemembran und das vorsichtig aus der Gelkammer entfernte Gel wurden schrittweise in Semi- Dry Blotting Puffer (2,93 g Glycin, 5,81g Tris- Base, 3,7 ml 10% SDS und 200ml Methanol in 1000ml ddH₂O) getränkt.

Der Aufbau der Blot- Apparatur erfolgte (von Anode zur Kathode) nach folgendem Schema:

10 Filterpapiere

Nitrozellulosemembran

SDS- Polyacrylamidgel

10 Filterpapiere

Der elektrophoretische Transfer wurde bei Raumtemperatur für 120 Minuten bei 25 Volt und 35 mA durchgeführt.

4.7.4 Immundetektion der transferierten Proteine

Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulosemembran zum Blocken mit einer 5%igen Magermilchpulverlösung in TBS pH 7,5 mit 0,1% Tween 20 eine Stunde lang bei Raumtemperatur im Schüttler abgesättigt. Nach Abgießen der Magermilch wurde der erste, gegen das gesuchte Protein gerichtete primäre Antikörper, zugegeben. Dieser wurde zuvor mit 5%iger Magermilchpulverlösung in TBS mit 0,1% Tween 20 im Verhältnis 1:750 verdünnt. Die so mit der Antikörperlösung überschichtete Nitrocellulosemembran wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung abgegossen und die Nitrocellulosemembran insgesamt 4x für jeweils 7,5 Minuten auf dem Schüttler mit TBS + 0,1% Tween 20 gewaschen. Nach Abgießen der TBS- Lösung wurde der Magermilch- TBS (wie oben) im Verhältnis 1:1000 verdünnt,

mit Meerrettich- Peroxidase gekoppelte, sekundäre Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet war, zugegeben. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Anschließend erfolgten erneut vier Waschgänge wie oben beschrieben.

Zur Detektion wurden jeweils 5ml ECL- Lösung 1 und 5ml ECL- Lösung 2 vermischt und kurz gevortext. Die Membran wurde für eine Minute in die ECL- Lösung gelegt und vorsichtig geschwenkt. Danach wurde die Nitrocellulosemembran getrocknet, dicht in eine DIN A5 Folie verpackt und für 20 Sekunden (je nach Signalstärke bis zu einer Stunde) auf einem Röntgenfilm exponiert (Fuji Super Rx 13x18 cm).

4.8 Hormonanalysen aus Zellkulturüberständen

Um die Hormonproduktion der kultivierten Zellen zu testen, wurden Subkulturen in 6- Well Platten angelegt. Hierbei wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Well in 2ml Medium ausgesät. Die Enzymreaktionen wurden im Falle der stabil transfizierten Y1- CYP11B1 und Y1- CYP11B2 Zellen nach 24 Stunden durch die Zugabe von 1ml Medium, versetzt mit den entsprechenden Vorläufersubstanzen, in Gang gebracht. In den Y1- CYP11B1 Zellen wurde aus Desoxycortisol (RSS), katalysiert durch CYP11B1 in einer enzymatischen Reaktion Cortisol synthetisiert. In den Y1- CYP11B2 Zellen wurde, katalysiert durch CYP11B2, in drei enzymatischen Reaktionen aus Desoxycorticosteron (DOC) Aldosteron gebildet. RSS und DOC wurden dabei, in Ethanol gelöst, in einer finalen Testkonzentration von $1\mu\text{M}$ (falls nicht anders angegeben) zugegeben. Im Falle der NCI- h295- Zellen wurden Suspensionszellen mit ebenfalls $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Well in 3ml Medium ausgesät und ggf. direkt mit dem Inhibitor versetzt. Dabei wurden alle Versuche in Duplets oder Triplets angefertigt und mindestens zweimalig durchgeführt. Die Zellkulturüberstände wurden dann nach 48 Stunden vorsichtig mit einer $1000\mu\text{l}$ Pipette abgenommen und jeweils in ein $1,5\text{ml}$ Eppendorfgefäß transferiert. Nach Zentrifugation und

erneutem Transfer des Überstandes in ein separates 1,5ml Eppendorfgefäß wurden die Zellkulturüberstände bis zur Hormonanalyse bei -20°C aufbewahrt.

Zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit bis zur Abnahme der Überstände und der idealen Konzentration an Vorläufersubstanz waren im Vorfeld Hormonmessungen nach Zugabe von Vorläufersubstanz in drei verschiedenen Konzentrationen (0,5µM, 5µM und 50µM) und Abnahme der Überstände zu vier verschiedenen Zeitpunkten (12h, 24h, 48h und 72h) erfolgt.

4.8.1 Analyse der Hormonproduktion nach Zugabe von Inhibitorsubstanzen

ETO und METO wurden kommerziell von Janssen Pharmaceuticals erworben. Die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Aldosteronsynthaseinhibitoren, Acenaphthénylpyridine, Naphthylpyridine und deren fluorierte Derivate, wurden wie von Voets *et al.* und Ulmschneider *et al.* [82, 83] publiziert durch unsere Abteilung für Nuklearmedizin synthetisiert und bereitgestellt.

Wurden Inhibitorsubstanzen zugefügt, so geschah dies in sechs verschiedenen, sich durch eine Zehnerpotenz unterscheidenden, Konzentrationen zusammen mit der Zugabe der Vorläufersubstanzen oder, bei den NCI- h295- Zellen, direkt nach deren Aussaat. Die Inkubationszeit betrug wie oben beschrieben 48 Stunden, wobei auch hier Versuche in Duplikaten in mindestens zweifacher Ausführung durchgeführt wurden.

4.8.2 Messung der Aldosteronkonzentration im Zellkulturüberstand

Zur Aldosteronmessung wurde der kommerziell erhältliche **Radioimmunoassay (RIA)** von DPC/Biermann verwendet. Als Tracer diente hierbei I¹²⁵- markiertes Aldosteron, welches in definierter Menge mit dem Aldosteron in der zu untersuchenden Probe um eine feste Anzahl spezifischer Antikörperbindungsstellen konkurriert. Diese Antikörper finden sich immobilisiert

an Polypropylenröhrchen. Die Menge an I^{125} – markiertem Aldosteron ist dann indirekt proportional zur Aldosteronkonzentration in der Probe. Nach der Inkubation wird der Röhrcheninhalt sorgfältig dekantiert, um freies von gebundenem Aldosteron zu trennen. Zur exakten Bestimmung der Aldosteronkonzentration in der Probe wurde mittels Standardproben eine Eichkurve ermittelt. Gemessen wurden sämtliche Proben im γ - Counter. Von jeder Probe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, aus denen dann der Mittelwert bestimmt wurde. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden streng gemäß der Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt.

4.8.3 Messung der Cortisolkonzentration im Zellkulturüberstand

Die Messung von Cortisol erfolgte mit einem vollautomatischen Zentralanalyser, dem Immulite 2000 (Siemens Medical Solutions Diagnostics). Die Analyse lief nach dem Prinzip eines **kompetitiven Chemilumineszenz-Immunoassay** ab. Zunächst wurden Kugeln mit Antikörpern gegen Cortisol in eine Küvette pipettiert, dann folgten sowohl die Probe als auch das an alkalische Phosphatase gebundene Antigen. Während der Inkubationszeit konkurrierten das Enzym-gebundene Antigen und das Hormon aus der Probe um die freien Antikörperbindungsstellen an der Kugel. Schließlich wurde das ungebundene Substrat mittels mehrerer Waschschriffe entfernt und ein luminogenes Substrat zugesetzt. Dieses wurde mithilfe der alkalischen Phosphatase zu einem Zwischenprodukt umgesetzt, das beim Zerfallen ein Photon aussendet und so gemessen werden kann. Die ausgesendete Lichtmenge war also direkt proportional zur Menge des an alkalische Phosphatase gebundenen Hormons und damit indirekt proportional zur Menge des ursprünglich in der Probe enthaltenen Cortisols, so dass anhand einer Eichkurve die tatsächliche Cortisol-Konzentration errechnet werden konnte. Der gesamte Vorgang erfolgte voll automatisch.

4.8.4 Ermittlung von Selektivität und Potenz der Inhibitorsubstanzen

Zur Ermittlung der Potenz der jeweiligen Inhibitorsubstanz wurden die IC₅₀-Werte für die Inhibition von CYP11B1 und CYP11B2 anhand der konzentrationsabhängigen Hemmung der Cortisol-/ Aldosteronproduktion mit dem Statistikprogramm Prism 3 (GraphPad) ermittelt. Der Selektivitätsfaktor ergab sich aus dem Quotienten des mittleren IC₅₀- Wertes für die Inhibition von CYP11B1 und des mittleren IC₅₀- Wertes für die Inhibition von CYP11B2. Fand bei der höchsten eingesetzten Konzentration an Inhibitorsubstanz nicht wenigstens eine 50%ige Inhibition der Cortisolproduktion statt, wurde diese Konzentration als Grundlage zur Berechnung des Selektivitätsfaktors eingesetzt.

4.9 MTT- Test

Dieser Test wurde 1983 erstmalig von Mosmann entwickelt [128] und später unter anderem von Denizot *et al.* [129] modifiziert. Er dient der Testung der Viabilität der Zellen. Das Grundprinzip der Methode besteht in der Reduktion des gelblichen Tetrazoliums Salzes 3-[4,5- Dimethylthiazol-2-yl]- 2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu violetter Formazan durch die mitochondriale Succinat- Dehydrogenasen. Da diese Enzyme nur in vitalen Zellen aktiv sind, dient das photometrisch gemessene Formazan als Maß für die Viabilität der Zellen. [130]

In der vorliegenden Arbeit wurden hierfür adhärenz NCI h295- Zellen in 96-Well Mikrotiterplatten ausgesät (32.500 Zellen pro Well) und ab dem Folgetag für vier Tage mit den entsprechenden Testsubstanzen in drei verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Die Substanzen wurden zuvor in Medium verdünnt und 50µl der Inhibitorlösung zu den bereits vorgelegten 50µl Zellsuspension gegeben.

An Tag vier wurde die MTT- Substanz pro 5mg in 1ml PBS gelöst und anschließend in serumfreiem Kulturmedium (Nutrient Mixture F12 Ham) auf 10

ml verdünnt. Nachdem der Zellkulturüberstand durch vorsichtiges Ausgießen der Platten entfernt und zweimalig mit PBS gewaschen wurde, wurden pro Well 100µl Farbstoff dazu pipettiert. Anschließend wurde erneut für 3-4 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Das unlösliche Formazan wurde nun mit Isopropanol/ HCl (96 ml Isopropanol + 4ml HCl) wieder in Lösung gebracht indem jeweils mit 100µl der Lösung resuspendiert wurde. HCl soll dabei mögliche Interferenzen mit Phenolrot im Zellkulturmedium vermeiden, indem es dieses in eine nicht- interferierende Farbe umwandelt.

Die photometrische Auswertung erfolgte per Elisa Reader (Elisareader 400 SF, Lab Instruments, Salzburg) bei einer Wellenlänge von 570nm. Bei einer Wellenlänge zwischen 560 und 600nm absorbiert das Substrat MTT nicht. Gemessen wurde schließlich die Extinktion, welche im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen aufgetragen wurde.

4.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS Statistics 17.0. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der T- Test für die Mittelwertgleichheit durchgeführt, wobei Werte für $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant erachtet wurden.

5. Ergebnisse

5.1 Subtyppdifferenzierung bei Patienten mit Primärem Hyperaldosteronismus – eine klinikinterne Statistik

Für den besseren Einblick in die gegenwärtige Praxis der Subtyppdifferenzierung bei Patienten mit Primärem Hyperaldosteronismus dient die retrospektive Analyse von Patientendaten der Jahre 2000 – 2009. In diesem Zeitraum unterzogen sich 59 Patienten mit gesichertem PA an der Universitätsklinik Würzburg einem selektiven Nebennierenvenenkatheter. Der NNVK galt als selektiv und damit technisch erfolgreich, wenn der Selektivitätsindex (Cortisol in der jeweiligen NNV / Cortisol in der VCI) bei mindestens zwei lag. Als Kriterium für eine Lateralisation und damit Diagnostik einer unilateralen Erkrankung wurde zum einen ein mindestens doppelt so hoher Aldosteron- Cortisol-Quotient der dominanten NNV verglichen mit der kontralateralen NNV gefordert. Zum anderen sollte der Aldosteron- Cortisol- Quotient der kontralateralen NNV im Vergleich zur Peripherie (VCI) supprimiert sein. Zur Verifizierung der Diagnose dienten der klinische Verlauf nach Adrenalektomie (Reduktion des Blutdrucks um mindestens 20 mmHg systolisch unter Beibehaltung der Medikation bzw. Reduktion der antihypertensiven Medikation bei gleichbleibenden Blutdruckwerten und zwingend eine Normalisierung der Hypokaliämieneigung) bzw. die histologische Aufarbeitung.

Nach diesen Kriterien waren nur 47,5% der NNVK tatsächlich bilateral selektiv. In weiteren 25,4% war der NNVK zwar nur unilateral selektiv aber dennoch, unter Berücksichtigung zusätzlicher Erkenntnisse wie beispielsweise der Bildgebung, für die Subtyppdifferenzierung hilfreich. (Abb. 5.1)

Insgesamt konnten in 37,3% aller NNVK die rechte NNV, in 6,8% die linke NNV nicht selektiv katheterisiert werden. In immerhin 8,5% gelang die Katheterisierung beider NNV nicht. Die Anzahl der für die Differenzialdiagnostik verwertbaren NNVK betrug damit nur 43 von ursprünglich 59.

In vier Fällen kam es zu Komplikationen bei der Durchführung des NNVK, die Komplikationsrate betrug hiermit 6,8%. Die Art der Komplikation rangierte von einer unkomplizierten vasovagalen Reaktion bis hin zur Ruptur der NNV.

Hinsichtlich der diagnostischen Wertigkeit wurden die 43 technisch zumindest partiell erfolgreichen und damit verwertbaren NNVK analysiert.

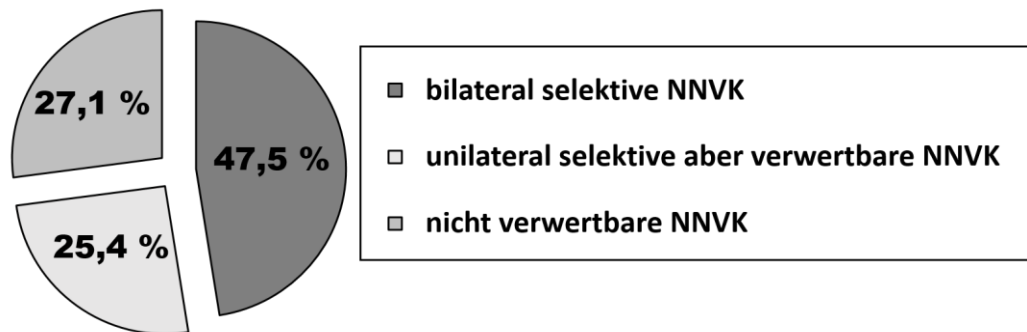


Abb. 5.1. Technischer Erfolg des NNVK in Würzburg zwischen 2000 und 2009

Hiervon führten 83,7% zu einer klaren Differenzialdiagnose (in 23% der Fälle bilaterale und in 61% unilaterale Erkrankung), welche später auch anhand der follow-up Daten bzw. der histologischen Auswertung bestätigt werden konnte. In 9% der Fälle war der NNVK zwar aus technischer Sicht selektiv, in der diagnostischen Auswertung gab es jedoch keinen klaren oder einen mit der übrigen Diagnostik nicht in Einklang zu bringenden Befund, so dass keine Differenzialdiagnose gestellt werden konnte. In 7% (n = 3) musste die anhand des selektiven NNVK gestellte Differenzialdiagnose später revidiert werden, da sie histologisch oder mithilfe eines nochmaligen NNVK widerlegt wurde. (Abb. 5.2)

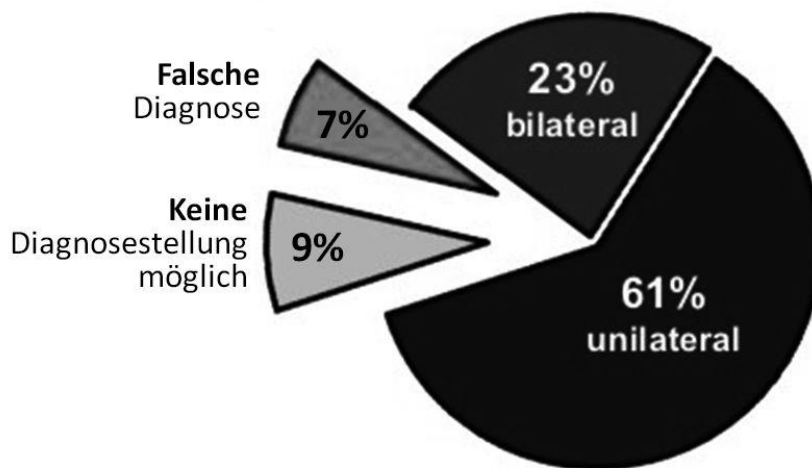


Abb. 5.2. Auswertung der technisch zumindest teilweise erfolgreichen und damit diagnostisch verwertbaren NNVK (n = 43) bzgl. ihrer diagnostischen Wertigkeit

5.2 Quantitative Analyse der Expression von CYP11B1 und CYP11B2 mittels RTq PCR

Um die relative quantitative Expression der beiden CYP11B Isoenzyme in der normalen Nebenniere sowie in verschiedenen adrenalen Tumoren darzustellen, wurde eine Analyse mittels RTq PCR durchgeführt. Hierfür wurde zunächst mRNA aus verschiedenen perioperativ gewonnenen Tumorproben extrahiert und diese so in cDNA umgeschrieben. Analysiert wurde die cDNA von jeweils fünf aldosteronproduzierenden Tumoren, 11 normalen Nebennieren, vier endokrin inaktiven Adenomen, fünf cortisolproduzierenden Tumoren und 14 adrenocorticalen Carcinomen. Untersucht wurde dabei die mRNA- Expression für CYP11B1 und CYP11B2 in den verschiedenen Gewebeproben. In den Negativkontrollen menschlicher Leber, Niere und Testes ließ sich keine Expression der beiden CYP11B- Enzyme darstellen.

CYP11B1 wurde, abgesehen von den Negativproben, in allen untersuchten Gewebeproben exprimiert. Hierbei zeigte sich bezüglich der relativen Expressionsniveaus bei den endokrin inaktiven Adenomen und den adrenocorticalen Carcinomen eine hohe Variabilität verglichen mit den endokrin aktiven Adenomen (Abb. 5.3a). Im Mittel fand sich eine höhere Expression in den endokrin aktiven Adenomen (ca. 10fach höher) und der normalen Nebenniere (ca. 5fach höher) verglichen mit den endokrin inaktiven Adenomen (Abb. 5.3b).

Auch CYP11B2 wurde in allen untersuchten Gewebeproben außer den Negativkontrollen exprimiert. Hier zeigte sich in allen untersuchten Gewebetypen eine relativ hohe Variabilität. Die mit Abstand höchsten Expressionslevel fanden sich bei den aldosteronproduzierenden Adenomen (Abb. 5.4a). Im Mittel war die Expression von CYP11B2 in den aldosteronproduzierenden Adenomen mehr als 10fach höher im Vergleich zu allen anderen untersuchten Gewebetypen (Abb. 5.4b).

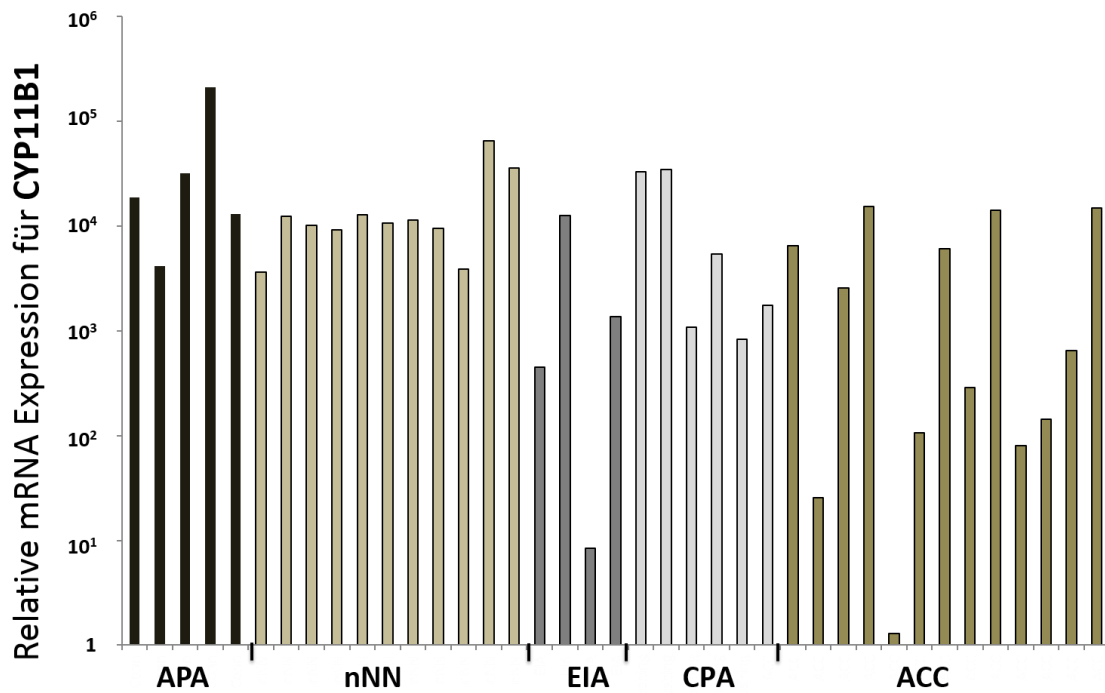


Abb. 5.3a

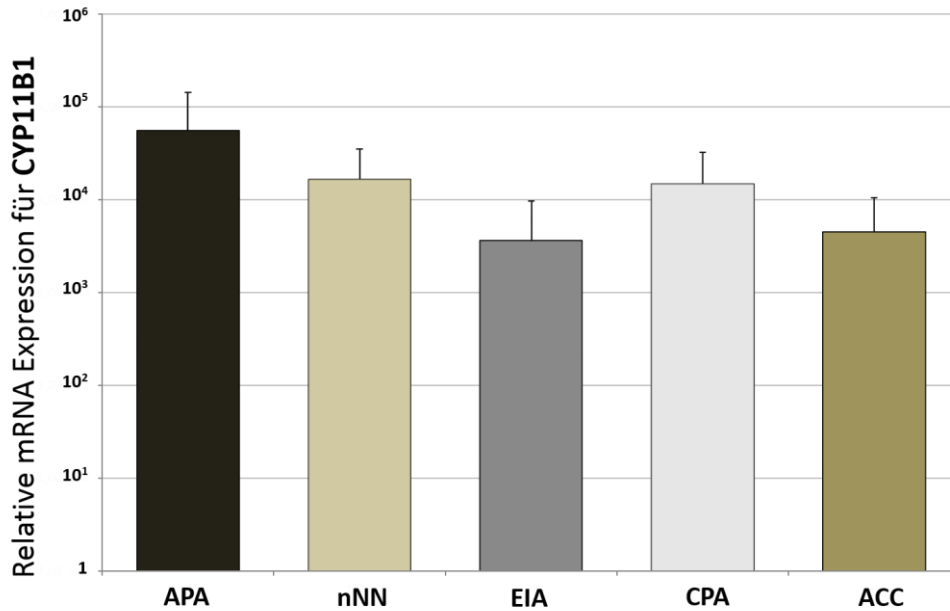


Abb. 5.3b

Abb. 5.3. Relative mRNA Expression von CYP11B1 normiert gegen 18s. Die Expression wurde mittels RTq PCR in 5 Aldosteron- produzierenden Adenomen (APA), 11 normalen Nebennieren (nNN), 4 endokrin inaktiven Adenomen (EIA), 5 Cortisol- produzierenden Adenomen (CPA) und 14 Adrenocorticalen Carcinomen (ACC) analysiert.

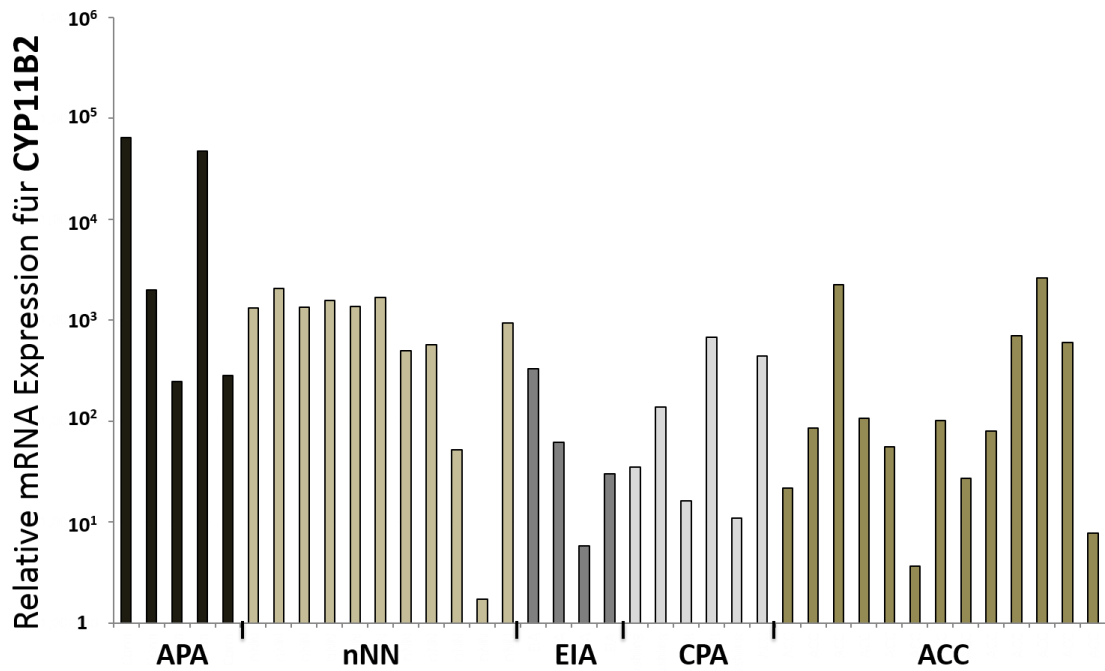


Abb. 5.4a

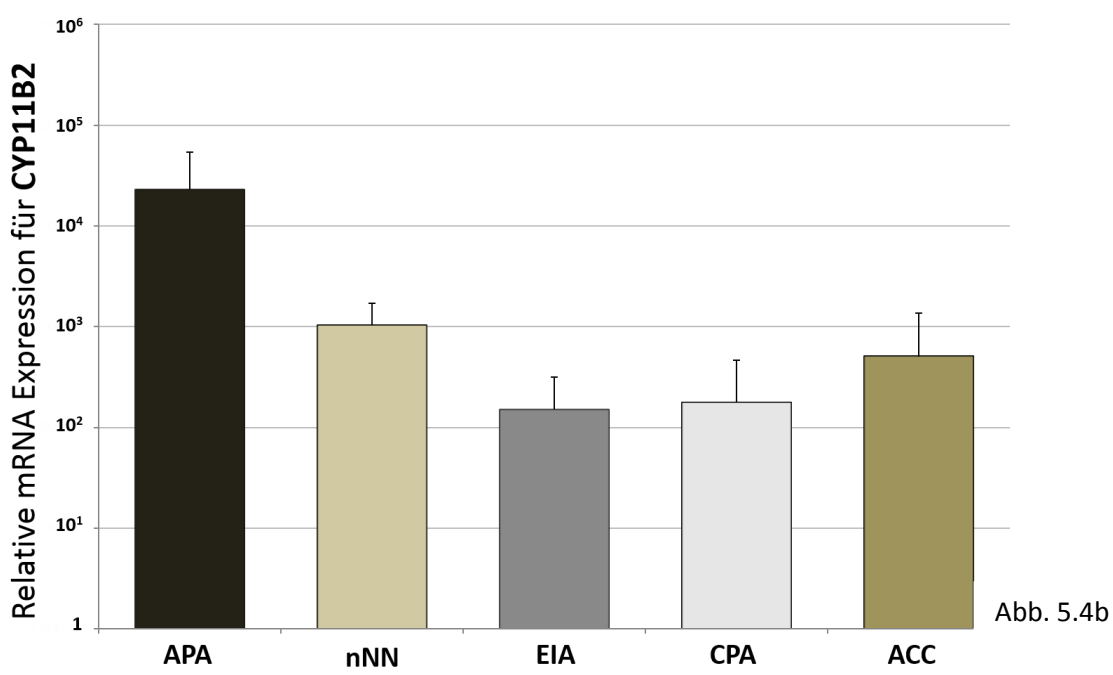


Abb. 5.4b

Abb. 5.4. Relative mRNA Expression von CYP11B2 normiert gegen 18s. Die Expression wurde mittels RTq PCR in 5 Aldosteron- produzierenden Adenomen (APA), 11 normalen Nebennieren (nNN), 4 endokrin inaktiven Adenomen (EIA), 5 Cortisol- produzierenden Adenomen (CPA) und 14 Adrenocorticalen Carcinomen (ACC) analysiert.

5.3 Klonierung der pcDNA3.1zeo(+)- CYP11B1/CYP11B2- Plasmide

Als Ausgangsschritt zur Erstellung einer stabil exprimierenden Zelllinie für humanes CYP11B1 und CYP11B2 sollte die jeweilige cDNA mit der von Bechtel *et al.* publizierten Sequenz [104-107] in den pcDNAzeo(+)- Vektor kloniert werden, welcher einerseits über den CMV- Promotor eine hohe Transkriptionsrate ermöglicht und andererseits ein Resistenz- Gen für Zeocin zur Selektion eukaryoter Zellen enthält.

Hierfür wurden die als pSVL- CYP11B1/CYP11B2- Plasmid vorliegenden DNA- Fragmente mittels PCR amplifiziert, wobei in die 5'- Enden der Primer jeweils eine Restriktionsschnittstelle für EcoR1 eingebaut worden war.

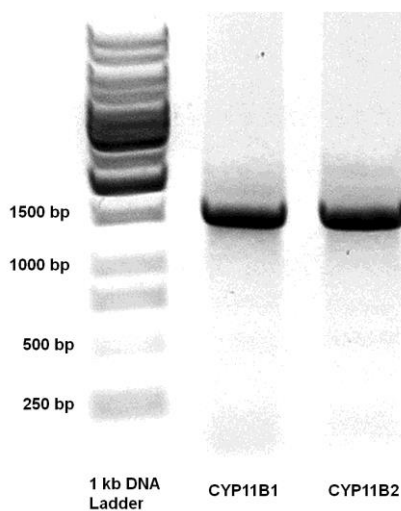


Abb. 5.5. Gelelektrophorese zur Darstellung der mittels PCR amplifizierten cDNA Fragmente für CYP11B1 und CYP11B2 mit einer Größe von jeweils 1512 bp.

Über die in der multiple cloning site des pcDNAzeo(+)- Vektors ebenfalls vorliegende Schnittstelle für EcoR1 wurde der Vektor linearisiert und mit den DNA- Fragmenten ligiert.

Nach Hitzetransformation in Bakterienzellen wurden die, analog des Resistenzprofils des pcDNA3.1zeo- Vektors, auf ampicillinhaltigem Agar gewachsenen Kolonien einzeln gepickt und Flüssigkulturen angeimpft. Die anschließend hieraus isolierten Plasmide wurden einem Kontrollverdau unterzogen.

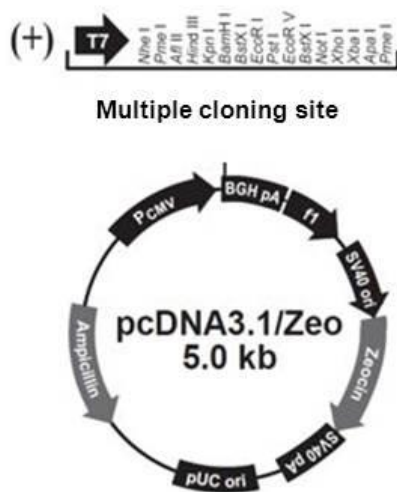


Abb. 5.6. Vektorkarte des pcDNA3.1zeo(+) Vektors mit Darstellung der Resistenzgene für Ampicillin, Zeocin und der multiple cloning site.

Für das Ligationsprodukt mit dem **CYP11B1** Insert konnten 24 Kolonien gepickt werden. Die enthaltenen Plasmide wurden zunächst einem Kontrollverdau mit EcoRI unterzogen. Hierbei zeigte sich bei Klon 3, 8, 10, 11 und 12 in der Gelelektrophorese eine Bande bei ca. 1,5 kbp, anzeigend, dass das cDNA-Insert für CYP11B1 isoliert werden konnte (Abb. 5.7).

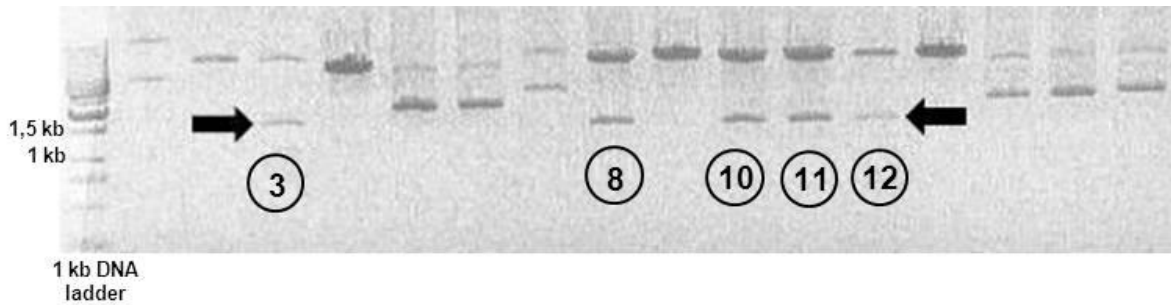


Abb. 5.7. Gelelektrophorese der 24 Klone für die pcDNAzeo(+)- CYP11B1 Ligation nach Kontrollverdau mit EcoRI (Klon 17 – 24 nicht mit abgebildet). Die Pfeile markieren die Bande bei ca. 1500 bp bei Klon 3, 8, 10, 11 und 12.

Diese wurden dann einem erneuten Verdau mit Apal unterzogen, welches im Plasmidkonstrukt bei 2513 bp (im Bereich der multiple cloning site des Vektors) und bei 1182 bp bzw. 2234 bp (im Bereich des cDNA- Inserts), für eine Insertion richtig bzw. falsch herum, schneidet. Das korrekt eingefügte cDNA-Fragment sollte sich daher durch eine Bande bei ~ 1300 bp darstellen, das falsch herum eingefügte durch eine Bande bei ~ 280 bp (Abb 5.8a). Abb. 5.8b zeigt, dass alle fünf Klone über das korrekt eingefügte cDNA- Insert für CYP11B1 verfügten.

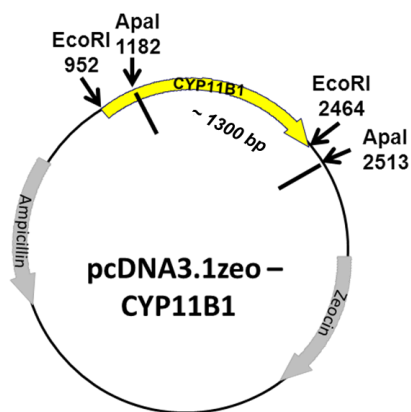


Abb. 5.8a

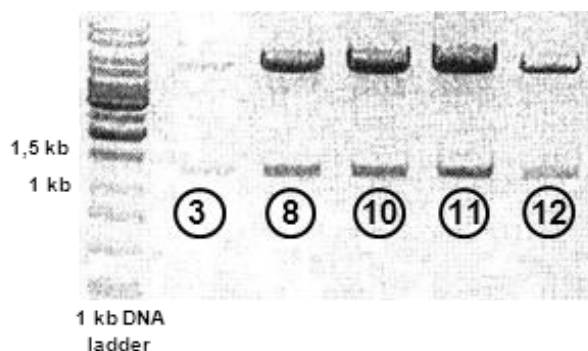


Abb. 5.8b

Abb. 5.8. Kontrollverdau der fünf pcDNAzeo(+)- CYP11B1 Klone mit dem asymmetrisch in Vektor und Insert schneidenden Enzym Apal als schematische Darstellung (5.8a) und Gelelektrophorese mit einer Bande bei ca. 1300 bp als Nachweis der korrekt inserierten CYP11B1 cDNA bei allen fünf Klonen (5.8b).

Nach Sequenzierung wurden Klon 8 und 11 zur Weiterverarbeitung eingesetzt, da diese nur drei nicht kodierende Mutationen im Vergleich zur Ausgangs-cDNA im pSVL- CYP11B1- Plasmid enthielten.

Für das Ligationsprodukt mit dem **CYP11B2** Insert konnten 13 Kolonien gepickt werden. Die entsprechenden Plasmide wurden zum Kontrollverdau direkt mit BglIII geschnitten, welches eine Schnittstelle bei 12 bp (im Vektor) und bei 1113 bp bzw. 2279 bp (im cDNA Insert) für das richtig bzw. falsch eingefügte cDNA-Fragment aufweist. Dies ergibt nach Kontrollverdau in der Gelelektrophorese für das richtig herum eingefügte cDNA- Fragment eine Bande bei ~ 1100 bp und für das falsch herum eingefügte DNA- Fragment eine Bande bei ~ 2300 bp (Abb. 5.9). Es zeigte sich, dass sowohl Klon 1 als auch Klon 11 das cDNA-Insert für CYP11B2 in der richtigen Richtung enthielten (Abb. 5.10).

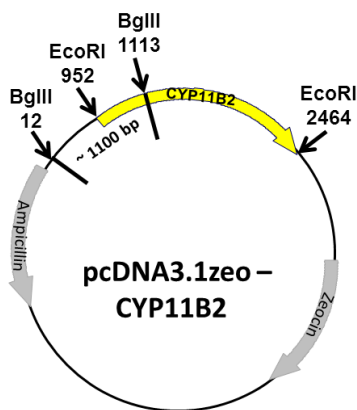


Abb. 5.9. Schematische Darstellung zum Kontrollverdau der pcDNAzeo(+)- CYP11B2 Klone mit dem asymmetrisch in Vektor und Insert schneidenden Enzym BglIII.

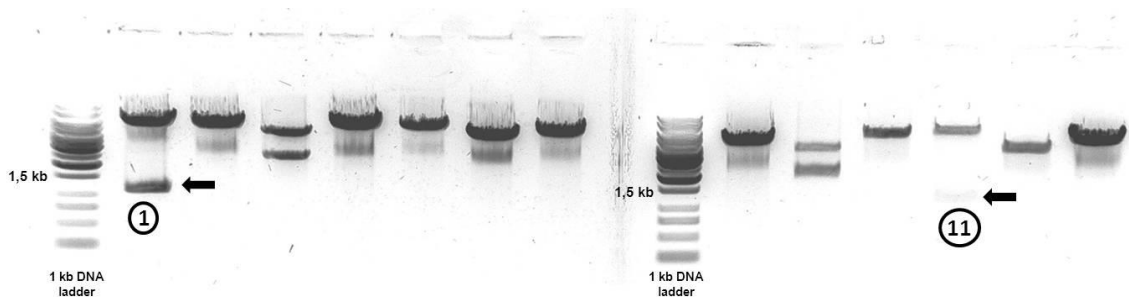


Abb. 5.10. Gelelektrophorese der 13 Klone nach Kontrollverdau mit BglIII. Die Bande bei ca. 1100 bp bei Klon 1 und 11 als Nachweis der korrekt inserierten CYP11B2 cDNA.

Die Sequenzierung der beiden Klone 1 und 11 zeigte im Vergleich zur Ausgangs- cDNA im pSVL- CYP11B2- Plasmid lediglich eine nicht kodierende Mutation, weshalb beide Klone zur Weiterverarbeitung eingesetzt wurden.

5.4 Herstellung einer stabil transfizierten Y1- CYP11B1 und Y1- CYP11B2 Zelllinie

Die Transfektionen mit Lipofectamine zur Herstellung einer stabil exprimierten Y1- CYP11B1 und Y1- CYP11B2 Zelllinie wurden parallel durchgeführt. Bei jeder Transfektion wurden 20 Klone isoliert und weiter kultiviert. Von jedem Klon wurden sechs Einfrierkulturen angelegt, RNA zur semiquantitativen Darstellung mittels Realtime- PCR extrahiert und Protein zur semiquantitativen Analyse mittels Westernblot dargestellt.

Von allen 20 Kolonien für Y1- CYP11B1 und den 19 verbliebenen vitalen Kolonien für Y1- CYP11B2 wurde zunächst ein Westernblot zur Proteindarstellung durchgeführt (Abb. 5.11 und 5.12).

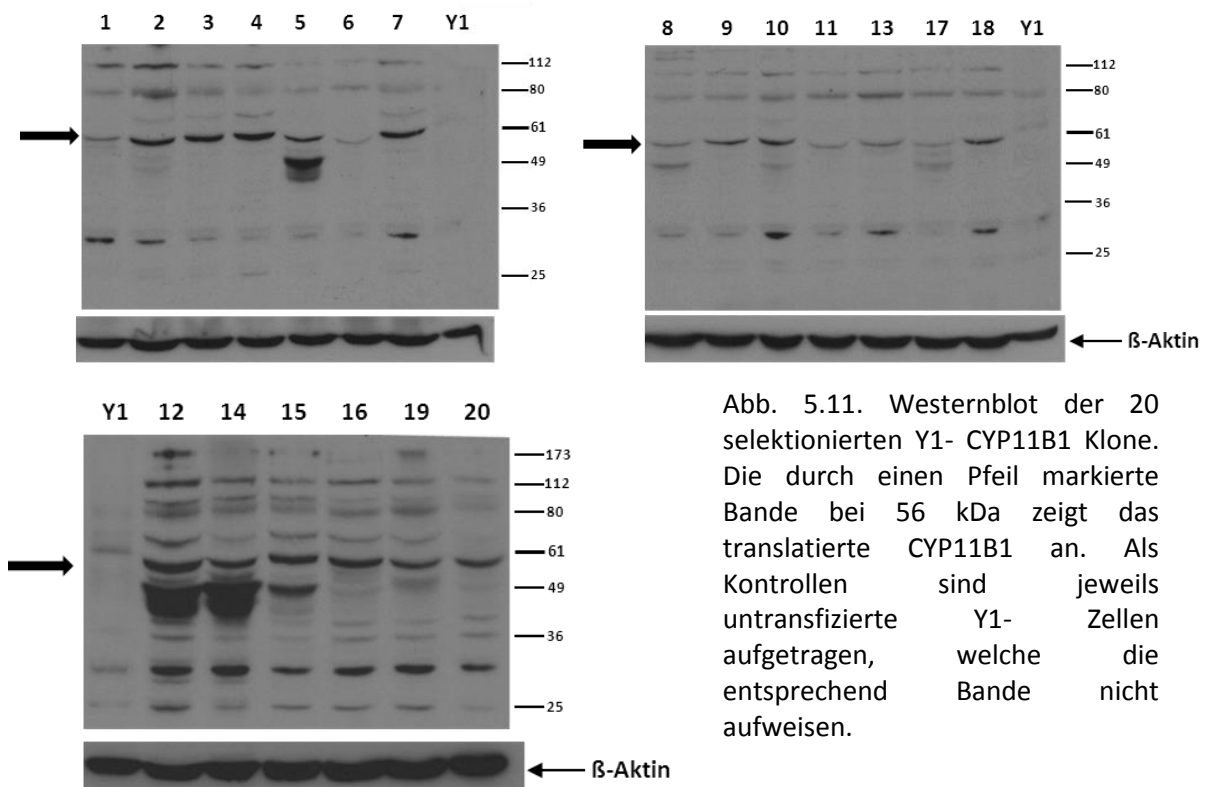


Abb. 5.11. Westernblot der 20 selektierten Y1- CYP11B1 Klone. Die durch einen Pfeil markierte Bande bei 56 kDa zeigt das translatierte CYP11B1 an. Als Kontrollen sind jeweils untransfizierte Y1- Zellen aufgetragen, welche die entsprechende Bande nicht aufweisen.

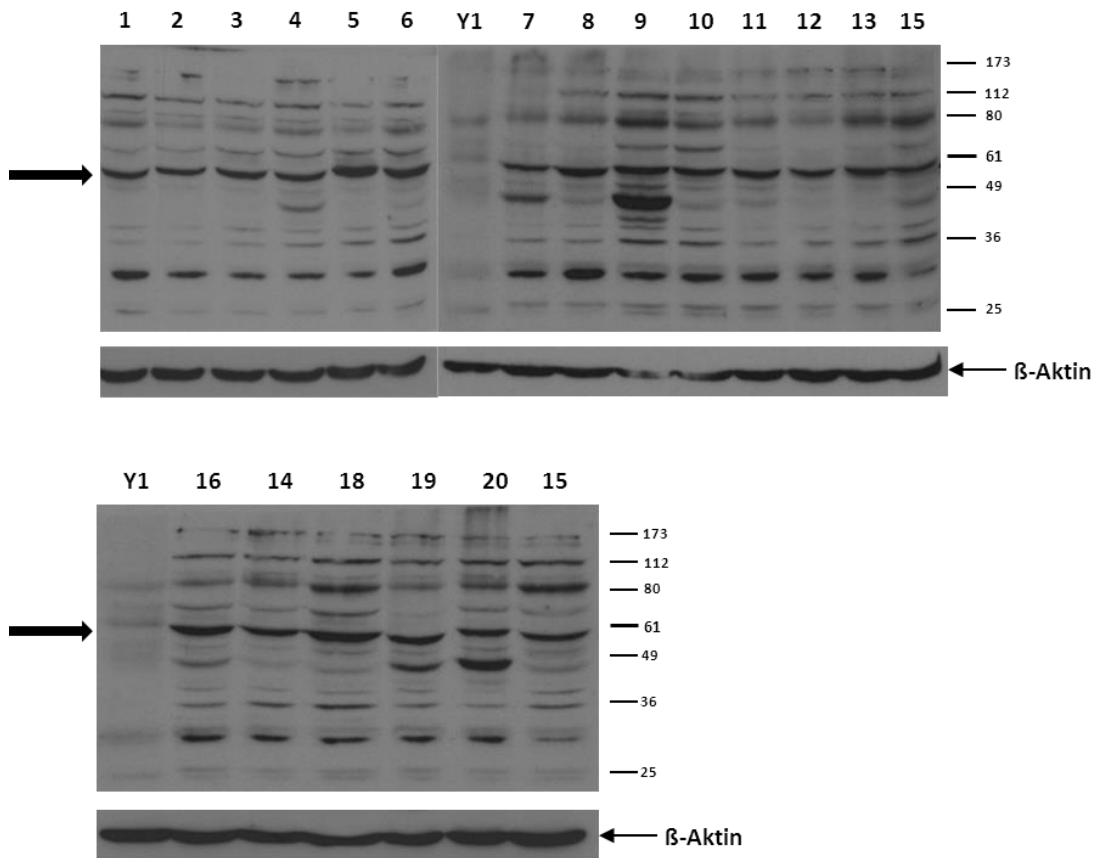


Abb. 5.12. Westernblot der 19 selektionierten Y1- CYP11B2 Kolonien. Die durch einen Pfeil markierte Bande bei 56 kDa zeigt das translatierte CYP11B2 an. Als Kontrollen sind jeweils untransfizierte Y1- Zellen aufgetragen, welche die entsprechend Bande nicht aufweisen.

Die Bande bei 56 kDa konnte für alle 20 Y1- CYP11B1 bzw. 19 Y1- CYP11B2 Kolonien mithilfe des CYP11B1/2 spezifischen Antikörpers den Proteinnachweis erbringen, wobei die untransfizierten Y1- Zellen als Negativkontrolle dienten. Es wurden die Zellkolonien mit einer vergleichsweise schwachen Proteinexpression aussortiert und von den restlichen Kolonien jeweils RNA extrahiert und cDNA synthetisiert. Mittels Realtime- PCR wurden die relativen quantitativen Expressionslevel der beiden CYP11B- Isoenzyme in den einzelnen Zellkolonien vergleichend dargestellt. Somit wurden von den Y1- CYP11B1 – Kolonien die Nummern 2, 3, 4, 5, 7, 10, 12, 14, 15, 16 und 18 und

von den Y1- CYP11B2- Kolonien die Nummern 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 18, 19 und 20 weiter untersucht (Abb. 5.13 und 5.14).

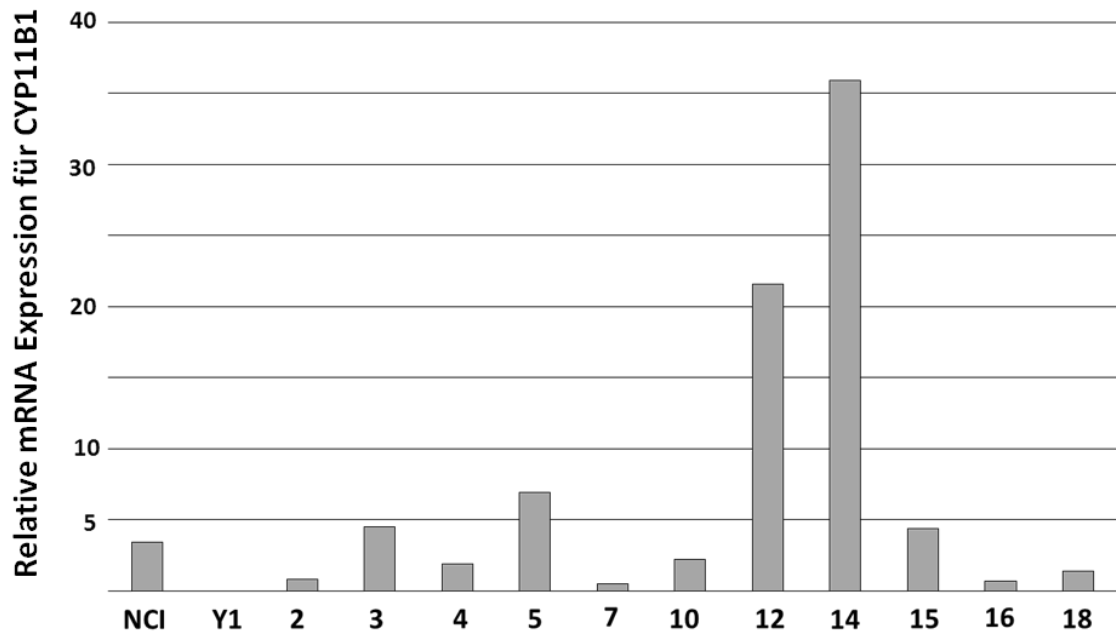


Abb. 5.13. Y1- CYP11B1 Kolonien: Darstellung der relativen quantitativen Expressionslevel von CYP11B1 normiert gegen 18s mittels Realtime- PCR. Als Vergleich dienen untransfizierte Y1-Zellen und NCI- h295- Zellen.

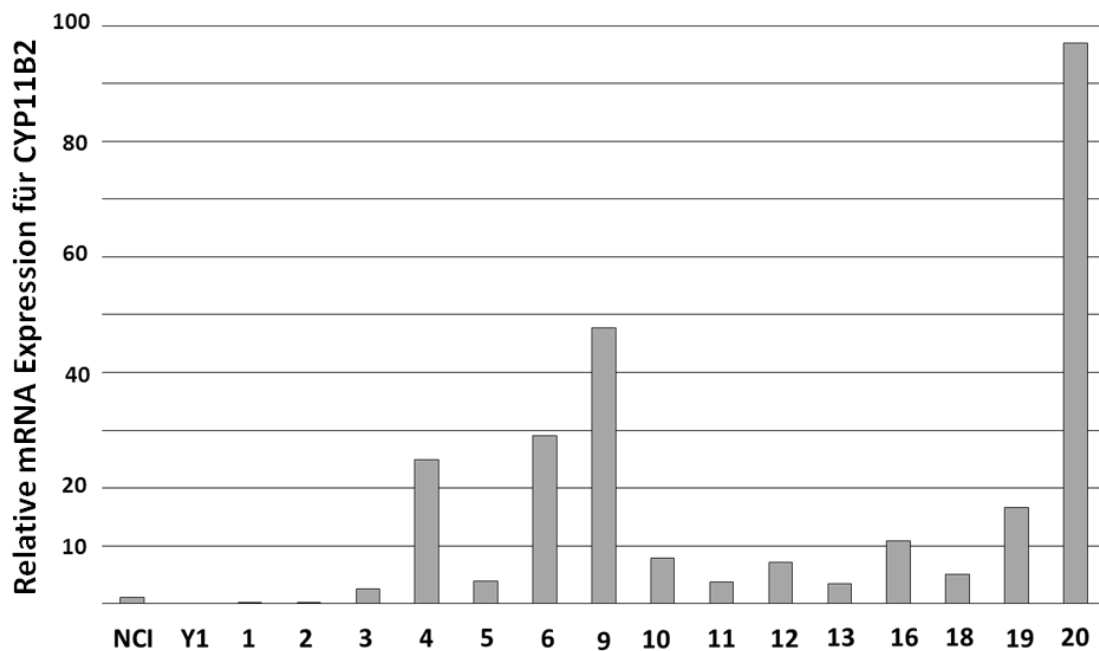


Abb. 5.14. Y1- CYP11B2- Kolonien: Darstellung der relativen quantitativen Expressionslevel von CYP11B2 normiert gegen 18s mittels Realtime- PCR. Als Vergleich dienen untransfizierte Y1-Zellen und NCI- h295- Zellen.

Bei den **Y1- CYP11B1**- Kolonien wiesen die Kolonien 12 und 14 die höchsten mRNA Expressionslevel von CYP11B1 auf. Die mRNA Expression von CYP11B1 zeigte sich bei Kolonie 12 6,3fach – und bei Kolonie 14 10,5fach höher, verglichen mit der in NCI- h295 Zellen.

Innerhalb der **Y1- CYP11B2**- Kolonien fielen die Kolonien 6, 9 und 20 durch die höchsten mRNA Expressionslevel von CYP11B2 auf. Verglichen mit dem Expressionsniveau für CYP11B2 in NCI- h295 Zellen war dieses bei Kolonie 6 28,5fach, bei Kolonie 9 47fach und bei Kolonie 20 95fach höher.

Zur Identifikation des zur Substanztestung am besten geeigneten Inhibitors wurde daher in Folge die Produktion von Cortisol in den Y1- CYP11B1 Kolonien 12 und 14 sowie die Produktion von Aldosteron in den Y1- CYP11B2 Kolonien 6, 9 und 20 näher untersucht.

5.5 Untersuchung der Enzymaktivität in den stabil transfizierten Y1-CYP11B- Zelllinien

5.5.1 Cortisolproduktion der Y1- CYP11B1- Kolonien

Es wurde zunächst die Cortisol- Konzentration im Überstand der beiden verbliebenen Y1- CYP11B1 Kolonien nach 72stündiger Inkubation mit einem Überschuss von 50µM an Vorläufersubstanz (RSS) analysiert. Die Durchführung des Versuches erfolgte einmalig in Duplets. Die Kreuzreaktion (Cortisolbestimmung aus Medium mit Vorläufersubstanz) lag bei dieser Konzentration an RSS bei 0,18 µg/ml.

Folgende Cortisol- Konzentrationen wurden gemessen:

Klon 12: 0,56 (SD ± 0,01) µg/ml

Klon 14: 4,32 (SD ± 0,13) µg/ml

In den untransfizierten Y1- Zellen konnten nach Zugabe von Vorläufersubstanz 0,2 (SD ± 0,004) µg/ml Cortisol detektiert werden. Ohne Zugabe von Vorläufersubstanz wurde in beiden Klonen sowie den untransfizierten Y1- Zellen kein Cortisol produziert. (Abb. 5.15)

Im Hinblick auf die Enzymaktivität wurden die weiteren Substanztestungen für die Y1- CYP11B1- Zellen ausschließlich an Kolonie 14 durchgeführt.

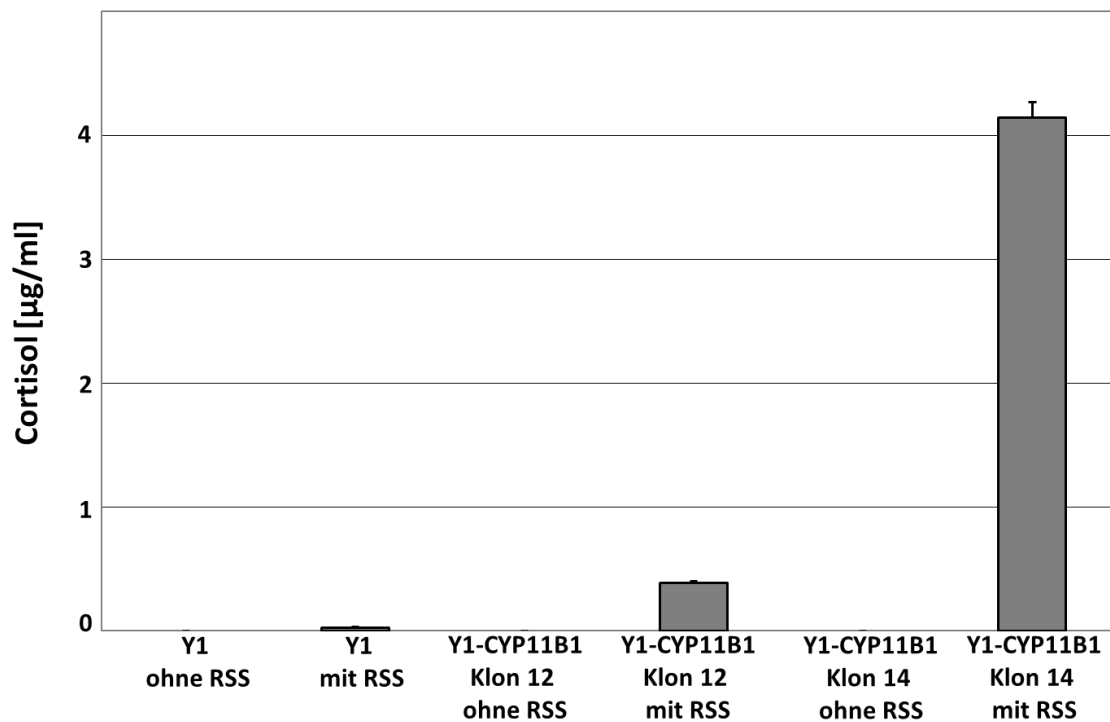


Abb. 5.15. Bestimmung der Cortisolkonzentration (Duplets) in untransfizierten Y1- Zellen, Y1-CYP11B1 Klon 12 und Klon 14 jeweils mit und ohne Zugabe von 50 µM RSS nach 72h Inkubation.

5.5.2 Aldosteronproduktion der Y1- CYP11B2- Kolonien

Analog zu der oben dargestellten Messung von Cortisol wurde bei den verbleibenden Y1-CYP11B2 Kolonien Aldosteron im Zellkulturüberstand bestimmt. Die Zellen wurden ebenfalls über 72 Stunden mit 50 µM Vorläufersubstanz (DOC) in Duplets inkubiert. Die Kreuzreaktion bei der Aldosteronmessung betrug für diese Konzentration an DOC $9,2 \times 10^{-4}$ µg/ml.

Folgende Aldosteron- Konzentrationen wurden gemessen:

Klon 6: $1,18 \times 10^{-3}$ (SD $\pm 7,07 \times 10^{-6}$) µg/ml

Klon 9: $2,28 \times 10^{-1}$ (SD $\pm 8,57 \times 10^{-3}$) µg/ml

Klon 20: $8,27 \times 10^{-3}$ (SD $\pm 5,66 \times 10^{-5}$) µg/ml

Für die untransfizierten Y1- Zellen mit DOC und Klon 9 ohne Zugabe von DOC konnte eine geringe Menge Aldosteron von $1,3 \times 10^{-3}$ bzw. $1,5 \times 10^{-4}$ $\mu\text{g/ml}$ detektiert werden. In den untransfizierten Y1- Zellen und den beiden anderen Klonen konnte ohne Zugabe von DOC kein Aldosteron gemessen werden.

Entsprechend wurden alle weiteren Substanztestungen an Kolonie 9 durchgeführt.

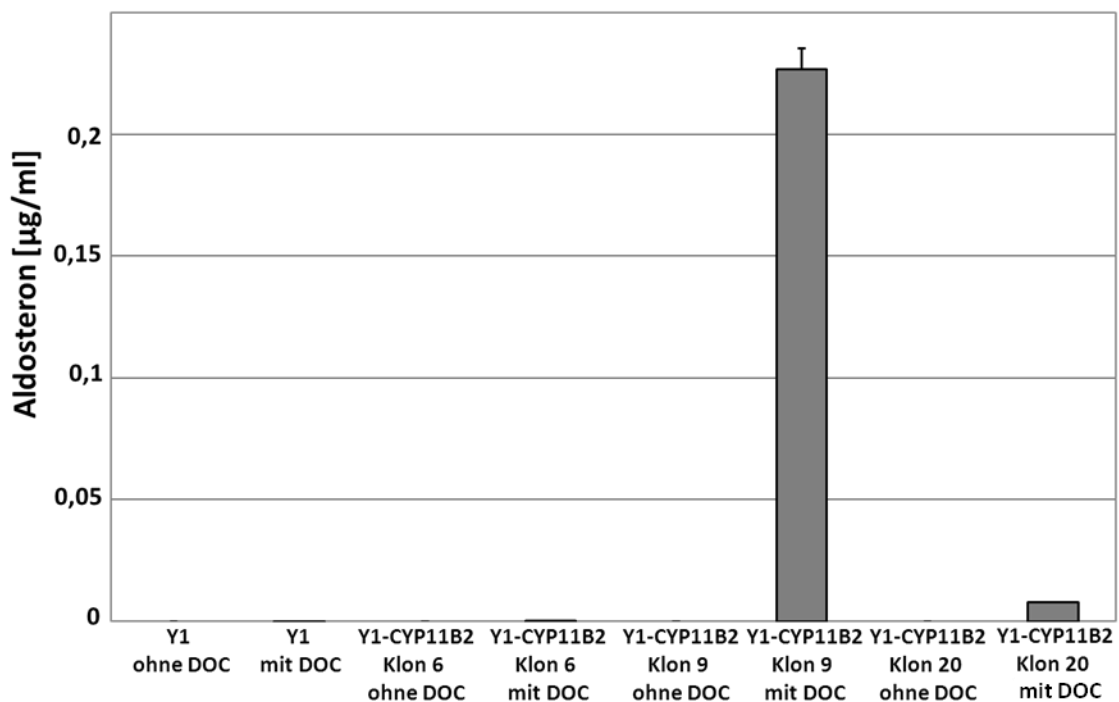


Abb. 5.16. Bestimmung der Aldosteronkonzentration (Duplets) in untransfizierten Y1- Zellen und Y1- CYP11B2 Klon 6, 9 und 20 jeweils mit und ohne Zugabe von $50 \mu\text{M}$ DOC nach 72h Inkubation.

Wie im Methodenteil unter 4.8 dargestellt, wurde ein Versuch zur Ermittlung der optimalen Konzentration an Vorläufersubstanz und Inkubationszeit durchgeführt. Alle weiteren Substanztestungen erfolgten an den stabil transfizierten Y1- CYP11B1/2- Zellen mit $1 \mu\text{M}$ Vorläufersubstanz und einer Inkubationszeit von 48 Stunden. Die Kreuzreaktion für diese Konzentration an RSS und DOC befand sich im nicht messbaren Bereich.

Im Weiteren wurden ausschließlich die beiden Klone mit der höchsten Hormonproduktion, Y1- CYP11B1 Kolonie 14 und Y1- CYP11B2 Kolonie 9, eingesetzt.

5.5.3 Hemmung der Enzymaktivität durch ETO und METO

Zur abschließenden Testung hinsichtlich der Eignung der stabil transfizierten Y1- Zelllinien als Testsystem für die Evaluation selektiver Aldosteronsynthaseinhibitoren wurden diese mit den als Inhibitoren von CYP11B1 und CYP11B2 bekannten Substanzen Etomidat und Metomidat inkubiert.

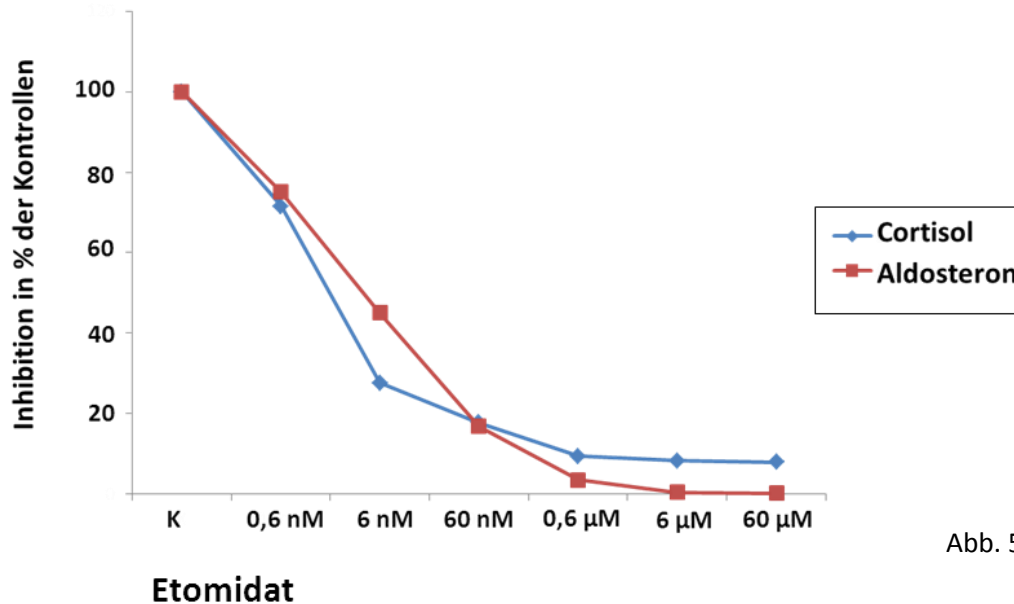


Abb. 5.17a

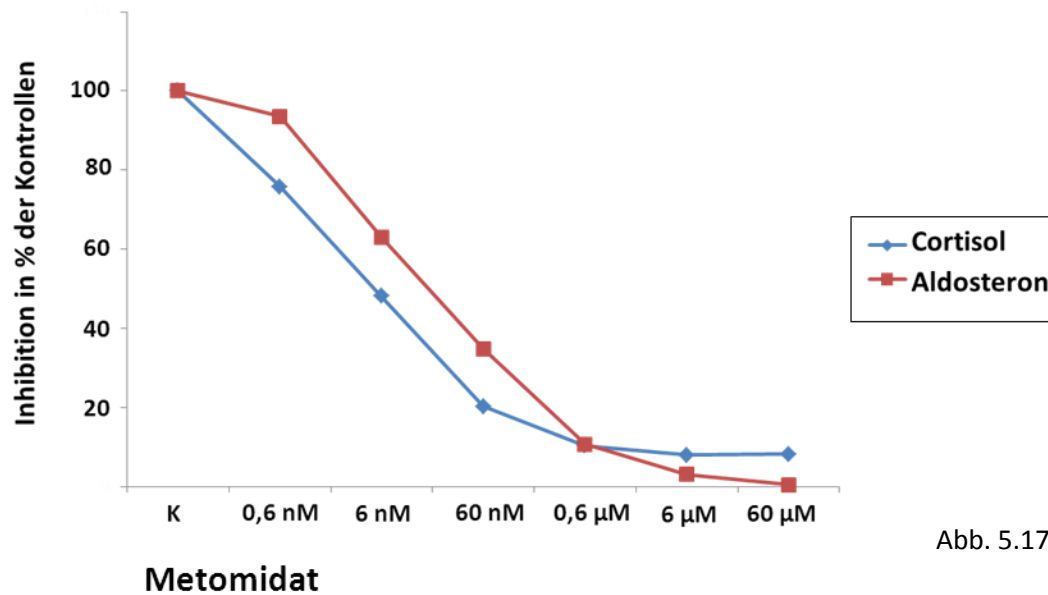


Abb. 5.17b

Abb. 5.17. Inhibition der Cortisol- und Aldosteronproduktion durch Etomidat und Metomidat in Konzentrationen zwischen 0,6 nM und 60 µM in den stabil transfizierten Y1- CYP11B1 und Y1- CYP11B2 Zellen.

Beide Substanzen erwiesen sich im vorliegenden Testsystem als potente Inhibitoren von CYP11B1 und CYP11B2 mit IC50- Werten im nanomolaren Bereich und stärkerer inhibitorischer Wirkung auf CYP11B1.

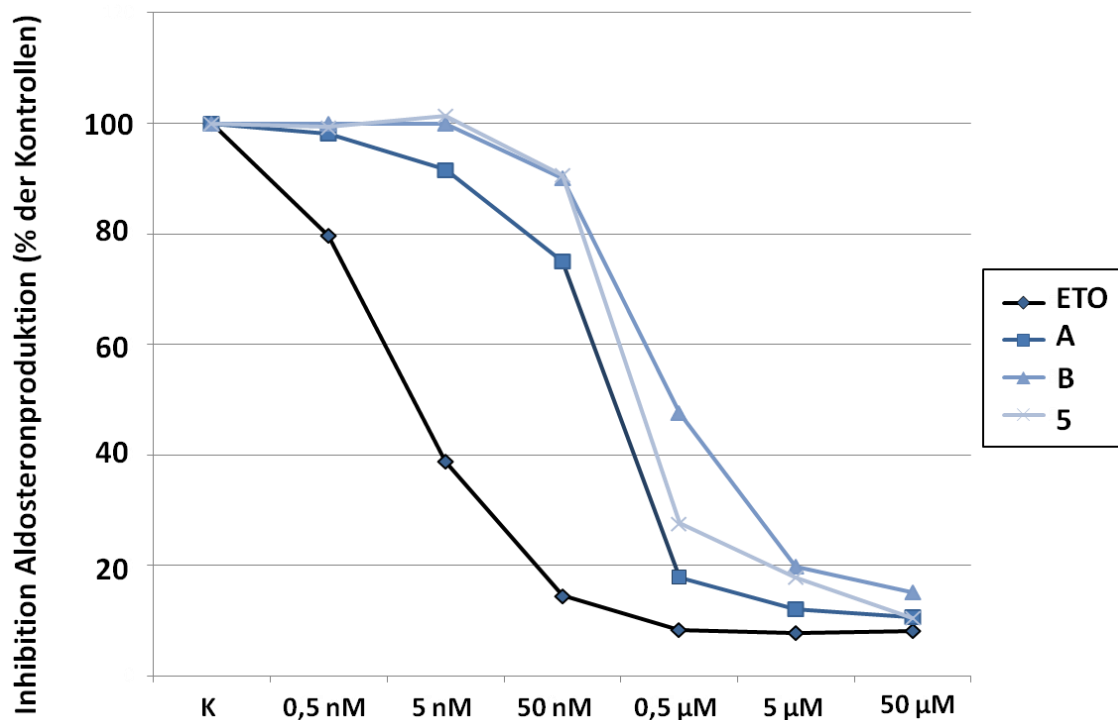
In zweimaliger Testung ergaben sich folgende IC50 – Werte [nm/liter]:

CYP11B1: ETO 1,45 (SD ± 0,07), METO 4,27 (SD ± 3,56)

CYP11B2: ETO 4,03 (SD ± 0,37), METO 18,3 (SD ± 1,05)

5.6 Testung von Aldosteronsyntheseinhibitoren in NCI- h295 Zellen

Zunächst wurden wenige ausgewählte Vertreter der CYP11B2 – inhibierenden Naphthylpyridine [82] (Substanz 5) und Acenaphthenylpyridine [83] (Substanzen A und B) bezüglich ihrer inhibitorischen Wirkung auf die Aldosteronproduktion in NCI- h295- Zellen getestet. Die NCI- h295- Suspensionszellen wurden hierbei jeweils 2x in Triplets mit den Aldosteronsyntheseinhibitoren in Konzentrationen zwischen 0,5 nM und 50 μ M inkubiert und die Aldosteronkonzentration im Zellkulturüberstand mit der mit Etomidat inkubierter Zellen und Kontrollen ohne Zusatz eines Inhibitors



verglichen (Abb. 5.18).

Abb. 5.18. Inhibition der Aldosteronproduktion in NCI- h295- Zellen nach 48stündiger Inkubation mit ausgewählten Aldosteronsyntheseinhibitoren und Etomidat in Konzentrationen zwischen 0,5 nM und 50 μ M.

Während sich für Etomidat eine deutliche inhibitorische Wirkung auf die Aldosteronproduktion in NCI- h295- Zellen zeigte, kam es bei Substanz A erst ab einer Konzentration von 5 nmol/l und bei den Substanzen B und 5 erst ab einer Konzentration von 50 nmol/l zu einer sichtbaren Inhibition der Aldosteronproduktion.

Entsprechend konnten für die jeweiligen Substanzen folgende IC₅₀ – Werte [nmol/l] ermittelt werden:

ETO	2,25 (SD ± 0,35)
A	103,7 (SD ± 66,47)
B	316,8 (SD ± 174,87)
5	193,4 (SD ± 0,78)

5.7 Testung von Aldosteronsynthaseinhibitoren und fluorierten Derivaten in den Y1- CYP11B1 und Y1-CYP11B2- Zellen

Von den unter 5.6 dargestellten Aldosteronsynthaseinhibitoren konnten fluorierte Derivate synthetisiert und bezüglich ihrer inhibitorischen Wirkung auf die Aldosteronproduktion in Y1- CYP11B2 und auf die Cortisolproduktion in Y1- CYP11B1– Zellen getestet werden. Die Zellen wurden hierfür mit den Vorläufersubstanzen DOC und RSS [1 µM] versorgt und mit der jeweiligen Substanz über 48 Stunden in Konzentrationen zwischen 0,1 nmol/l und 10 µmol/l inkubiert und die Aldosteron- bzw. Cortisolkonzentration im Zellkultur-Überstand bestimmt. Alle Substanztestungen erfolgten in Duplets mit zweimaliger Wiederholung der Testung. (Abb. 5.19)

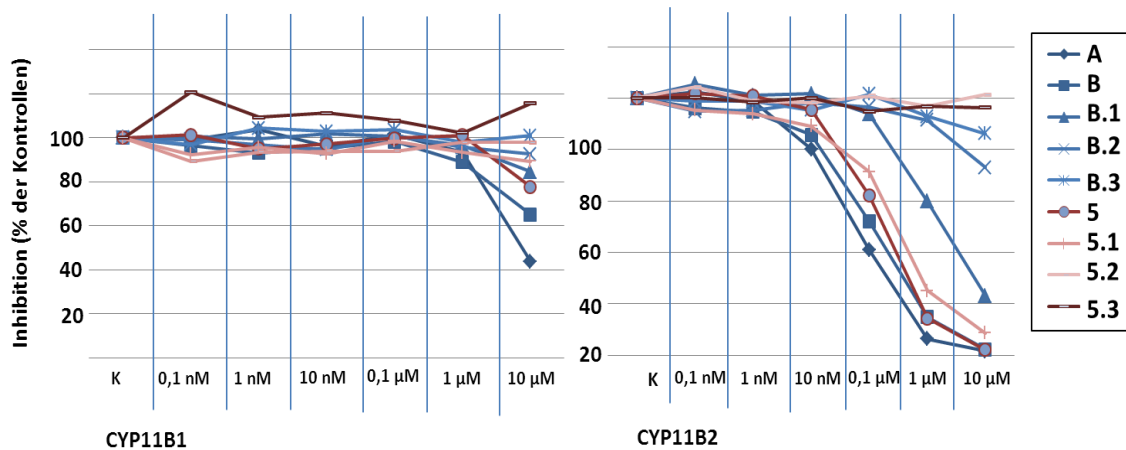


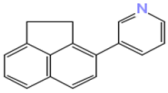
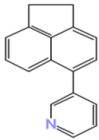
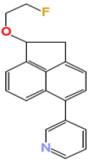
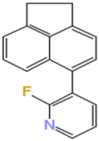
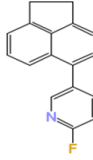
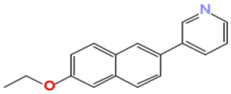
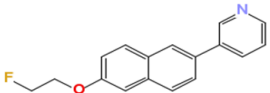
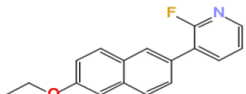
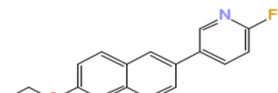
Abb. 5.19. Inhibition der Cortisolproduktion in Y1-CYP11B1- Zellen (+ 1 μ M RSS) und Aldosteronproduktion in Y1-CYP11B2- Zellen (+ 1 μ M DOC) nach 48stündiger Inkubation mit fluorierten und nicht- fluorierten Aldosteronsynthese- Inhibitoren in Konzentrationen zwischen 0,1 nM und 10 μ M.

Hierbei zeigte sich in den Y1-CYP11B1- Zellen für keine der Substanzen eine Inhibition der Cortisolproduktion bei Konzentrationen bis 1 μ mol/l. Substanzen A und B sowie das fluorierte Derivat B.1 und Substanz 5 mit dem fluorierten Derivat 5.1 zeigten jedoch eine deutlich inhibitorische Wirkung auf die Aldosteronproduktion in Y1- CYP11B2- Zellen. Tabelle 5.1 zeigt die einzelnen Verbindungen sowie die für die Inhibition von CYP11B1 und CYP11B2 ermittelten IC₅₀- Werte und den Selektivitätsfaktor für die Inhibition von CYP11B2 (IC₅₀ CYP11B1/IC₅₀ CYP11B2).

Konnte bei einer Konzentration von 10 μ mol/l an Inhibitor nicht wenigstens eine 50%ige Inhibition der Aldosteron- bzw. Cortisolproduktion erreicht werden, wurde kein IC₅₀ berechnet und als Grundlage für die Berechnung des Selektivitätsfaktors der IC₅₀ > 10 μ mol/l gesetzt. In der Tabelle wurde in diesen Fällen anstatt der IC₅₀ Werte die maximale Inhibition der Hormonproduktion in Prozent zur Hormonproduktion in den Kontrollzellen angegeben.

Für alle getesteten Substanzen zeigte sich ein Selektivitätsfaktor von > 10 für die Inhibition von CYP11B2 verglichen mit der inhibitorischen Wirkung auf

CYP11B1. Von den fluorierten Derivaten konnte nur für die Substanzen B.1 und 5.1 eine ausreichende inhibitorische Wirkung auf CYP11B2 nachgewiesen werden, wobei sich das fluorierte Naphthylpyridin 5.1 als potenteste Substanz mit einer IC₅₀ für CYP11B2 von 156 nmol/l (SD ± 3) bei einem Selektivitätsfaktor von > 64 herausstellte.

Substanz	Strukturformel	Molmasse [g/mol]	IC 50 CYP11B1 [nM]	IC 50 CYP11B2 [nM]	Selektivitätsfaktor (für CYP11B2)
Acenaphthenylpyridine					
A		231,29	1550 (SD ± 167)	57 (SD ± 18)	27
B		231,29	Maximal 34 % Inhibition	136 (SD ± 83)	> 74
B.1		293,12	Maximal 15 % Inhibition	901 (SD ± 49)	> 11
B.2		249,28	Keine Inhibition	Maximal 27 % Inhibition	
B.3		249,28	Keine Inhibition	Maximal 13 % Inhibition	
Naphthylpyridine					
5		249,31	Maximal 10 % Inhibition	156 (SD ± 3)	> 64
5.1		267,3	Maximal 10 % Inhibition	224 (SD ± 127)	> 45
5.2		267,3	Keine Inhibition	Keine Inhibition	
5.3		267,3	Keine Inhibition	Keine Inhibition	

Tab. 5.1

5.8 Wirkung der potentesten Inhibitoren auf das Proliferationsverhalten in NCI- h295- Zellen

Um die Auswirkung der potentesten Substanzen auf die Zellproliferation in NCI-h295- Zellen zu testen, wurden MTT- Tests durchgeführt. Die Substanzen wurden hierbei in der Konzentration des unter 4.7 ermittelten IC₅₀- Wertes sowie eine 10er- Potenz darüber und darunter eingesetzt, jeweils in Triplets getestet und dieser MTT- Test 2x durchgeführt. Getestet wurden Substanzen B und 5, sowie jeweils deren fluorierte Derivate B.1 und 5.1.

Bei den Substanzen 5 und B.1 kam es mit den eingesetzten Konzentrationen zu keinerlei Auswirkung auf das Proliferationsverhalten der NCI- h295 Zellen (Abb. 5.20)

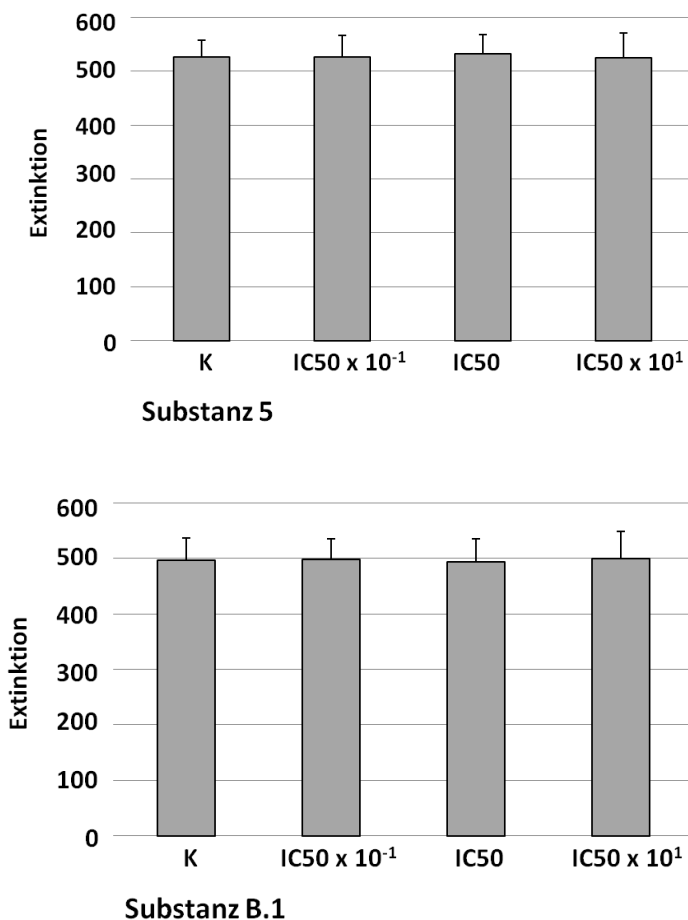


Abb. 5.20. NCI- h295- Zellen wurden jeweils 2x über 3 Tage in 96-Well Mikrotiterplatten mit den Substanzen in aufsteigenden Konzentrationen, abhängig von dem ermittelten IC₅₀- Wert, inkubiert.

Anschließend wurde die Zellzahl indirekt über mitochondriale Dehydrogenasen bestimmt, welche MTT- Substanz in photometrisch messbares Formazan umwandeln und die Extinktion der mit den Substanzen inkubierten Zellen mit der unbehandelten Kontrollen (K) verglichen.

Bei den Substanzen B und 5.1 zeigte sich ab einer Konzentration entsprechend des 10fachen des ermittelten IC₅₀- Wertes eine signifikante proliferationshemmende Wirkung.

Für Substanz B ergab sich bei einer Konzentration von IC₅₀ x 10 zu den Kontrollen eine Differenz der Extinktion von -23, 2 (95% CI -40,1 – (-6,2)), p = 0,008. (Abb. 5.21 a und b)

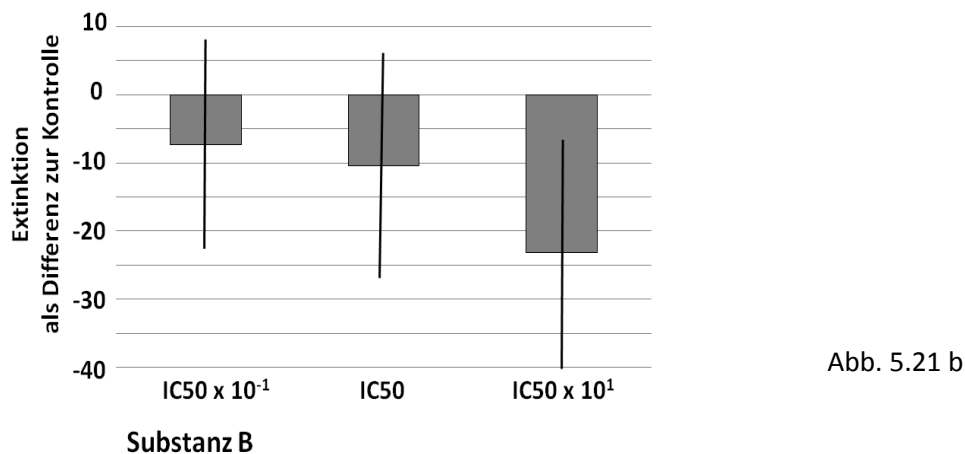
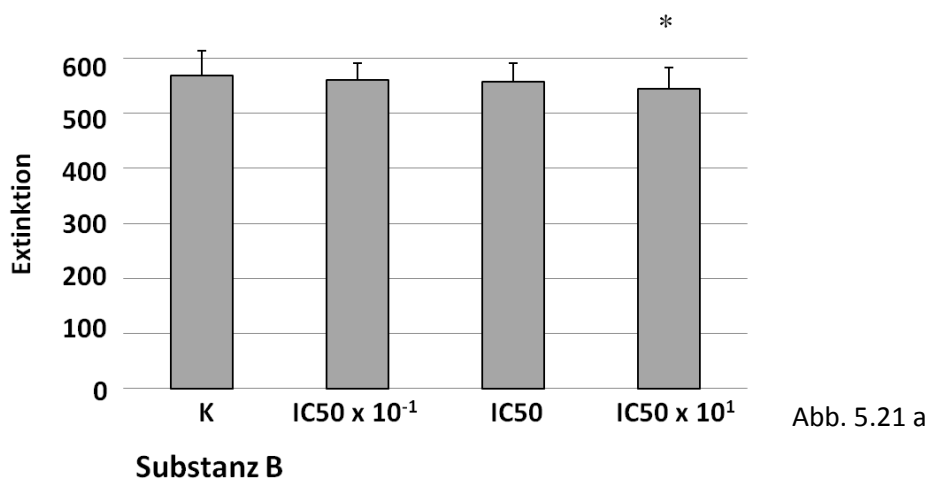


Abb. 5.21. NCI- h295- Zellen wurden jeweils 2x über 3 Tage in 96-Well Mikrotiterplatten mit Substanz B in aufsteigenden Konzentrationen, abhängig von dem ermittelten IC₅₀- Wert, inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl indirekt über mitochondriale Dehydrogenasen bestimmt, welche MTT- Substanz in photometrisch messbares Formazan umwandeln und die Extinktion der mit den Substanzen inkubierten Zellen mit der unbehandelten Kontrollen (K) verglichen. (a)

Die ermittelte Differenz zur Extinktion in den Kontrollen wurde zusammen mit dem entsprechenden 95% Konfidenzintervall (95% CI) graphisch aufgetragen. (b)

Für Substanz 5.1 zeigte sich bei der Konzentration $IC_{50} \times 10$ verglichen mit den Kontrollen eine Differenz der Extinktion von -20,2 (95% CI -38,1 – (-2,4)), $p = 0,027$.

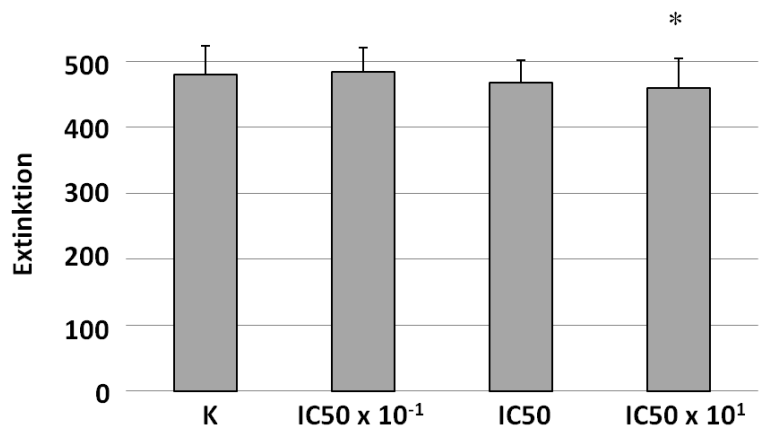


Abb. 5.22 a

Substanz 5.1

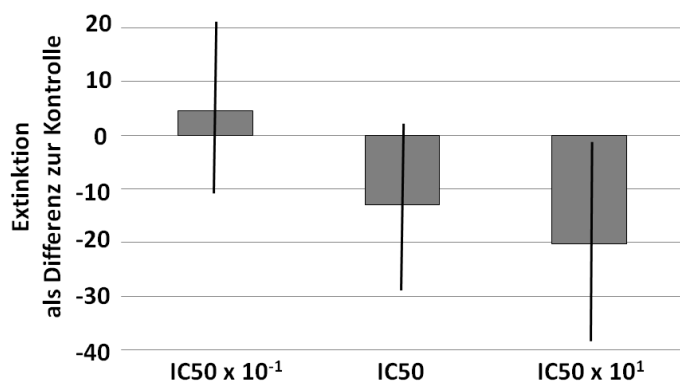


Abb. 5.22 b

Substanz 5.1

Abb. 5.22. NCI- h295- Zellen wurden jeweils 2x über 3 Tage in 96-Well Mikrotiterplatten mit Substanz 5.1 in aufsteigenden Konzentrationen, abhängig von dem ermittelten IC_{50} - Wert, inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl indirekt über mitochondriale Dehydrogenasen bestimmt, welche MTT- Substanz in photometrisch messbares Formazan umwandeln und die Extinktion der mit den Substanzen inkubierten Zellen mit der unbehandelten Kontrollen (K) verglichen. (a)

Die ermittelte Differenz zur Extinktion in den Kontrollen wurde zusammen mit dem entsprechenden 95% Konfidenzintervall (95% CI) graphisch aufgetragen. (b)

6. Diskussion

6.1 Stellenwert einer neuen und selektiven funktionellen Bildgebung in der Differenzialdiagnose des Primären Hyperaldosteronismus

Die Differenzialdiagnose des Primären Hyperaldosteronismus, als Voraussetzung für dessen spezifische Therapie, gestaltet sich nach wie vor schwierig. Während konventionelle Bildgebungsverfahren wie CT oder MRT nur eine sehr eingeschränkte Spezifität und Sensitivität aufweisen [44], kommt der funktionellen Bildgebung ebenfalls nur eine sehr untergeordnete Rolle zu. Die etablierte Nebennieren- Szintigraphie mit NP- 59 bzw. Scintadren blieb in ihrem Nutzen immer umstritten [131], ist zeitaufwändig, da die Messungen an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt werden müssen und bringt eine hohe Strahlenbelastung mit sich. [95] [¹⁸F]Fluorodeoxyglucose ([¹⁸F]FDG) ist in vielerlei Hinsicht für die Diagnostik adreneraler Läsionen geeigneter, liefert aber keinen Hinweis darauf, ob eine Läsion adrenocorticalen Ursprunges ist [132, 133].

Der selektive Nebennierenvenenkatheter, der als aktueller Goldstandard in der Subtyppdifferenzierung des PA gilt, ist dagegen ein invasives, zeit- und kostenintensives, sowie technisch aufwändiges Verfahren, das immer auf wenige Zentren beschränkt bleiben wird [134]. Entsprechend waren von den 59 an der Universitätsklinik Würzburg in den Jahren 2000 - 2009 durchgeführten Nebennierenvenenkathetern nur 47,5% technisch korrekt durchgeführt. Nach neueren Daten lässt sich zumindest die technische Durchführung unter anderem durch die Cortisol- Schnellmessung erheblich verbessern [50-52]. Entsprechende Weiterentwicklungen der Technik verlangen jedoch eine hohe Fallzahl und Expertise, welche nur an sehr wenigen Zentren vorhanden sein kann. Entsprechend der Prävalenz des Primären Hyperaldosteronismus mit 5-13% aller Hypertoniker [44], bezugnehmend auf eine Prävalenz der arteriellen Hypertonie in Deutschland zwischen 23% - 57% [135], was bei einer Population von 82,3 Millionen (Daten der Bundeszentrale für politische Bildung, 2008)

mindestens 1 Million Patienten mit PA in Deutschland erwarten lässt, ist eine Beschränkung der diagnostischen Maßnahmen auf so wenige Zentren nicht realistisch.

Auch im Rahmen der Durchführung in entsprechend versierten Zentren birgt dieses invasive Verfahren Komplikationen. Während der 59 in Würzburg durchgeführten Nebennierenvenenkatheter kam es zu 4 berichteten Komplikationen, einschließlich einer Ruptur der Nebennierenvene. In 2604 in 20 Zentren weltweit durchgeführten Nebennierenvenenkathetern wurde eine Rate von 0,61% an Rupturen der Nebennierenvene, abhängig von der Expertise des Untersuchers, berichtet [136]. Abgesehen von der technischen Problematik stellen einerseits die nach wie vor fehlende Standardisierung des Verfahrens und andererseits die für einen Goldstandard grundsätzlich nicht akzeptable Einschränkung der Sensitivität und Spezifität ein erhebliches Problem dar [53, 134]. Bei publizierten Sensitivitätsraten zwischen 43,2% und 100% mit einer Spezifität zwischen 55% und 100% [53, 137-139] dürften die Limitationen in der Auswertung der Nebennierenvenenkatheter noch deutlich unterschätzt sein, da die meisten retro- und prospektiven Untersuchungen keine oder nur eingeschränkte follow-up-Daten als Grundlage für die Bewertung der differenzialdiagnostischen Methoden, sondern das Ergebnis des Nebennierenvenenkatheters im Sinne eines differenzialdiagnostischen Goldstandards als Basis für die Bewertung anderer Verfahren zugrunde legen. Basierend auf Follow-up-Daten stellte sich bei der retrospektiven Analyse der Würzburger Katheterdaten heraus, dass in 16% der technisch zumindest partiell erfolgreichen und damit für die Differenzialdiagnostik verwertbaren Katheter entweder trotzdem keine klare Differenzialdiagnose gestellt werden konnte (9%) oder eine unter Zugrundelegung des Ergebnisses gestellte Diagnose im weiteren Verlauf wieder revidiert werden musste (7%). So kommen zu den weitreichenden technischen Limitationen auch noch Einschränkungen in der diagnostischen Wertigkeit des Nebennierenvenenkatheters.

Dies führte dazu, dass zahlreiche Autoren bereits Algorithmen erarbeiteten, welche neben der Bildgebung klinische Patientendaten, Laborwerte und weitere

Testverfahren, wie z.B. den Kochsalzbelastungs- oder Orthostasetest mit in die Differenzialdiagnose einbeziehen. Hierdurch kann, verglichen mit der konventionellen Bildgebung alleine, bereits eine hinreichende Steigerung der Sensitivität und Spezifität zur Detektion aldosteronproduzierender Tumore erzielt werden. [140-143] Mit entsprechenden Algorithmen könnte die Notwendigkeit eines Nebennierenvenenkatheters somit auf ein ausgewähltes Patientenkollektiv eingeschränkt werden. Damit wäre es möglich, die Durchführung des Nebennierenvenenkatheters auf sehr wenige spezialisierte Zentren zu beschränken und die Mehrzahl der Patienten algorithmusbasiert auch außerhalb dieser Zentren zu diagnostizieren und therapieren.

Ein erheblicher Fortschritt in dieser „konservativen“ Differenzialdiagnostik des Primären Hyperaldosteronismus wäre eine Weiterentwicklung der funktionellen Bildgebung.

6.2 Funktionale adrenalen Bildgebung basierend auf Etomidat und Derivaten

6.2.1 C11- Meto-/ F18-FETO- PET und 123I-IMTO- SPECT als neuere Bildgebungsverfahren zur Detektion adrenaler Tumoren

Erstmals 1978 wurden radioaktiv markierte Enzyminhibitoren, durch Beierwaltes *et al.* berichtet, für die Nebennierenbildung angewandt [144]. In Folge wurden [¹¹C]Etomidat und [¹¹C]Metomidat als Tracer für die PET- Bildgebung weiterentwickelt [145-148].

Die Sedativa Etomidat und Metomidat binden bereits in nicht sedierender Dosierung an die adrenalen CYP11B- Isoenzyme und führen zu einer anhaltenden Inhibition der Nebennierenrindenfunktion. Dies zeigt die hohe Affinität der Substanzen für adrenales Gewebe. [149] Wegen der deutlich einfacheren Radiosynthese wurde nur [¹¹C]Metomidat weiter entwickelt, welches in der Positronenemissionstomographie (PET) bereits seinen Stellenwert für die adrenale Bildgebung hat. [150] In einer klinischen

Inzidentalomstudie zeigte sich für [¹¹C]Metomidat entsprechend den Erwartungen ein hoher Uptake in benignen und malignen adrenocorticalen Tumoren und sehr schwacher oder fehlender Uptake in Metastasen und Tumoren anderen geweblichen Ursprunges. In dieser publizierten Serie von 212 [¹¹C]Metomidat-Positronenemissionstomographien an 173 Patienten mit Nebennierentumoren erwies sich die Untersuchungsmethode als sehr spezifische (Spezifität 0,96) und sensitive (Sensitivität 0,89) Methode, die Tumoren ab 1 cm Durchmesser erfassen kann. [151] In der spezifischen Evaluation hinsichtlich der Eignung zur PET- Diagnostik bei Nebennierenkarzinomen zeigte [¹¹C]Metomidat bei adrenokortikalen Karzinomen eine so hohe Traceraufnahme, dass auch Läsionen dargestellt werden konnten, die in der konventionellen Bildgebung nicht detektiert wurden. Aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit von C-11 (20 Minuten) ist für diese Methodik jedoch ein Zyklotron vonnöten [152]. Auch hinsichtlich der Pharmakokinetik ist die Verwendung eines längerlebigen Radionuklids sinnvoll, da die maximale Anreicherung im Tumor erst nach 40 Minuten erreicht wird. [145] Abhilfe schafft hier die Entwicklung eines mit Fluor-18 markierten Tracers. Es gelang mit (R)-1-(1-Phenylethyl)-1H-imidazol-5-carbonsäure-2-[¹⁸F]fluorethylester ([¹⁸F]FETO), ein radiofluoriertes Analog von Metomidat, zu synthetisieren. *In vivo* Untersuchungen zeigten eine sehr hohe Anreicherung in Nebennieren der Ratte [153]. In einer PET- Studie mit [¹⁸F]FETO bei gesunden Probanden überzeugte die Substanz durch hohe Affinität für die adrenalen CYP11B- Enzyme bei längerer Halbwertszeit [154]. Aber auch mit dem Ersatz von [¹¹C]Metomidat durch [¹⁸F]FETO bleiben Verfügbarkeit und Kosten einer PET- Untersuchung generell weiterhin problematisch. Die apparativen Voraussetzungen für die Szintigraphie mit [¹²³I]Iodmetomidat, einem ebenfalls hochspezifischen Tracer für die Detektion adrenalen Gewebes, sind dagegen flächendeckend gegeben. [155]

Als leistungsfähigstes nuklearmedizinisches Bildgebungsverfahren hinsichtlich Sensitivität und räumlicher Auflösung bietet sich für die Differenzialdiagnose speziell des PA dennoch vorrangig die PET-Untersuchung an [88].

6.2.2 *In vitro*- Testung von Etomidat und Derivaten

Für Etomidat (ETO) und seine Derivate Metomidat (MTO), Iodmetomidat (IMTO) und Fluoroethyl-Etomidat (FETO) ist mehrfach eine hohe adrenostatische Potenz mit Inhibition von CYP11B1 und CYP11B2 beschrieben. Inkubation von NCI- h295 Zellen mit diesen Substanzen führt zu einer Inhibition der Cortisol- und Aldosteronproduktion. [156] In der Literatur lange nicht beschrieben war die inhibitorische Potenz für CYP11B2. Die Inkubation von NCI- h295- Zellen mit Etomidat führte zu einer deutlichen, konzentrationsabhängigen Inhibition der Aldosteronproduktion. Damit war der Effekt von ETO auf die Aldosteronproduktion in dieser Zelllinie weitaus ausgeprägter als der aller weiteren getesteten Aldosteronsynthaseinhibitoren. Dies erklärt auch, warum in einer Studie zum [11C]Metomidat- PET eine besonders hohe Anreicherung in Conn- Adenomen beschrieben ist [151]. Durch die ebenfalls potente Inhibition von CYP11B1 und die damit verbundene Hintergrundaktivität stellen Etomidat und Derivate aber nicht die idealen Ausgangssubstanzen für die bildgebende Differenzialdiagnose des PA dar.

Zur Evaluation der grundsätzlichen Eignung der im Rahmen dieser Arbeit stabil transfizierten Y1- CYP11B1- und Y1-CYP11B2 Zellen für die Testung spezifischer Aldosteronsynthaseinhibitoren wurden auch diese stabil transfizierten murinen Nebennierenkarzinom- Zellen zunächst mit ETO und METO inkubiert, wobei für die Inhibition von CYP11B2 jeweils IC50 Werte im nanomolekularen Bereich ermittelt werden konnten:

ETO 4,03 nmol/l (SD \pm 0,37); METO 18,3 nmol/l (SD \pm 1,05).

Die IC50- Werte für die Inhibition von CYP11B1 lagen ebenfalls in diesem Bereich:

ETO 1,45 nmol/l (SD \pm 0,07); METO 4,27 nmol/l (SD \pm 3,56).

In weiterführenden Studien konnten diese Ergebnisse schließlich bestätigt werden, wobei sich in den stabil transfizierten Y1- Zellen für Etomidat und seine

Derivate folgenden IC50- Werte und Selektivitätsfaktoren für die Inhibition von CYP11B2 ergaben (Tab. 6.1). [156]

	IC50 [nmol/l] CYP11B1	IC50 [nmol/l] CYP11B2	Selektivitätsfaktor
ETO	0,99 ± 0,62	4,8 ± 0,21	0,21
METO	4,6 ± 2,39	16,7 ± 3,28	0,28
FETO	2,94 ± 1,42	20,2 ± 9,67	0,15
IMTO	1,83 ± 1,83	6,9 ± 1,37	0,27

Tab. 6.1. IC50- Werte und Selektivitätsfaktoren für die Inhibition von CYP11B2 für Etomidat und Derivate getestet in stabil transfizierten Y1- CYP11B1 und Y1-CYP11B2 Zellen.

Etomidat und seine Derivate stellen derzeit die Substanzen mit der höchsten inhibitorischen Wirkung auf die adrenocorticalen CYP11B- Enzyme dar. Dabei konnte für die Derivate ein ähnliches Wirkprofil wie für Etomidat beschrieben werden, mit Inhibition beider CYP11B Enzyme bei potenterer Inhibition von CYP11B1.

Die in dem vorliegenden Testsystem ermittelten IC50 Werte für Etomidat und Metomidat, die inhibitorische Potenz darstellend, dienten daher im weiteren als Referenz und Zielvorgabe für die Entwicklung eines potenten Aldosteronsynthaseinhibitors.

6.3 Radioaktiv markierte Aldosteronsynthaseinhibitoren

6.3.1 Grundsätzliche Eignung zur funktionellen Bildgebung bei Primärem Hyperaldosteronismus

Während die in der Vergangenheit zur Visualisierung von Conn- Adenomen angewandte NP-59 Szintigraphie [157] aus bereits dargestellten Gründen

keinen Stellenwert mehr in der Diagnostik des PA besitzt, untersuchen neuere Studien den Stellenwert des [11C]Metomidat- PET in diesem Zusammenhang [151, 158, 159]. Burton *et al.* verglichen die PET Daten von 39 Patienten mit PA und 5 mit endokrin inaktiven Adenomen mit dem Ergebnis des ebenfalls durchgeführten Nebennierenvenenkatheters und fanden für [11C]Metomidat-PET zur Detektion aldosteronproduzierender Adenome eine Sensitivität von 76% bei einer Spezifität von 87% [158].

Das Enzym CYP11B2, die Aldosteronsynthase, wird spezifisch in aldosteronproduzierendem Gewebe exprimiert. Die Expression ist hierbei sowohl in aldosteronproduzierenden Tumoren als auch in bilateralen Hyperplasien als etwa 10fach höher beschrieben verglichen mit normalem Nebennierengewebe [160, 161]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte mittels semiquantitativer Realtime-PCR die höchste Expression von CYP11B2 in aldosteronproduzierenden Tumoren nachgewiesen werden. Im Mittel fand diese sich auch hier ca. 10fach höher als in den anderen untersuchten Gewebetypen. Die niedrigsten Expressionslevel für CYP11B2 fanden sich erwartungsgemäß in endokrin inaktiven Adenomen und Nebennierenkarzinomen, in welchen ein hoher Anteil an nekrotischem und entdifferenziertem Gewebe vorliegt. Bei zwar hoher Variabilität der CYP11B2- Expression in den aldosteronproduzierenden Tumoren war diese jedoch in jeder der 5 untersuchten Gewebeproben sehr hoch. Damit ist die grundsätzliche Eignung von CYP11B2 als Ansatzstelle für einen Tracer zur bildgebenden Differenzialdiagnose des PA gegeben.

Durch die autonome Hormonproduktion in aldosteronproduzierenden Tumoren liegt nahe, dass die Genexpression von CYP11B2 im umgebenden und kontralateralen Nebennierenrindengewebe, im Sinne eines physiologischen negativen Feedbacks, herunterreguliert ist. Gelingt es also, einen Tracer zu finden, der spezifisch die Aktivität der Aldosteronsynthase darstellt, ist zu erwarten, dass die Differenzierung zwischen den beiden Hauptformen des PA sicher gelingen sollte, da bei einer einseitigen Erkrankung der Tracer- Uptake in der kontralateralen Nebenniere aufgrund des fehlenden Zielenzym vermindert sein sollte und damit eine eindeutige Seitendifferenz zu erwarten wäre.

Die Schwierigkeit bei der Entwicklung selektiver Aldosteronsynthaseinhibitoren liegt in der 93%igen Homologie der Aminosäuresequenz von CYP11B1 und CYP11B2 [16]. Da eine Inhibition von CYP11B1 aber zu einer potenziell lebensbedrohlichen Glukokortikoid- Defizienz führen könnte, liegt viel Augenmerk der Forschung derzeit auf der Entwicklung von neuartigen Substanzen mit möglichst hohem Selektivitätsfaktor für die Inhibition von CYP11B2. Da selektive Aldosteronsynthaseinhibitoren sich erst seit jüngster Zeit (mit einem Fokus auf der Therapie der Herzinsuffizienz) in Entwicklung befinden, finden sich in der Literatur noch keinerlei Daten zu entsprechend radioaktiv markierten Inhibitorsubstanzen, welche Einzug in die adrenale Bildgebung halten könnten.

6.3.2 Aldosteronsynthaseinhibitoren als Basis für die Entwicklung eines selektiven Tracers

Die Arbeitsgruppe um Prof. R. W. Hartmann am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Universität des Saarlandes ist weltweit führend an der Entwicklung selektiver Aldosteronsynthaseinhibitoren beteiligt. *In vitro* konnten bereits zahlreiche Substanzen synthetisiert werden, die sich CYP11B2 gegenüber hochaffin zeigen und dabei IC₅₀- Werte für die Inhibition von CYP11B2 bis 3 nmol/l aufweisen. Dabei zeigten sich die publizierten Substanzen ebenfalls sehr selektiv hinsichtlich der Inhibition von CYP11B2 mit Selektivitätsfaktoren von >1400. Ebenfalls im Zellkulturmodell zeigte sich im Rahmen einer ersten Testung eine gute Penetranz der Zellmembran als Voraussetzung für eine effektive Wirksamkeit der jeweiligen Verbindung. Dabei konnte eine Bindung an weitere steroidogene oder hepatische Cytochrom P450- Enzyme ausgeschlossen werden. [82-84, 86, 87, 162] Die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Substanzen mussten zunächst mit einem Fluoratom substituiert werden, um sie der PET- Bildgebung mit ¹⁸F zugänglich zu machen.

6.4 Das geeignete Testsystem zur Evaluation von Aldosteronsynthese-Inhibitoren

Die Entwicklung eines geeigneten Testsystems für die Evaluation der synthetisierten Aldosteronsyntheseinhibitoren dient zum einen der Möglichkeit genauerer Studien zur adrenalen Wirkung und intrazellulären Verteilung der Substanzen. Außerdem sollte das ideale Testsystem die Möglichkeit bieten, eventuelle Ansatzpunkte zur Modifikation der Aufnahme und Verteilung der Testsubstanzen in die Zelle zu evaluieren. Darüber hinaus muss die Selektivität und Potenz der fluorierten Inhibitoren im Vergleich zu den Originalsubstanzen dargestellt werden. Die Analyse der publizierten Originalsubstanzen erfolgte in V79MZ- Hamster- Lungenfibroblasten, welche stabil mit dem humanen CYP11B1 und CYP11B2 transfiziert wurden. Diese wurden 1995 von Denner *et al.* entwickelt [163, 164].

	IC50 [nmol/l] CYP11B2	Selektivitätsfaktor
A	10	245
B	14	207
5	12	451

Tab. 6.2. Potenz und Selektivitätsfaktor für die Inhibition von CYP11B2 der 3 für diese Arbeit verwendeten Originalsubstanzen, getestet in V79MZ- Hamsterzellen [82, 83]

Interessanterweise waren diese nicht- steroidogenen Lungenfibroblasten-Zellen in der Lage, die CYP11B1 und CYP11B2- abhängige Konversion von Vorläufersteroiden ohne zusätzliche heterologe Expression der korrespondierenden Elektronen- Donor- Systeme (AdR und Adx) durchzuführen. Dennoch können mögliche Einflüsse von nebennieren-spezifischen Kofaktoren auf die adrenale Steroidogenese in den V79MZ- Hamsterzellen nicht berücksichtigt werden, was die Aussagekraft über die

Wirkung der Inhibitorsubstanzen auf die Steroidogenese womöglich limitiert. Hinsichtlich der o.g. weiterführenden Fragestellungen ist daher ein nebennierenrindenspezifisches Zellkulturmodell wünschenswert. Durch die Homologie der beiden CYP11B Enzyme und aufgrund des benötigten hohen Selektivitätsfaktors für die Inhibition von CYP11B2 bieten sich Tiermodelle wegen der Abweichungen der Enzymstruktur für die Evaluation der Testsubstanzen weniger an.

6.4.1 Evaluation der Aldosteronsynthaseinhibitoren in NCI h295 Zellen

Davon ausgehend, dass humane Nebennierenrindenzellen das ideale Testsystem für die Evaluation der Inhibitorsubstanzen darstellen würden, sich jedoch aufgrund ihrer Verfüg- und Haltbarkeit nur begrenzt eignen, ist das der Physiologie der Nebennierenrinde am nächsten kommende Zellkulturmodell zu suchen. NCI- h295 Zellen wurden als ein gutes Modell zur Analyse der Steroidogenese postuliert [165]. In Folge wurde dieses Zellkulturmodell vielfach zur Studie des Einflusses verschiedener Substanzen auf die humane Steroidhormonproduktion angewandt [166-174]. Auch Müller- Vieira *et al.* studierten die Effekte und Nebeneffekte verschiedener neu synthetisierter Aldosteronsynthaseinhibitoren an dieser Zelllinie [175].

Für die im Rahmen dieser Arbeit in NCI- h295- Zellen getesteten Acenaphthénylpyridine A und B und das Naphthylpyridin 5 zeigte sich eine deutliche inhibitorische Wirkung auf die Aldosteronproduktion. Folgende IC₅₀-Werte [nmol/l] konnten ermittelt werden: ETO 2,25 (SD ± 0,35); A 103,7 (SD ± 66,47); B 316,8 (SD ± 174,87); 5 193,4 (SD ± 0,78). Verglichen mit Etomidat lagen die ermittelten IC₅₀-Werte jedoch ca. um den Faktor 100 höher und entsprachen damit auch nicht der in den V79MZ- Hamster- Lungenfibroblasten ermittelten Potenz (Tab. 6.2).

Problematisch an NCI- h295- Zellen als Testsystem für die Evaluation selektiver Aldosteronsynthaseinhibitoren ist das Vorhandensein aller notwendigen Enzyme für die adrenale Steroidogenese, anders als in der normalen

Nebennierenrinde, in einem einzigen Zellsystem. Wo physiologisch in der Nebennierenrinde die zonale Gliederung eine Kontrollfunktion übernimmt, stehen Substrate hier nicht nur einem Zielenzym zur Verfügung. So ist Desoxycorticosteron beispielsweise Substrat für sowohl CYP11B1 als auch CYP11B2. Auch die Regulation der Enzymexpression ist hierdurch teilweise abweichend. [176]. Damit ist es kaum möglich den Effekt eines einzelnen Enzyms und die Wirkung einer Inhibitorsubstanz auf dieses zu bestimmen. Darüber hinaus kommt es durch die Blockade einzelner Enzyme zur Hochregulation anderer Pfade der Steroidogenese [175]. Vor diesem Hintergrund scheinen NCI- h295 Zellen, obwohl die Steroidogenese physiologisch abbildend, kein verlässliches Testsystem zu sein für die Evaluation der inhibitorischen Potenz einer Substanz auf ein spezifisches Enzym der Steroidhormonbiosynthese.

6.4.2 Herstellung einer stabil transfizierten Y1-CYP11B1 und Y1-CYP11B2 Zelllinie

Um die selektiven Aldosteronsyntheseinhibitoren in einer Zelllinie mit adrenocorticalem Hintergrund evaluieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine murine adrenocorticale Y1- Zelllinie, welche CYP11B1 bzw. CYP11B2 stabil exprimiert, etabliert. Diese Y1- Zelllinie stammt von dem nur wenig entarteten Tumor einer adulten, männlichen LAF1 (C57L x A/HeJ) Maus ab und exprimiert die murinen CYP11B- Enzyme auf kaum detektierbarem Level. Die entsprechende cDNA für humanes CYP11B1 und CYP11B2 wurde hierfür in den pcDNA3.1zeo(+)- Vektor kloniert, der mit dem CMV- Promotor eine hohe Expressionsrate des Transgens ermöglicht und mittels einer Zeocin- Resistenz- Kasette die Transfektion unter Verwendung des Lipidreagenzes Lipofectamine ermöglicht. Die Expression der CYP11B – Enzyme wurde auf Proteinebene mittels Westernblot und auf mRNA- Ebene mittels Realtime- PCR untersucht. Anschließend wurde die Hormonproduktion nach Zugabe entsprechender Vorläufersubstanzen evaluiert und so die für die weiteren Experimente am besten geeignete Zellkolonie ausgewählt. Entsprechend

konnte mit dem Klon 14 für die Y1-CYP11B1 Zelllinie und dem Klon 9 für die Y1-CYP11B2 Zelllinie sehr hohe Enzymexpression auf mRNA- und Proteinebene mit den vergleichsweise höchsten Konzentrationen an Cortisol bzw. Aldosteron im Zellkulturüberstand gezeigt werden. Dies bot die optimale Grundlage für eine differenzierte Untersuchung der Wirkung von ausgewählten Aldosteronsynthaseinhibitoren in verschiedenen Konzentrationen auf die Cortisol- bzw. Aldosteronsekretion der Zellen.

Vor Durchführung der Substanztestungen war die Inkubation der beiden Zelllinien mit den Vorläufersubstanzen RSS und DOC in verschiedenen Konzentrationen über mehrere Zeiträume notwendig, um die optimale Konzentration und die geeignete Dauer der Versuchsdurchführung zu ermitteln. Die Konzentration an Vorläufersubstanz musste so gewählt werden, dass zum einen die Kreuzreaktion bei der Bestimmung von Cortisol und Aldosteron möglichst niedrig gehalten wurde und zum anderen die Konzentration an produziertem Hormon im Zellkulturüberstand möglichst hoch ausfiel. Die ideale Inkubationszeit entsprach dem weitestgehenden Erreichen eines Plateaus bezüglich der endgültigen Hormonkonzentration.

6.4.3 Vergleichende Eignung der verwendeten Testsysteme

Während für Etomidat in NCI- h295 Zellen ein mit dem in stabil transfizierten Y1- CYP11B2 Zellen vergleichbarer IC₅₀- Wert für die Inhibition von CYP11B2 ermittelt werden konnte (2,25 (SD ± 0,35) vs. 4,03 (SD ± 0,37)), lagen die IC₅₀-Werte für die Aldosteronsynthaseinhibitoren in NCI- h295 Zellen deutlich höher als in V79MZ- Hamsterzellen oder den stabil transfizierten Y1-CYP11B2- Zellen. Zur reinen Evaluation von Potenz und Selektivität schienen daher die stabil transfizierten Y1- CYP11B1 und Y1- CYP11B2- Zellen aufgrund der konkreten Abbildung eines einzelnen Enzymsystemes verlässlichere Ergebnisse zu liefern. So wurden die in dieser Arbeit getesteten Aldosteronsynthaseinhibitoren auch zunächst in den stabil transfizierten Y1- CYP11B- Zellen getestet.

Auffallend war jedoch auch, dass die IC₅₀-Werte sowohl für die Inhibition von CYP11B2 als auch von CYP11B1 in den stabil transfizierten Y1-CYP11B-Zellen trotzdem deutlich höher lagen als für die V79MZ-Hamsterzellen publiziert (Tab. 6.2). Stellvertretend dargestellt sei dieser Sachverhalt durch die potenteste Originalsubstanz, das Acenaphthenylpyridin A, für welche ein IC₅₀-Wert und Selektivitätsfaktor für die Inhibition von CYP11B2 von 10 nmol/l bzw. 245 publiziert ist [83]. Mit Hilfe der stabil transfizierten Y1-Zellen konnte in dieser Arbeit ein IC₅₀-Wert von 57 nmol/l bei einem Selektivitätsfaktor von 27 ermittelt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre ebenfalls das adrenale Milieu mit die Steroidogenese beeinflussenden Kofaktoren, welche in Y1 Zellen, nicht aber in den V79MZ-Hamsterzellen vorhanden sind. Unter dieser Hypothese dürfte das Modell der stabil transfizierten Y1-Zelllinien die Gegebenheiten in der humanen Nebenniere und damit die tatsächlichen Bindungseigenschaften eines zu etablierenden PET-Tracers besser abbilden.

Zur weiteren Evaluation von Aldosteronsynthaseinhibitoren mit geeignet hoher Potenz bzgl. der inhibitorischen Wirkung auf CYP11B2 und entsprechend hohem Selektivitätsfaktor bietet sich ein Modell an, welches die physiologische Umgebung der normalen Nebenniere noch besser abbildet als die murine Y1-Zelllinie. Daher wurden die Proliferationsstudien für die ersten getesteten Aldosteronsynthaseinhibitoren an NCI-h295 Zellen durchgeführt.

6.5 Selektivität und Potenz der getesteten Inhibitorsubstanzen

Entsprechend der für Etomidat und Metomidat ermittelten IC₅₀-Werte für die Inhibition von CYP11B1 und CYP11B2 im Bereich von 4,03 nmol/l bis 18,3 nmol/l und der für radioaktiv markierte Derivate dieser Substanzen bekanntermaßen hohen Sensitivität in der Detektion von Läsionen adrenocorticalen Ursprungs, sollte die Potenz des geeigneten Aldosteronsynthaseinhibitors zur bildgebenden Differenzialdiagnose des PA vergleichbar hoch sein. Unter den fluorierten und damit für die PET-Bildgebung geeigneten Substanzen erwies sich das Naphthylpyridin 5.1 mit einem IC₅₀-

Wert von 224 nmol/l (SD \pm 127) als potentester Inhibitor der Aldosteronsynthese CYP11B2. Lediglich eine weitere der fluorierten Substanzen, das Acenaphthenylpyridin B.1, konnte CYP11B2 inhibieren. Dies allerdings mit weitaus geringerer Potenz und einem IC50- Wert von 901 nmol/l (SD \pm 49). Bereits für [C11]- Metomidat hatte sich im Rahmen von *in- vivo* Studien eine besonders hohe Tracer- Anreicherung in Conn- Adenomen gezeigt [177]. In den stabil transfizierten Y1-CYP11B Zelllinien zeigten sich Etomidat und Metomidat etwas selektiver für die Inhibition von CYP11B1 mit Selektivitätsfaktoren zwischen 2,78 und 4,29, was bezüglich der Inhibition von CYP11B2 Selektivitätsfaktoren zwischen 0,23 und 0,36 entspricht. Für die beiden potenten fluorierten Inhibitorsubstanzen lagen die Selektivitätsfaktoren für die Inhibition von CYP11B2 über 10, entsprechend einem mindestens 10fach höheren IC50- Wert für die Inhibition von CYP11B1. Dabei zeigte keines der fluorierten Derivate der Aldosteronsynthese- Inhibitoren eine Inhibition der Cortisolproduktion von mehr als 15% im Bereich der höchsten getesteten Konzentration an Inhibitorsubstanz. Aufgrund der fehlenden Inhibition der Cortisol- Produktion ist es in dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Testsystem nicht möglich, die Selektivitätsfaktoren der getesteten fluorierten Substanzen untereinander zu vergleichen. Bei jedoch deutlicher Selektivität hinsichtlich der Inhibition von CYP11B2 und einem diesbezüglichen IC50- Wert von 224 nmol/l ist das Naphthylpyriden- Derivat 5.1 die für die Entwicklung eines radioaktiv markierten PET- Tracers am besten geeignete der getesteten Substanzen.

6.6 Antiproliferativer Effekt der Enzyminhibitoren in NCI- h295 Zellen

Etomidat und seine Derivate zeigen einen dosisabhängigen antiproliferativen Effekt in NCI- h295 Zellen. Dieser ist allerdings erst in Konzentrationsbereichen deutlich, in denen die gesamte Steroidogenese blockiert wird. Vor diesem Hintergrund wurden mit den Originalsubstanzen sowie deren fluorierten Derivaten mit aldosteroninhibitorischer Wirkung ein MTT- Test in NCI- h295 Zellen durchgeführt, um den antiproliferativen Effekt der Inhibitorsubstanzen zu evaluieren. Interessant ist hierbei z.B. die Fragestellung inwieweit der

inhibitorische Effekt einer getesteten Substanz auf die Hormonproduktion nicht ausschließlich auf die direkte enzyminhibitorische Wirkung zurückzuführen ist, sondern auch durch den antiproliferativen Effekt mitbedingt sein könnte. Darüber hinaus muss eine adrenostatische Wirkkomponente vor der *in vivo*-Testung bzw. klinischen Anwendung genauer untersucht und mitberücksichtigt werden.

Getestet wurden die Substanzen in 3 verschiedenen Konzentrationen: der des zuvor ermittelten IC₅₀- Wertes sowie einer Zehnerpotenz darüber und darunter. Bei keiner der Substanzen konnte eine signifikante antiproliferative Wirkung im Bereich des IC₅₀- Wertes beobachtet werden. Einzig das fluorierte Naphthylpyridin-Derivat 5.1 und das Acenaphthenylpyridin B zeigten im Bereich der höchsten getesteten Konzentration eine signifikante antiproliferative Wirkung und damit dosisabhängige Hemmung der Proliferation von NCI-h295 Zellen. Bei annähernd fehlender inhibitorischer Wirkung auf CYP11B1 dürfte die Hemmung der Aldosteronproduktion für die potenteste fluorierte Substanz 5.1 trotz des zusätzlichen antiproliferativen Effekts hauptsächlich auf die selektive Inhibition von CYP11B2 zurückzuführen sein. Dennoch ist der beobachtete antiproliferative Effekt der Substanz im Rahmen weiterer Versuchsdurchführungen und deren Interpretation zu berücksichtigen.

6.7 Weiterführende Studien und Ausblick

Die Forschung zur Entwicklung selektiver Aldosteronsynthaseinhibitoren, hauptsächlich für die medikamentöse Therapie der Herzinsuffizienz, bringt stetig neue und vielversprechende Substanzen hervor [162, 178-181]. Dies schafft die Grundlage für die Entwicklung weiterer fluoriertes (und iodierter) Derivate, welche in den entsprechenden Testsystemen auf ihre Eignung als radioaktiv markierte Tracer für die PET (oder SPECT) Bildgebung untersucht werden können. Werden entsprechend geeignete Substanzen identifiziert so muss dann die Radiosynthese der „heißen“ Verbindungen erfolgen. Bereits etabliert in unserer Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin ist die Synthese von

[^{123/125/131}I]Iodmetomidat [182] und [¹⁸F]Fluoretomidat. Vor der Vorbereitung entsprechend geeigneter Aldosteronsynthesenhibitoren zur Bildung von aldosteronproduzierenden Nebennierentumoren beim Menschen müssen zunächst noch zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Experimente durchgeführt werden: Die entsprechenden Substanzen müssen Toxizitäts- und Mutagenitätstestungen unterzogen und deren Einfluss auf die Steroidogenese in NCI- 295 Zellen untersucht werden. Für weitere Studien ist die Entwicklung eines Conn- spezifischen Tiermodelles vonnöten. Es existiert mit dem Y1-LAF1- Modell bereits ein Nebennierentumor- Modell der Maus [183]. Die Etablierung eines entsprechenden Conn- Adenom- Modelles ist für die weitere Evaluation der Substanzen vonnöten. Darüber hinaus müssen mit ausgewählten Substanzen Biodistributionsexperimente im Mausmodell durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang gilt es die target/non target Verhältnisse für den Tracer- Uptake zeitabhängig darzustellen, um die Kinetik des Tracers für die klinische Anwendung und Interpretation zu studieren.

Durch die hohe Aufnahme von [¹³¹I]Iodmetomidat in adrenokortikales Gewebe ist auch eine Option zur Radioiodtherapie von malignen Nebennierenrindentumoren gegeben [155]. Entsprechend wäre, für geeignete iodidierte Aldosteronsynthaseinhibitoren, ein therapeutischer Ansatz für Patienten mit PA denkbar. So könnte sich eine Radioiodtherapie hier bei z.B. aufgrund einer Niereninsuffizienz medikamentös nur schwer einstellbaren Formen des PA oder bei aldosteronproduzierenden Nebennierenkarzinomen anbieten. Damit hat die Entwicklung von iodidierten Aldosteronsynthaseinhibitoren trotz der eingeschränkten Sensitivität der SPECT bei hoher Strahlenbelastung womöglich dennoch einen gewissen Stellenwert.

6.8 Limitationen

Trotz der potenten aldosteroninhibitorischen Wirkung bei guter Selektivität ist die potenteste der getesteten Substanzen, das fluorierte Naphthylpyridin 5.1, mit einem deutlich höheren IC₅₀- Wert, weitaus weniger Potent als die

Referenzsubstanz Etomidat. Dies lässt hinsichtlich der Darstellbarkeit der ohnehin feinen Strukturen bei der PET Bildgebung Zweifel aufkommen und auf die Entwicklung und Testung weiterer, noch potenterer Aldosteronsynthase-Inhibitoren hoffen. In Conn- Adenomen und bilateralen Hyperplasien ist neben CYP11B2 auch CYP11B1 hoch exprimiert. Durch die generell hohe Expression von CYP11B1 in der normalen Nebenniere bei entsprechend zu erwartender Herunterregulierung von CYP11B2 im peradenomatösen Gewebe bzw. der kontralateralen Nebenniere ist zusätzlich eine hohe Potenz und Selektivität der Inhibitorsubstanzen zum Ausschalten der zu erwartenden Hintergrundaktivität notwendig. Bei den im Rahmen dieser Arbeit getesteten Substanzen war nach Fluorierung ein deutliches Absinken der inhibitorischen Potenz zu beobachten. Insgesamt kann daher die hier erfolgte Substanztestung nicht mit einem zufriedenstellenden Ergebnis aufweisen, so dass die Entwicklung und Testung weiterer Substanzen zur Findung eines geeigneten Inhibitors folgen muss.

Darüber hinaus finden sich Conn- Adenome häufig in einer Größe $< 1\text{cm}$, was selbst im Falle der PET- Bildgebung mit C11- Metomidat, wo eine optimal geeignete Substanz bereits gefunden wurde, an die Grenzen der Darstellbarkeit stößt. Mit zu erwartender Suppression des Tracer- Uptakes in der kontralateralen Nebenniere kann jedoch möglicherweise auch bei sehr kleinen Läsionen eine dem Nebennierenvenenkatheter ebenbürtige Seitendifferenz im Uptake erwartet werden. Hiermit ist jedoch ebenfalls wieder ein erheblicher Interpretationsspielraum der Ergebnisse einer solchen Bildgebung mit nachfolgend weiteren benötigten Studien zu erwarten.

Sollte es gelingen eine PET Bildgebung zur Differenzialdiagnose des PA mithilfe selektiver Aldosteronsynthaseinhibitoren zu etablieren, so wird diese zwar weniger untersucherabhängig und nicht invasiv verglichen mit dem selektiven Nebennierenvenenkatheter sein, aber trotz vergleichbar besserer Verfügbarkeit weiterhin nur größeren Zentren vorbehalten sein. Dennoch würde die Entwicklung der Methodik in der komplizierten Differenzialdiagnostik des PA wichtigen zusätzlichen Informationsgewinn und breitere Verfügbarkeit ermöglichen.

7. Zusammenfassung

5 – 13% aller Hypertoniker leiden an einem Primären Hyperaldosteronismus (PA), was diese Erkrankung zu der häufigsten Form sekundärer Hypertonie macht. Die Subtyppdifferenzierung dient der Unterscheidung zwischen unilateraler, operativ zu therapierender und bilateraler, medikamentös zu therapierender Form. Der diagnostische Goldstandard in der Subtyppdifferenzierung, der selektive Nebennierenvenenkatheter, ist aufgrund seiner Limitationen immer wieder Gegenstand kontroverser Diskussionen. Während CT- und MRT- Bildgebung einen fester Bestandteil der Stufendiagnostik des PA darstellen, hat die funktionelle Bildgebung, PET und SPECT, hierbei noch keinen festen Platz. In der bildgebenden Darstellung der Nebennieren allgemein gewinnen diese Verfahren, vor allem auf der Basis von Etomidat und seinen Derivaten, zunehmend an Bedeutung. Beispiele hierfür sind ¹¹C- Meto- bzw. ¹⁸F- FETO- PET und ¹²³I- IMTO- SPECT.

Relativ neu in der Entwicklung sind selektive Aldosteronsynthaseinhibitoren. Problematisch hierbei ist die 93% Homologie in der Aminosäuresequenz von CYP11B1 und CYP11B2, der Aldosteronsynthase. Die dieser Arbeit zugrunde liegende Idee ist die Entwicklung eines funktionellen Bildgebungsverfahrens zur Differenzialdiagnose des PA auf der Basis fluorierter und iodierter Aldosteronsynthaseinhibitoren.

Mittels Realtime- PCR konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von CYP11B2 in aldosteronproduzierenden Tumoren dieses Enzym zu einem geeigneten Ansatzpunkt für radioaktiv markierte Tracer macht. Zur Evaluation geeigneter Substanzen wurde daher eine, humane CYP11B1 bzw. CYP11B2 stabil exprimierende Zelllinie auf Basis der murinen Y1- Nebennierenrindenkarzinom- Zellen, entwickelt. Dies gelang durch Klonierung der humanen Enzyme in den pcDNA3.1zeo(+)- Vektor und anschließende Transfektion mit Lipofectamine. Zur weiteren Substanztestung wurde jeweils der Klon mit hoher Expression der CYP11B Enzyme auf mRNA- und

Proteinebene bei gleichzeitig höchster Hormonkonzentration im Zellkulturüberstand ausgewählt. Inkubation dieser Zelllinien mit den CYP11B-Inhibitoren Etomidat und Metomidat erbrachte IC₅₀-Werte im nanomolekularen Bereich. In dem Testsystem stellte sich das fluoriierte Naphthenylpyridin-Derivat 5.1 als potentester und zugleich sehr selektiver Inhibitor von CYP11B₂ heraus, der erst ab einer Zehnerpotenz über der ermittelten IC₅₀ einen signifikanten antiproliferativen Effekt auf NCI-H295 Zellen ausübte.

Die stabil transfizierten Y1-CYP11B Zellen stellten sich als geeignetes Testsystem zur Evaluation von Potenz und Selektivität der Aldosteronsynthese-Inhibitoren heraus. Mit der Substanz 5.1 konnte bereits ein potenter und selektiver Inhibitor von CYP11B₂ entwickelt werden. Der IC₅₀-Wert für die Inhibition von CYP11B₂ lag für diese Substanz aber noch etwa um den Faktor 100 höher als für die Referenzsubstanz Etomidat, so dass die Entwicklung und Testung weiterer Inhibitoren folgen muss, bis eine geeignete Substanz für die funktionale Bildgebung zur Differenzialdiagnose des PA gefunden ist.

8. Anhang

Literaturverzeichnis

1. Fleischhauer K, Groscurth P: Nebennieren.
In: Drenckhahn D, Zenker W (Hrsg.): Benninghoff, Anatomie, Band 2: Niere, Reproduktionsorgane, endokrine Drüsen, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut. Urban und Schwarzenberg, Oldenburg. 1994, 15. Auflage: 200 – 8.
2. Kühnel W: Endokrines System: Nebennieren.
In: Fritsch H, Kühnel W (Hrsg.): Taschenatlas der Anatomie, Band 2: Innere Organe. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2000, 7. Auflage: 312 – 3.
3. Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA:
Morphological and functional studies of the paracrine interaction between cortex and medulla in the adrenal gland.
Microsc Res Tech. 1997, 36(6): 520 – 33.
4. Lüllmann-Rauch R: Nebenniere. In: Histologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2003, 1. Auflage: 362 – 6.
5. Hatano O, Takakusu A, Nomura M, Morohashi K:
Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1.
Genes Cells. 1996, 1(7): 663 – 71.
6. Sadler TW: Medizinische Embryologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2003, 10. Auflage: 425 – 6.
7. Barrett EJ: The Adrenal Gland.
In : Boron WF, Boulpaep EL: Medical Physiology: A Cellular and Molecular approach.
Sounders Elsevier, 2009. 2. Auflage: 1065 – 9.
8. Miller WL: Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA.
Mol Cell Endocrinol. 2002, 198(1-2): 7 – 14.
9. Miller WL: StAR search—what we know about how the steroidogenic acute regulatory protein mediates mitochondrial cholesterol import.
Mol Endocrinol. 2007, 21(3): 589-601.
10. Cherradi N, Brandenburger Y, Capponi AM:
Mitochondrial regulation of mineralocorticoid biosynthesis by calcium and the StAR protein.
Eur J Endocrinol. 1998, 139(3): 249 – 56.
11. Sewer MB, Waterman MR: Insights into the transcriptional regulation of steroidogenic enzymes and StAR.
Rev Endocr Metab Disord. 2001, 2(3): 269 – 74.

12. Voigt K: Endokrines System.
In: Klinke R, Pape HC, Silbernagl S (Hrsg.): Physiologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2005, 4. Auflage: 510 – 44.
13. Romagni P, Rossi F, Guerrini L, Quirini C, Santiemma V:
Aldosterone induces contraction of the resistance arteries in man.
Atherosclerosis. 2003, 166(2): 345 – 9.
14. Diederich S: Mineralokortikoidhochdruck/ Primärer Hyperaldosteronismus.
In: Schulte HM, Allolio B (Hrsg.): Praktische Endokrinologie.
Elsevier, München. 2010, 2. Auflage, 231 – 8.
15. Charmandari E, Brook CG, Hindmarsh PC: Why is management of patients with
classical congenital adrenal hyperplasia more difficult at puberty?
Arch Dis Child. 2002, 86(4): 266 – 9.
16. Payne AH, Hales DB: Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from
cholesterol to active steroid hormones.
Endocr Rev. 2004, 25(6): 947 – 70.
17. Hu MC, Hsu NC, El Hadj NB, Pai CI, Chu HP, Wang CK, Chung BC:
Steroid deficiency syndromes in mice with targeted disruption of Cyp11a1.
Mol Endocrinol. 2002, 16(8): 1943 - 50.
18. Curnow KM, Tusie-Luna MT, Pascoe L, Natarajan R, Gu JL, Nadler JL, White
PC:
The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in
the human adrenal cortex. *Mol Endocrinol*. 1991, 5(10): 1513 – 22.
19. Miller WL: Steroidogenic Enzymes.
In: Flück CE, Miller WL: Disorders of the Human Adrenal Cortex (Hrsg.).
Karger, Basel. 2008, 13. Auflage, 1 – 18.
20. Mesiano S, Coulter CL, Jaffe RB: Localization of cytochrome P450 cholesterol
side-chain cleavage, cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase, and
3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase steroidogenic enzymes in
human and rhesus monkey fetal adrenal glands: reappraisal of functional
zonation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993, 77(5): 1184 – 9.
21. Papadimitriou A, Priftis KN: Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal
axis. *Neuroimmunomodulation*. 2009, 16(5): 265 – 71.
22. Fuchs-Hammoser R, Schweiger M, Oelkers W:
The effect of chronic low-dose infusion of ACTH (1-24) on renin, renin-
substrate, aldosterone and other corticosteroids in sodium replete and deplete
man. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1980, 95(2): 198 – 206.
23. Fassnacht M, Hahner S, Hansen IA, Kreuzberger T, Zink M, Adermann K,
Jakob F, Troppmair J, Allolio B:
N-terminal proopiomelanocortin acts as a mitogen in adrenocortical tumor cells
and decreases adrenal steroidogenesis.
J Clin Endocrinol Metab. 2003, 88(5): 2171 – 9.
24. Lifton RP: Genetic determinants of human hypertension.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995, 92(19): 8545 – 51.

25. White PC: Disorders of aldosterone biosynthesis and action. *N Engl J Med.* 1994, 331(4): 250 – 8.
26. Williams GH: Aldosterone biosynthesis, regulation, and classical mechanism of action. *Heart Fail Rev.* 2005, 10(1): 7 – 13.
27. Funder JW: Aldosterone and mineralocorticoid receptors in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis.* 2010, 52(5): 393 – 400.
28. Okubo S, Niimura F, Nishimura H, Takemoto F, Fogo A, Matsusaka T, Ichikawa I. *J Clin Invest.* 1997, 99(5): 855 – 60.
29. Himathongkam T, Dluhy RG, Williams GH: Potassium-aldosterone-renin interrelationships. *J Clin Endocrinol Metab.* 1975, 41(1): 153 – 9.
30. Reincke M, Slawik M: Zufällig entdeckte Nebennierenraumforderungen. In: Schulte HM, Allolio B (Hrsg.): *Praktische Endokrinologie.* Elsevier, München. 2010, 2. Auflage, 265 – 8.
31. Kloos RT, Gross MD, Francis IR, Korobkin M, Shapiro B: Incidentally discovered adrenal masses. *Endocr Rev.* 1995, 16(4): 460 – 84.
32. Terzolo M, Bovio S, Pia A, Reimondo G, Angeli A: Management of adrenal incidentaloma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009, 23(2): 233 – 43.
33. Nieman LK: Approach to the patient with an adrenal incidentaloma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010, 95(9): 4106 – 13.
34. Young WF Jr: Clinical practice. The incidentally discovered adrenal mass. *N Engl J Med.* 2007, 356(6): 601 – 10.
35. Cicala MV, Sartorato P, Mantero F: Incidentally discovered masses in hypertensive patients. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006, 20(3): 451 – 66.
36. Conn JW, Louis LH: Primary aldosteronism, a new clinical entity. *Ann Intern Med.* 1956, 44(1): 1 – 15.
37. Conn JW: Plasma Renin Activity in Primary Aldosteronism. Importance in Differential Diagnosis and in Research of Essential Hypertension. *JAMA.* 1964, 190: 222 – 5.
38. Kaplan NM: Hypokalemia in the hypertensive patient, with observations on the incidence of primary aldosteronism. *Ann Intern Med.* 1967, 66(6): 1079 – 90.
39. Conn JW, Cohen EL, Rovner DR, Nesbit RM: Normokalemic Primary Aldosteronism. A Detectable Cause of Curable “Essential” Hypertension. *JAMA.* 1965, 193: 200 – 6.
40. Funder JW, Carey RM, Fardella C, Gomez-Sanchez CE, Mantero F, Stowasser M, Young WF Jr, Montori VM; Endocrine Society: Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008, 93(9): 3266 – 81.

41. Rossi GP, Seccia TM, Pessina AC: Primary aldosteronism: part II: subtype differentiation and treatment. *J Nephrol.* 2008, 21(4): 455 – 62.
42. Reincke M, Seiler L, Rump LC:
Normokaliämischer primärer Hyperaldosteronismus.
Dtsch Ärztebl. 2003, 100(4): A-184/B-169/C-165.
43. Schirpenbach C, Segmiller F, Diederich S, Hahner S, Lorenz R, Rump LC, Seufert J, Quinkler M, Bidlingmaier M, Beuschlein F, Endres S, Reincke M:
The diagnosis and treatment of primary hyperaldosteronism in Germany: results on 555 patients from the German Conn Registry.
Dtsch Ärztebl Int. 2009, 106(18): 305 – 11.
44. Kempers MJ, Lenders JW, van Oudeheusden L, van der Wilt GJ, Schultze Kool LJ, Hermus AR, Deinum J:
Systematic review: diagnostic procedures to differentiate unilateral from bilateral adrenal abnormality in primary aldosteronism.
Ann Intern Med. 2009, 151(5): 329 – 37.
45. Rossi GP, Bernini G, Caliumi C, Desideri G, Fabris B, Ferri C, Ganzaroli C, Giacchetti G, Letizia C, Maccario M, Mallamaci F, Mannelli M, Mattarello MJ, Moretti A, Palumbo G, Parenti G, Porteri E, Semplicini A, Rizzoni D, Rossi E, Boscaro M, Pessina AC, Mantero F; PAPY Study Investigators:
A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol.* 2006, 48(11): 2293 – 300.
46. Rossi GP, Sechi LA, Giacchetti G, Ronconi V, Strazzullo P, Funder JW:
Primary aldosteronism: cardiovascular, renal and metabolic implications.
Trends Endocrinol Metab. 2008, 19(3): 88 – 90.
47. Mulatero P, Dluhy RG, Giacchetti G, Boscaro M, Veglio F, Stewart PM:
Diagnosis of primary aldosteronism: from screening to subtype differentiation.
Trends Endocrinol Metab. 2005, 16(3): 114 – 9.
48. Mulatero P, Milan A, Fallo F, Regolisti G, Pizzolo F, Fardella C, Mosso L, Marafetti L, Veglio F, Maccario M:
Comparison of confirmatory tests for the diagnosis of primary aldosteronism.
J Clin Endocrinol Metab. 2006, 91(7): 2618 – 23.
49. Daunt N: Adrenal vein sampling: how to make it quick, easy, and successful.
Radiographics. 2005, 25(1): 143 – 58.
50. Mengozzi G, Rossato D, Bertello C, Garrone C, Milan A, Pagni R, Veglio F, Mulatero P: Rapid cortisol assay during adrenal vein sampling in patients with primary aldosteronism. *Clin Chem.* 2007, 53(11): 1968 – 71.
51. Auchus RJ, Michaelis C, Wians FH Jr, Dolmatch BL, Josephs SC, Trimmer CK, Anderson ME, Nwariaku FE: Rapid cortisol assays improve the success rate of adrenal vein sampling for primary aldosteronism.
Ann Surg. 2009, 249(2): 318 – 21.
52. Betz MJ, Degenhart C, Fischer E, Pallauf A, Brand V, Linsenmaier U, Beuschlein F, Bidlingmaier M, Reincke M:
Adrenal vein sampling using rapid cortisol assays in primary aldosteronism is

- useful in centers with low success rates.
Eur J Endocrinol. 2011, 165(2): 301 – 6.
53. Kline GA, Harvey A, Jones C, Hill MH, So B, Scott-Douglas N, Pasiaka JL: Adrenal vein sampling may not be a gold-standard diagnostic test in primary aldosteronism: final diagnosis depends upon which interpretation rule is used. Variable interpretation of adrenal vein sampling. Int Urol Nephrol. 2008, 40(4): 1035 – 43.
 54. Harper R, Ferrett CG, McKnight JA, McIlrath EM, Russell CF, Sheridan B, Atkinson AB: Accuracy of CT scanning and adrenal vein sampling in the pre-operative localization of aldosterone-secreting adrenal adenomas. QJM. 1999, 92(11): 643 – 50.
 55. Rossi GP, Pitter F, Bernante P, Motta R, Feltrin G, Miotto D: Adrenal vein sampling for primary aldosteronism: the assessment of selectivity and lateralization of aldosterone excess baseline and after adrenocorticotrophic hormone (ACTH) stimulation. J Hypertens. 2008, 26(5): 989 – 97.
 56. Fu B, Zhang X, Wang GX, Lang B, Ma X, Li HZ, Wang BJ, Shi TP, Ai X, Zhou HX, Zheng T: Long-term results of a prospective, randomized trial comparing retroperitoneoscopic partial versus total adrenalectomy for aldosterone producing adenoma. J Urol. 2011, 185(5): 1578 – 82.
 57. Trésallet C, Salepcioglu H, Godiris-Petit G, Hoang C, Girerd X, Menegaux F: Clinical outcome after laparoscopic adrenalectomy for primary hyperaldosteronism: the role of pathology. Surgery. 2010, 148(1): 129 – 34.
 58. Ensinger H: Narkose-Inhalationsanästhetika und Injektionsanästhetika. In: Aktories K, Förstermann F, Hofmann F, Starke K: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Elsevier, München. 2005, 9. Auflage, 263 – 82.
 59. Janssen PA, Niemegeers CJ, Schellekens KH, Lenaerts FM: Etomidate, R-(+)-ethyl-1-(1-methyl-benzyl)imidazole-5-carboxylate (R 16659), a potent, short-acting and relatively atoxic intravenous hypnotic agent in rats. Arzneimittelforschung. 1971, 21(8): 1234 – 43.
 60. Macrez Ph, Paty J, Renou AM, Sabathié M: Study of a new anesthetic agent: Etomidate (R 26490). Unusual electroencephalic aspects. Ann Anesthesio Fr. 1976, 17(11): 1207 – 16.
 61. Morgan M, Lumley J, Whitwam JG: Etomidate, a new water-soluble non-barbiturate intravenous induction agent. Lancet. 1975, 1(7913): 955 – 6.
 62. Schulte HM, Benker G, Reinwein D, Sippell WG, Allolio B: Infusion of low dose etomidate: correction of hypercortisolemia in patients with Cushing's syndrome and dose-response relationship in normal subjects. J Clin Endocrinol Metab. 1990, 70(5): 1426 – 30
 63. Drake WM, Perry LA, Hinds CJ, Lowe DG, Reznick RH, Besser GM: Emergency and prolonged use of intravenous etomidate to control hypercortisolemia in a patient with Cushing's syndrome and peritonitis. J Clin Endocrinol Metab. 1998, 83(10): 3542 – 4.

64. Ledingham IM, Watt I: Influence of sedation on mortality in critically ill multiple trauma patients. *Lancet*. 1983, 1(8336): 1270.
65. de Jong FH, Mallios C, Jansen C, Scheck PA, Lamberts SW: Etomidate suppresses adrenocortical function by inhibition of 11 beta-hydroxylation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1984, 59(6): 1143 – 7.
66. Allolio B, Stuttmann R, Leonhard U, Fischer H, Winkelmann W: Adrenocortical suppression by a single induction dose of etomidate. *Klin Wochenschr*. 1984, 62(21): 1014 – 7.
67. Allolio B, Dörr H, Stuttmann R, Knorr D, Engelhardt D, Winkelmann W: Effect of a single bolus of etomidate upon eight major corticosteroid hormones and plasma ACTH. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1985, 22(3): 281 – 6.
68. Varga I, Rácz K, Kiss R, Fütö L, Tóth M, Sergev O, Gláz E: Direct inhibitory effect of etomidate on corticosteroid secretion in human pathologic adrenocortical cells. *Steroids*. 1993, 58(2): 64 – 8.
69. Lamberts SW, Bons EG, Bruining HA, de Jong FH: Differential effects of the imidazole derivatives etomidate, ketoconazole and miconazole and of metyrapone on the secretion of cortisol and its precursors by human adrenocortical cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987, 240(1): 259 – 64.
70. Vanden Bossche H, Willemsens G, Cools W, Bellens D: Effects of etomidate on steroid biosynthesis in subcellular fractions of bovine adrenals. *Biochem Pharmacol*. 1984, 33(23): 3861 – 8.
71. Wagner RL, White PF, Kan PB, Rosenthal MH, Feldman D: Inhibition of adrenal steroidogenesis by the anesthetic etomidate. *N Engl J Med*. 1984, 310(22): 1415 – 21.
72. Bergström M, Bonasera TA, Lu L, Bergström E, Backlin C, Juhlin C, Langström B: In vitro and in vivo primate evaluation of carbon-11-etomidate and carbon-11-metomidate as potential tracers for PET imaging of the adrenal cortex and its tumors. *J Nucl Med*. 1998, 39(6): 982 – 9.
73. Dzau VJ, Colucci WS, Hollenberg NK, Williams GH: Relation of the renin- angiotensin-aldosterone system to clinical state in congestive heart failure. *Circulation*. 1981, 63(3): 645 – 51.
74. Weber KT, Villarreal D: Aldosterone and antialdosterone therapy in congestive heart failure. *Am J Cardiol*. 1993, 71(3): 3A – 11A.
75. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J: The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999, 341(10): 709 – 17.
76. Juurlink DN, Mamdani MM, Lee DS, Kopp A, Austin PC, Laupacis A, Redelmeier DA: Rates of hyperkalemia after publication of the Randomized Aldactone Evaluation Study. *N Engl J Med*. 2004, 351(6): 543 – 51.

77. Nishizaka MK, Zaman MA, Calhoun DA: Efficacy of low-dose spironolactone in subjects with resistant hypertension. *Am J Hypertens.* 2003, 16(11 Pt 1): 925 – 30.
78. Mihailidou AS, Funder JW: Nongenomic effects of mineralocorticoid receptor activation in the cardiovascular system. *Steroids.* 2005, 70(5-7): 347 – 51.
79. Grossmann C, Gekle M: New aspects of rapid aldosterone signaling. *Mol Cell Endocrinol.* 2009, 308(1-2): 53 – 62.
80. Mulder P, Mellin V, Favre J, Vercauteren M, Remy-Jouet I, Monteil C, Richard V, Renet S, Henry JP, Jeng AY, Webb RL, Thuillez C: Aldosterone synthase inhibition improves cardiovascular function and structure in rats with heart failure: a comparison with spironolactone. *Eur Heart J.* 2008, 29(17): 2171 – 9.
81. Calhoun DA, White WB, Krum H, Guo W, Bermann G, Trapani A, Lefkowitz MP, Ménard J: Effects of a novel aldosterone synthase inhibitor for treatment of primary hypertension: results of a randomized, double-blind, placebo- and active-controlled phase 2 trial. *Circulation.* 2011, 124(18): 1945 – 55.
82. Voets M, Antes I, Scherer C, Müller-Vieira U, Biemel K, Barassin N, Marchais-Oberwinkler S, Hartmann RW: Heteroaryl-substituted naphthalenes and structurally modified derivatives: selective inhibitors of CYP11B2 for the treatment of congestive heart failure and myocardial fibrosis. *J Med Chem.* 2005, 48(21): 6632 – 42.
83. Ulmschneider S, Negri M, Voets M, Hartmann RW: Development and evaluation of a pharmacophore model for inhibitors of aldosterone synthase (CYP11B2). *Bioorg Med Chem Lett.* 2006, 16(1): 25 – 30.
84. Voets M, Antes I, Scherer C, Müller-Vieira U, Biemel K, Marchais-Oberwinkler S, Hartmann RW: Synthesis and evaluation of heteroaryl-substituted dehydronaphthalenes and indenenes: potent and selective inhibitors of aldosterone synthase (CYP11B2) for the treatment of congestive heart failure and myocardial fibrosis. *J Med Chem.* 2006, 49(7): 2222 – 31.
85. Lucas S, Heim R, Negri M, Antes I, Ries C, Schewe KE, Bisi A, Gobbi S, Hartmann RW: Novel aldosterone synthase inhibitors with extended carbocyclic skeleton by a combined ligand-based and structure-based drug design approach. *J Med Chem.* 2008, 51(19): 6138 – 49.
86. Ulmschneider S, Müller-Vieira U, Klein CD, Antes I, Lengauer T, Hartmann RW: Synthesis and evaluation of (pyridylmethylene)tetrahydronaphthalenes/ -indanes and structurally modified derivatives: potent and selective inhibitors of aldosterone synthase. *J Med Chem.* 2005, 48(5): 1563 – 75.
87. Ulmschneider S, Müller-Vieira U, Mitrenga M, Hartmann RW, Oberwinkler-Marchais S, Klein CK, Bureik M, Bernhardt R, Antes I, Lengauer T: Synthesis and evaluation of imidazolylmethylenetetrahydronaphthalenes and imidazolylmethyleneindanes: potent inhibitors of aldosterone synthase. *J Med Chem.* 2005, 48(6): 1796 – 805.

88. Ilias I, Sahdev A, Reznek RH, Grossman AB, Pacak K:
The optimal imaging of adrenal tumours: a comparison of different methods.
Endocr Relat Cancer. 2007, 14(3): 587 – 99.
89. Yen RF, Wu VC, Liu KL, Chenq MF, Wu YW, Chueh SC, Lin WC, Wu KD, Tzen KY, Lu CC; TAIPAI Study Group:
131I-6beta-iodomethyl-19-norcholesterol SPECT/CT for primary aldosteronism patients with inconclusive adrenal venous sampling and CT results.
J Nucl Med. 2009, 50(10): 1631 – 7.
90. Avram AM, Fig LM, Gross MD: Adrenal gland scintigraphy.
Semin Nucl Med. 2006, 36(3): 212 – 27.
91. Rummeny EJ, Holzapfel K: Nebenniere. In: Vogl TJ, Reith W, Rummeny EJ (Hrsg.): *Diagnostische und Interventionelle Radiologie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 2011, 1. Auflage, 995 – 1005.
92. Pschyrembel *Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter GmbH & Co.KG. Berlin. 2001, Vol. 259.
93. Maurea S, Caracò C, Klain M, Mainolfi C, Salvatore M:
Imaging characterization of non-hypersecreting adrenal masses. Comparison between MR and radionuclide techniques.
Q J Nucl Med Mol Imaging. 2004, 48(3): 188 – 97.
94. Allolio B: Diagnostische Methoden bei Nebennierenerkrankungen. In: Allolio B, Schulte HM (Hrsg.): *Praktische Endokrinologie*. Elsevier, München. 2010, 2. Auflage, 209 – 15.
95. White ML, Gauger PG, Doherty GM, Cho KJ, Thompson NW, Hammer GD, Miller BS: The role of radiologic studies in the evaluation and management of primary hyperaldosteronism. *Surgery*. 2008, 144(6): 926 – 33.
96. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N:
Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.
Science. 1985, 230(4732): 1350 – 4.
97. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988, 239(4839): 487 – 91.
98. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE:
Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro.
Nucleic Acids Res. 1990, 18(21): 6409 – 12.
99. Mülhardt C: Die Polymerase- Kettenreaktion (PCR). In: *Der Experimentator – Molekularbiologie/ Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 2009, 6. Auflage, 84 – 120.
100. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K:
Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization.
PCR Methods Appl. 1995, 4(6): 357 – 62.

101. Applied Biosystems: Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. 2004.
102. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R:
Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.
Biotechnology (N Y). 1993, 11(9): 1026 – 30.
103. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT:
The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009, 55(4): 611 – 22.
104. Bechtel S, Belkina N, Bernhardt R:
The effect of amino-acid substitutions I112P, D147E and K152N in CYP11B2 on the catalytic activities of the enzyme.
Eur J Biochem. 2002, 269(4): 1118 – 27.
105. Mornet E, Dupont J, Vitek A, White PC:
Characterization of two genes encoding human steroid 11 beta-hydroxylase (P-450(11) beta). *J Biol Chem*. 1989, 264(35): 20961 – 7.
106. Kawainoto T, Mitsuuchi Y, Ohnishi T, Ichikawa Y, Yokoyama Y, Sumimoto H, Toda K, Miyahara K, Kuribavashi I, Nakao K, et al.:
Cloning and expression of a cDNA for human cytochrome P-450aldo as related to primary aldosteronism.
Biochem Biophys Res Commun. 1990, 173(1): 309 – 16.
107. Kawamoto T, Toda K, Miyahara K, Yokoyama Y, Nakao K, Hosoda K, Yamamoto Y, Imura H, Shizuta Y:
Cloning of cDNA and genomic DNA for human cytochrome P-45011 beta.
FEBS Lett. 1990, 269(2): 345 – 9.
108. Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW: High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation.
Nucleic Acids Res. 1988, 16(13): 6127 – 45.
109. Birnboim HC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 1979, 7(6): 1513 – 23.
110. AppliChem: Agarose-Gel-Elektrophorese. 2009.
111. Mülhardt C: Die Klonierung von DNA- Fragmenten.
In: *Der Experimentator – Molekularbiologie/ Genomics*.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 2009, 6. Auflage, 139 - 68.
112. Yasumura Y, Buonassisi V, Sato G: Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype.
Cancer Res. 1966 26(3): 529 – 35.
113. Moore CC, Brentano ST, Miller WL: Human P450scc gene transcription is induced by cyclic AMP and repressed by 12-O-tetradecanoylphorbol- 13-acetate and A23187 through independent cis elements.
Mol Cell Biol. 1990, 10(11): 6013 – 23.

114. Begeot M, Langlois D, Vilgrain I, Saez JM: Angiotensin II (A-II) steroidogenic refractoriness in Y-1 cells in the presence of A-II receptors negatively coupled to adenylate cyclase. *Endocr Res.* 1987, 13(3): 301 – 16.
115. Schimmer BP: Adrenocortical Y1 cells. *Methods Enzymol.* 1979, 58: 570 – 4.
116. Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, Chrousos GP, Brennan MF, Stein CA, Locca RV: Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res.* 1990, 50(17): 5488 – 96.
117. Holland OB, Mathis JM, Bird IM, Rainey WE: Angiotensin increases aldosterone synthase mRNA levels in human NCI-H295 cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1993, 94(2): R9 – 13.
118. Rainey WE, Bird IM, Sawetawan C, Hanley NA, McCarthy JL, McGee EA, Wester R, Mason JI: Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993, 77(3): 731 – 7.
119. Rainey WE, Bird IM, Mason JI: The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies. *Mol Cell Endocrinol.* 1994, 100(1-2): 45 – 50.
120. Rossi GP, Albertin G, Bova S, Belloni AS, Fallo F, Pagotto U, Trevisi L, Palù G, Pessina AC, Nussdorfer GG: Autocrine-paracrine role of endothelin-1 in the regulation of aldosterone synthase expression and intracellular Ca²⁺ in human adrenocortical carcinoma NCI-H295 cells. *Endocrinology.* 1997, 138(10): 4421 – 6.
121. Bird IM, Mason JI, Rainey WE: Regulation of type 1 angiotensin II receptor messenger ribonucleic acid expression in human adrenocortical carcinoma H295 cells. *Endocrinology.* 1994, 134(6): 2468 – 74.
122. Bird IM, Hanley NA, Word RA, Mathis JM, McCarthy JL, Mason JI, Rainey WE: Human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cells: a model for angiotensin-II-responsive aldosterone secretion. *Endocrinology.* 1993, 133(4): 1555 – 61.
123. Schmitz S: Zellbiologische und Routinemethoden. In: *Der Experimentator - Zellkultur.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 2009, 2. Auflage, 207 – 25.
124. Hawley-Nelson P, Ciccarone V, Gebeyehu G, Jessee J, Felgner P: LipofectAmine reagent: A new, higher efficiency polycationic liposome transfection reagent. *Focus.* 1993, 15.3: 73 - 9.
125. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M: Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987, 84(21): 7413 – 7.

126. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D: Western- Blot.
In: Der Experimentator – Immunologie.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 2009, 3. Auflage, 139 – 57.
127. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, 227(5259): 680 – 5.
128. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.
J Immunol Methods. 1983, 65(1-2): 55 – 63.
129. Denizot F, Lang R: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 1986, 89(2): 271 – 7.
130. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D: Zellviabilitätsbestimmung.
In: Der Experimentator – Immunologie.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 2009, 3. Auflage, 208 – 10.
131. Fassnacht M, Kenn W, Allolio B:
Adrenal tumors: how to establish malignancy?
J Endocrinol Invest. 2004, 27(4): 387 - 99.
132. Kumar R, Xiu Y, Yu JQ, Takalkar A, El-Haddad G, Potenta S, Kung J, Zhuang H, Alavi A:
18F-FDG PET in evaluation of adrenal lesions in patients with lung cancer.
J Nucl Med. 2004, 45(12): 2058 – 62.
133. Metser U, Miller E, Lerman H, Lievshitz G, Avital S, Even-Sapir E:
18F-FDG PET/CT in the evaluation of adrenal masses.
J Nucl Med. 2006, 47(1): 32 – 7.
134. Stewart PM, Allolio B:
Adrenal vein sampling for Primary Aldosteronism: time for a reality check.
Clin Endocrinol (Oxf). 2010, 72(2): 146 – 8.
135. Löwel H, Meisinger C, Heier M, Hymer H, Alte D, Völzke H:
Epidemiology of hypertension in Germany. Selected results of population-representative cross-sectional studies.
Dtsch Med Wochenschr. 2006, 131(46): 2586 – 91.
136. Rossi GP, Barisa M, Allolio B, Auchus RJ, Amar L, Cohen D, Degenhart C, Deinum J, Fischer E, Gordon R, Kickuth R, Kline G, Lacroix A, Magill S, Miotto D, Naruse M, Nishikawa T, Omura M, Pimenta E, Plouin PF, Quinkler M, Reincke M, Rossi E, Rump LC, Satoh F, Schultze Kool L, Seccia TM, Stowasser M, Tanabe A, Trerotola S, Vonend O, Widimsky J Jr, Wu KD, Wu VC, Pessina AC:
The Adrenal Vein Sampling International Study (AVIS) for identifying the major subtypes of primary aldosteronism.
J Clin Endocrinol Metab. 2012, 97(5): 1606 – 14.
137. Rossi GP, Sacchetto A, Chiesura-Corona M, De Toni R, Gallina M, Feltrin GP, Pessina AC: Identification of the etiology of primary aldosteronism with adrenal vein sampling in patients with equivocal computed tomography and

- magnetic resonance findings: results in 104 consecutive cases.
J Clin Endocrinol Metab. 2001, 86(3): 1083 – 90.
138. Rossi GP: New concepts in adrenal vein sampling for aldosterone in the diagnosis of primary aldosteronism. *Curr Hypertens Rep.* 2007, 9(2): 90 – 7.
139. Young WF, Stanson AW: What are the keys to successful adrenal venous sampling (AVS) in patients with primary aldosteronism? *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009, 70(1): 14 – 7.
140. Lau JH, Sze WC, Reznek RH, Matson M, Sahdev A, Carpenter R, Berney DM, Akker SA, Chew SL, Grossman AB, Monson JP, Drake WM: A prospective evaluation of postural stimulation testing, computed tomography and adrenal vein sampling in the differential diagnosis of primary aldosteronism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012, 76(2): 182 – 8.
141. Weickert MO, Schöfl-Siegert B, Arafat AM, Pfeiffer AF, Möhlig M, Schöfl C: A reverse postural test as a screening tool for aldosterone-producing adenoma: a pilot study. *Endocrine.* 2009, 36(1): 75 – 82.
142. Mulatero P, Bertello C, Rossato D, Mengozzi G, Milan A, Garrone C, Giraudo G, Passarino G, Garabello D, Verhovez A, Rabbia F, Veglio F: Roles of clinical criteria computed tomography scan, and adrenal vein sampling in differential diagnosis of primary aldosteronism subtypes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008, 93(4): 1366 – 71.
143. Zarnegar R, Bloom AI, Lee J, Kerlan RK Jr, Wilson MW, Laberge JM, Gordon RL, Kebebew E, Clark OH, Duh QY: Is adrenal venous sampling necessary in all patients with hyperaldosteronism before adrenalectomy? *J Vasc Interv Radiol.* 2008, 19(1): 66 – 71.
144. Beierwaltes WH, Wieland DM, Moslev ST, Swanson DP, Sarkar SD, Freitas JE, Thrall JH, Herwig KR: Imaging the adrenal glands with radiolabeled inhibitors of enzymes: concise communication. *J Nucl Med.* 1978, 19(2): 200 – 3.
145. Khan TS, Sundin A, Juhlin C, Langström B, Bergström M, Eriksson B: ¹¹C-metomidate PET imaging of adrenocortical cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2003, 30(3): 403 – 10.
146. Eriksson B, Bergström M, Sundin A, Juhlin C, Orlefors H, Oberg K, Langström B: The role of PET in localization of neuroendocrine and adrenocortical tumors. *Ann N Y Acad Sci.* 2002, 970: 159 – 69.
147. Gross MD, Shapiro B, Kloos RT, Dwamena B: PET imaging of adrenal cortical tumors with the ¹¹beta-hydroxylase tracer ¹¹C-metomidate. *J Nucl Med.* 2000, 41(11): 1933 – 4.
148. Bergström M, Juhlin C, Bonasera TA, Sundin A, Rastad J, Akerström G, Langström B: PET imaging of adrenal cortical tumors with the ¹¹beta-hydroxylase tracer ¹¹C-metomidate. *J Nucl Med.* 2000, 41(2): 275 – 82.
149. Allolio B, Schulte HM, Kaulen D, Reincke M, Jaurisch-Hancke C, Winkelmann W: Nonhypnotic low-dose etomidate for rapid correction of

- hypercortisolaemia in Cushing's syndrome.
Klin Wochenschr. 1988, 66(8): 361 – 4.
150. Hahner S, Sundin A: Metomidate-based imaging of adrenal masses.
Horm Cancer. 2011, 2(6): 348 – 53.
 151. Hennings J, Lindhe O, Bergström M, Langström B, Sundin A, Hellman P:
[11C]metomidate positron emission tomography of adrenocortical tumors in
correlation with histopathological findings.
J Clin Endocrinol Metab. 2006, 91(4): 1410 – 4.
 152. Hennings J, Hellman P, Ahlström H, Sundin A:
Computed tomography, magnetic resonance imaging and 11C-metomidate
positron emission tomography for evaluation of adrenal incidentalomas.
Eur J Radiol. 2009, 69(2): 314 – 23.
 153. Mitterhauser M, Wadsak W, Wabnegger L, Sieghart W, Viernstein H,
Kletter K, Dudczak R: In vivo and in vitro evaluation of [18F]FETO with respect
to the adrenocortical and GABAergic system in rats.
Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2003, 30(10): 1398 – 401.
 154. Wadsak W, Mitterhauser M, Rendl G, Schuetz M, Mien LK, Ettliger DE,
Dudczak R, Kletter K, Karanikas G:
[18F]FETO for adrenocortical PET imaging: a pilot study in healthy volunteers.
Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2006, 33(6): 669 – 72.
 155. Hahner S, Kreissl MC, Fassnacht M, Haenscheid H, Knoedler P, Lang
K, Buck AK, Reiners C, Allolio B, Schirbel A:
[131I]iodometomidate for targeted radionuclide therapy of advanced
adrenocortical carcinoma. J Clin Endocrinol Metab. 2012, 97(3): 914 – 22.
 156. Hahner S, Stuermer A, Kreissl M, Reiners C, Fassnacht M, Haenscheid
H, Beuschlein F, Zink M, Lang K, Allolio B, Schirbel A:
[123I]iodometomidate for molecular imaging of adrenocortical cytochrome P450
family 11B enzymes. J Clin Endocrinol Metab. 2008, 93(6): 2358 – 65.
 157. Rubello D, Bui C, Casara D, Gross MD, Fig LM, Shapiro B:
Functional scintigraphy of the adrenal gland.
Eur J Endocrinol. 2002, 147(1): 13 – 28.
 158. Burton TJ, Mackenzie IS, Balan K, Koo B, Bird N, Soloviev DV, Azizan
EA, Aigbirhio F, Gurnell M, Brown MJ:
Evaluation of the sensitivity and specificity of (11)C-metomidate positron
emission tomography (PET)-CT for lateralizing aldosterone secretion by Conn's
adenomas. J Clin Endocrinol Metab. 2012, 97(1): 100 – 9.
 159. Hennings J, Sundin A, Hägg A, Hellman P: 11C-metomidate positron
emission tomography after dexamethasone suppression for detection of small
adrenocortical adenomas in primary aldosteronism.
Langenbecks Arch Surg. 2010, 395(7): 963 – 7.
 160. Fallo F, Pezzi V, Barzon L, Mulatero P, Veglio F, Sonino N, Mathis JM:
Quantitative assessment of CYP11B1 and CYP11B2 expression in aldosterone-
producing adenomas. Eur J Endocrinol. 2002, 147(6): 795 – 802.

161. Enberg U, Farnebo LO, Wedell A, Gröndal S, Thorén M, Grimelius L, Kjellman M, Bäckdahl M, Hamberger B: In vitro release of aldosterone and cortisol in human adrenaladenomas correlates to mRNA expression of steroidogenic enzymes for genes CYP11B2 and CYP17. *World J Surg.* 2001, 25(7): 957 – 66.
162. Lucas S, Heim R, Negri M, Antes I, Ries C, Schewe KE, Bisi A, Gobbi S, Hartmann RW: Novel aldosterone synthase inhibitors with extended carbocyclic skeleton by a combined ligand-based and structure-based drug design approach. *J Med Chem.* 2008, 51(19): 6138 – 49.
163. Denner K, Vogel R, Schmalix W, Doehmer J, Bernhardt R: Cloning and stable expression of the human mitochondrial cytochrome P45011B1 cDNA in V79 Chinese hamster cells and their application for testing of potential inhibitors. *Pharmacogenetics.* 1995, 5(2): 89 – 96.
164. Denner K, Doehmer J, Bernhardt R: Cloning of CYP11B1 and CYP11B2 from normal human adrenal and their functional expression in COS-7 and V79 Chinese hamster cells. *Endocr Res.* 1995, 21(1-2): 443 – 8.
165. Staels B, Hum DW, Miller WL: Regulation of steroidogenesis in NCI-H295 cells: a cellular model of the human fetal adrenal. *Mol Endocrinol.* 1993, 7(3): 423 – 33.
166. Fassnacht M, Hahner S, Beuschlein F, Klink A, Reincke M, Allolio B: New mechanisms of adrenostatic compounds in a human adrenocortical cancer cell line. *Eur J Clin Invest.* 2000, 30 Suppl 3: 76 – 82.
167. Cantón RF, Sanderson JT, Letcher RJ, Bergman A, van den Berg M: Inhibition and induction of aromatase (CYP19) activity by brominated flame retardants in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol Sci.* 2005, 88(2): 447 – 55.
168. Gracia T, Hilscherova K, Jones PD, Newsted JL, Higley EB, Zhang X, Hecker M, Murphy MB, Yu RM, Lam PK, Wu RS, Giesy JP: Modulation of steroidogenic gene expression and hormone production of H295R cells by pharmaceuticals and other environmentally active compounds. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007, 225(2): 142 – 53.
169. Heneweer M, van den Berg M, Sanderson JT: A comparison of human H295R and rat R2C cell lines as in vitro screening tools for effects on aromatase. *Toxicol Lett.* 2004, 146(2): 183 – 94.
170. Hilscherova K, Jones PD, Gracia T, Newsted JL, Zhang X, Sanderson JT, Yu RM, Wu RS, Giesy JP: Assessment of the effects of chemicals on the expression of ten steroidogenic genes in the H295R cell line using real-time PCR. *Toxicol Sci.* 2004, 81(1): 78 – 89.
171. Ohno S, Shinoda S, Toyoshima S, Nakazawa H, Makino T, Nakajin S: Effects of flavonoid phytochemicals on cortisol production and on activities of steroidogenic enzymes in human adrenocortical H295R cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002, 80(3): 355 – 63.

172. Sanderson JT, Boerma J, Lansbergen GW, van den Berg M: Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002, 182(1): 44 – 54.
173. Sanderson JT, Hordijk J, Denison MS, Springsteel MF, Nantz MH, van den Berg M: Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by natural and synthetic flavonoid compounds in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol Sci.* 2004, 82(1): 70 – 9.
174. Zhang X, Yu RM, Jones PD, Lam GK, Newsted JL, Gracia T, Hecker M, Hilscherova K, Sanderson T, Wu RS, Giesy JP: Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line. *Environ Sci Technol.* 2005, 39(8): 2777 – 85.
175. Müller-Vieira U, Angotti M, Hartmann RW: The adrenocortical tumor cell line NCI-H295R as an in vitro screening system for the evaluation of CYP11B2 (aldosterone synthase) and CYP11B1 (steroid-11beta-hydroxylase) inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005, 96(3-4): 259 – 70.
176. Denner K, Rainey WE, Pezzi V, Bird IM, Bernhardt R, Mathis JM: Differential regulation of 11 beta-hydroxylase and aldosterone synthase in human adrenocortical H295R cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1996, 121(1): 87 – 91.
177. Hennings J, Lindhe O, Bergström M, Langström B, Sundin A, Hellman P: [11C]metomidate positron emission tomography of adrenocortical tumors in correlation with histopathological findings. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006, 91(4): 1410 – 4.
178. Yin L, Hu Q, Hartmann RW: 3-Pyridyl substituted aliphatic cycles as CYP11B2 inhibitors: aromaticity abolishment of the core significantly increased selectivity over CYP1A2. *PLoS One.* 2012, 7(11):e48048
179. Adams CM, Hu CW, Jeng AY, Karki R, Ksander G, Lasala D, Leung-Chu J, Liang G, Liu Q, Meredith E, Rao C, Rigel DF, Shi J, Smith S, Springer C, Zhang C: The discovery of potent inhibitors of aldosterone synthase that exhibit selectivity over 11-beta-hydroxylase. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010, 20(15): 4324 – 7.
180. Roumen L, Peeters JW, Emmen JM, Beugels IP, Custers EM, de Gooyer M, Plate R, Pieterse K, Hilbers PA, Smits JF, Vekemans JA, Leysen D, Ottenheijm HC, Janssen HM, Hermans JJ: Synthesis, biological evaluation, and molecular modelling of 1-benzyl-1H-imidazoles as selective inhibitors of aldosterone synthase (CYP11B2). *J Med Chem.* 2010, 53(4): 1712 – 25.
181. Lucas S, Negri M, Heim R, Zimmer C, Hartmann RW: Fine-tuning the selectivity of aldosterone synthase inhibitors: structure-activity and structure-selectivity insights from studies of heteroaryl substituted 1,2,5,6-tetrahydropyrrolo[3,2,1-ij]quinolin-4-one derivatives. *J Med Chem.* 2011, 54(7): 2307 – 19.
182. Schirbel A, Zolle I, Hammerschmidt F, Berger ML, Schiller D, Kvaternik H, Reiners C: [123/131I]Iodometomidate as a radioligand for functional

diagnosis of adrenal disease: synthesis, structural requirements and biodistribution. *Radiochimica Acta*. 2004, 92(4-6): 297 – 303.

183. Ramchandani S, MacLeod AR, Pinard M, von Hofe E, Szyf M: Inhibition of tumorigenesis by a cytosine-DNA, methyltransferase, antisense oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997, 94(2): 684 – 9.

Verzeichnis von Abbildungen und Tabellen

Abb.1.1.	Steroidhormonbiosynthese	S.7
Tab.1.1.	Formen des Mineralokortikoidhochdrucks	S.15
Abb.1.2.	Strukturformel Etomidat	S.21
Abb.1.3.	Strukturformel Metomidat	S.22
Tab. 4.1.	Eingesetzte Volumina an Reagenzien für die PCR	S.33
Tab. 4.2.	Standard- Programm für die PCR	S.34
Tab. 4.3	Ansatz der iScript RT PCR	S.35
Tab. 4.4	Programm für die iScript RT PCR	S.35
Tab. 4.5	Bei Applied Biosystems erworbene Assays	S.36
Tab. 4.6	Eingesetzte Reagenzien für die RT PCR	S.37
Tab. 4.7	Programmierung des iCycler Thermocyclers	S.37
Tab. 4.8	Oligonukleotide als PCR Primer	S.42
Tab. 4.9	Eingesetzte Reagenzien für die Dephosphorylierung	S.46
Tab. 4.10	Ansatz für die Transfektion eukaryotischer Zellen	S.54
Abb. 5.1	Technischer Erfolg des NNVK in Würzburg	S.66
Abb. 5.2	Auswertung der technisch erfolgreichen NNVK	S.67
Abb. 5.3	Relative mRNA Expression für CYP11B1	S.69
Abb. 5.4	Relative mRNA Expression für CYP11B2	S.70
Abb. 5.5	Gelelektrophorese zur Amplifikation von CYP11B1/2	S.71
Abb. 5.6	pcDNA3.1zeo(+) Vektor	S.72
Abb. 5.7	Gelelektrophorese pcDNAzeo(+)- CYP11B1 Ligation	S.73
Abb. 5.8	Kontrollverdau der pcDNAzeo(+)- CYP11B1 Klone	S.73
Abb. 5.9	Kontrollverdau der pcDNAzeo(+)- CYP11B2 Klone	S.74

Abb. 5.10	Gelelektrophorese des Kontrollverdaus pcDNAzeo(+)- CYP11B2 Klone	S.74
Abb. 5.11	Westernblot der Y1-CYP11B1 Kolonien	S.75
Abb. 5.12	Westernblot der Y1-CYP11B2 Kolonien	S.76
Abb. 5.13	mRNA Expression für CYP11B1 in den Kolonien	S.77
Abb. 5.14	mRNA Expression für CYP11B2 in den Kolonien	S.78
Abb. 5.15	Cortisol- Konzentration Y1- CYP11B1 Klone	S.80
Abb. 5.16	Aldosteron- Konzentration Y1-CYP11B2 Klone	S.81
Abb. 5.17a	Einfluss von Etomidat auf die Hormonproduktion in den stabil transfizierten Zellen	S.82
Abb. 5.17b	Einfluss von Metomidat auf die Hormonproduktion in den stabil transfizierten Zellen	S.83
Abb. 5.18	Inhibition der Aldosteronproduktion in NCI-h295 Zellen	S.84
Abb. 5.19	Inhibition der Hormonproduktion in den stabil transfizierten Zellen	S.86
Tab. 5.1	IC50 und Selektivität der getesteten Substanzen	S.88
Abb. 5.20	MTT Test Substanz 5 und B.1	S.89
Abb. 5.21	MTT Test Substanz B	S.90
Abb. 5.22	MTT Test Substanz 5.1	S.91
Tab. 6.1	IC50 Werte Etomidat und Derivate	S.97
Tab. 6.2	Potenz und Selektivität der Originalsubstanzen	S.100

Abkürzungen

A./Aa.	Arteria / Arteriae
ACC	Adrenocorticales Carcinom Nebennierenrindencarcinom
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACTH	Adrenocorticotropin oder Adrenocorticotropes Hormon
APA	Aldosteronproduzierendes Adenom
APC	Aldosteronproduzierendes Karzinom
BAH	Bilaterale Hyperplasie
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBG	Corticosteroid- bindendes- Globulin
cDNA	complementary DNA oder komplementäre DNA
CPA	Cortisolproduzierendes Adenom
CT	Computertomographie/ Computertomogramm
DHEA(S)	Dehydroepiandrosteron(sulfat)
DNA	Desoxyribonucleicacid/ Desoxyribonukleinsäure
DOC	11- Desoxycorticosteron
EIA	endokrin inaktives Adenom
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FDG	18- Fluor- Desoxy- Glukose
GABA	Gamma-aminobutyric acid oder Gamma- Aminobuttersäure

HMG CoA - Reduktase	β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
inf.	Inferior
i.v.	intravenös
LDL	low density Lipoprotein
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie bzw. – tomogramm
MUAN	Multinoduläre unilaterale adrenokortikale Hyperplasie
N.	Nervus
NaCl	Natrium- Chlorid oder Kochsalz
NAD	Nicotinsäureamid- Adenin- Dinukleotid
NADP	NAD- Phosphat
nNN	normale Nebenniere
NNV	Nebennierenvene(n)
NNVK	selektiver Nebennierenvenenkatheter
NP- 59	¹³¹ I- 6- iodomethyl- ¹⁹ - norcholesterol
PA	Primärer Hyperaldosteronismus
PAH	Unilaterale Hyperplasie
PCR	Polymerase- Ketten- Reaktion
PET	Positronen- Emissions- Tomographie
PKA	Proteinkinase A
RAAS	Renin- Angiotensin- Aldosteron- System
RNA	Ribonucleicacid/ Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA

RR	Blutdruck (traditionelle Messung nach Riva-Rocci)
RSS	11- Desoxycortisol
sup.	superior
tRNA	transfer RNA
V.	Vena
VCI	Vena cava inferior (unterhalb der Nebennierenvenen)
ZNS	Zentrales Nervensystem

Enzyme der Steroidogenese

11 β HSD	11 β - Hydroxysteroiddehydrogenase
17 β HSD	17 β - Hydroxysteroiddehydrogenase
3 β HSD	3 β - Hydroxysteroiddehydrogenase
CYP	Cytochrom P450
CYP11A1 oder "scc"	Cytochrom P450 11A1 oder "side- chain cleavage"
CYP11B1	11beta- Hydroxylase
CYP11B2	Aldosteronsynthase
CYP17	Steroid- 17alpha- Hydroxylase
CYP19	Aromatase oder Östrogen Synthase
CYP21	Steroid- 21- Hydroxylase
StAR	steroidogenic acute regulatory protein

Danksagung

Diese Arbeit wurde an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Universitätsklinik Würzburg (Schwerpunkt Endokrinologie und Diabetologie) in den Jahren 2006 bis 2009 angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt dabei zunächst Frau PD Dr. S. Hahner, die die Idee für dieses Projekt entwickelt und mir auch nach Fertigstellung der Promotionsarbeit die aktive Beteiligung an der Fortführung und Weiterentwicklung ermöglicht hat. Die uneingeschränkt gute Kommunikation und Zusammenarbeit haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. B. Allolio, dessen kritische Anregungen und Unterstützung ich als absolut wertvoll ansehe, für die Unterstützung in allen Bereichen meiner beruflichen Tätigkeit und für die Etablierung einer aktiven Arbeitsgruppe mit einem sehr angenehmen Arbeitsklima. Beiden möchte ich außerdem für die stete Förderung meiner klinischen und wissenschaftlichen Karriere danken.

Desweiteren danke ich Frau Dr. A. Stürmer, die mich in technischen Fragen stets tatkräftig unterstützt und mir im Labor zur Seite gestanden hat. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Frau M. Zink für die gute Zusammenarbeit und die Einarbeitung im Labor danken.

Erwähnen möchte ich außerdem Herrn Dr. A. Schirbel, der mit der Synthese der Aldosteronsynthaseinhibitoren und der Beratung in technischen Fragen essenziellen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet hat und weiterhin leistet.

Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. M. Fassnacht und der gesamten Arbeitsgruppe Endokrinologie für das unvergleichlich gute Arbeitsklima und die angenehme Zusammenarbeit.

Abschließend möchte ich nochmals besonders meinen Eltern und meiner gesamten Familie für die uneingeschränkte Unterstützung in allen Belangen danken.