

Aus dem Lehrstuhl für Endokrinologie und Diabetologie der Universität Würzburg

Lehrstuhlinhaber: Professor Dr. med. Martin Fassnacht

**Differentialdiagnostik von Nebennierentumoren mittels  
massenspektrometrischer Steroidhormon-Untersuchungen und targeted  
Metabolomics**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sophie Emily Schweitzer

aus Ulm

Würzburg, Juni 2021



Referent: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Matthias Kroiß

Koreferent: Prof. Dr. med. Thomas Dandekar

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2022

Die Promovendin ist Ärztin

Für meine Familie

## Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Die Nebenniere – Anatomie und Funktion.....	1
1.2 Wirkung und Regulation der Steroidhormone der Nebennierenrinde .....	2
1.3 Synthese der Steroidhormone.....	4
1.4 Nebenniereninzidentalome .....	5
1.4.1 Das Nebennierenkarzinom .....	6
1.4.2 Diagnostisches Vorgehen bei Nebenniereninzidentalomen .....	7
1.4.3 Therapie des Nebennierenkarzinoms .....	9
1.5 Studien zu Steroidhormonanalysen in der Differentialdiagnose von Nebennierentumoren.....	12
1.6 Metabolismus und Metabolomics bei Tumorerkrankungen .....	13
1.7 Fragestellung dieser Arbeit.....	14
2. MATERIAL UND METHODEN .....	15
2.1 Studienpopulation.....	15
2.2 Grundlagen der LC-MS/MS .....	16
2.2.1 Flüssigchromatographie.....	16
2.2.2 Massenspektrometrie und Elektrosprayionisation.....	16
2.3 LC-MS/MS-Bestimmung der Steroidhormone im Plasma.....	19
2.3.1 Material .....	19
2.3.2 Aufarbeitung der Proben .....	20
2.3.3 Festphasenextraktion.....	21
2.3.4 Quantifizierung, Ionisationsverfahren und Messmodus .....	22
2.4 p180 Metabolomics Kit (LC-MS/MS) .....	23
2.4.1 Material .....	24
2.4.2 Aufarbeitung.....	26
2.4.3 Derivatisierung der Aminosäuren.....	27
2.4.4 Quantifizierung.....	28
2.5 Statistische Auswertung .....	28
2.5.1 Analyse der Steroidhormondaten.....	29
2.5.2 Analyse der Metabolomics Daten .....	30

3. ERGEBNISSE.....	31
3.1 Ergebnisse der Steroid-Studie.....	31
3.1.1 Die Studienpatient*innen .....	31
3.1.2 Steroidhormon-Profiling .....	32
3.1.3 Logistisches Regressionsmodell.....	38
3.2 Ergebnisse der Metabolomics-Studie .....	43
3.2.1 Die Studienpatient*innen .....	43
3.2.2 Metabolomics-Profiling.....	44
3.2.3 Bioinformatische Modellierung .....	60
4. DISKUSSION .....	61
4.1 Limitationen der Studie .....	61
4.2 LC-MS/MS als Methode zur Analyse von Metabolit- und Hormonprofilen.....	62
4.3 Steroidhormon-Massenspektrometrie.....	63
4.3.1 LC-MS/MS in der Steroidhormonanalyse.....	63
4.3.2 Diskussion der Steroidhormonanalyse.....	64
4.4 Metabolomics in der Differentialdiagnose von Nebennierentumoren.....	67
4.4.1 LC-MS/MS und Metabolomics .....	67
4.4.2 Diskussion der Glycerophospholipid-Ergebnisse .....	68
4.4.3 Diskussion der Aminosäuren-Ergebnisse .....	70
4.4.4 Diskussion der Sphingomyelin-Ergebnisse.....	71
4.4.5 Diskussion der diagnostischen Aussagekraft.....	72
4.5 Ausblick .....	74
5. ZUSAMMENFASSUNG .....	75
6. LITERATURVERZEICHNIS .....	76
APPENDIX .....	84
I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	98
II ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	100
III TABELLENVERZEICHNIS .....	100
IV DANKSAGUNG.....	102
V EIGENE VERÖFFENTLICHUNG UND KONGRESSTEILNAHME .....	103

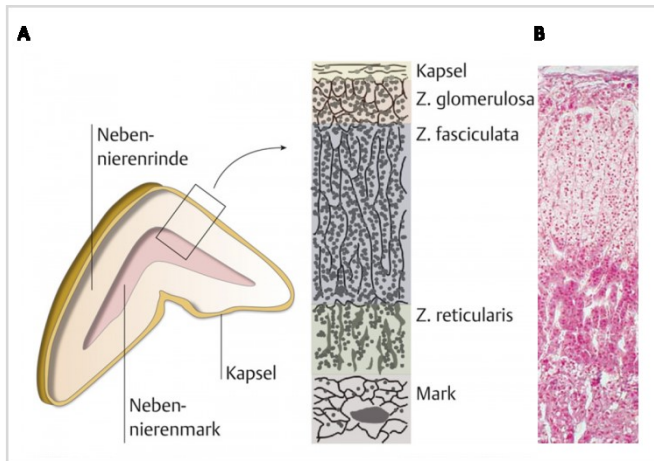
## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Die Nebenniere – Anatomie und Funktion

Die retroperitoneal gelegenen Nebennieren (NN) sind paarig angelegte Drüsen, welche dem apikalen Pol der Niere aufsitzen und sich mit dieser die sie umgebende Fettkapsel (Capsula adiposa) teilen [1]. Man unterscheidet die Nebennierenrinde, welche den Hauptsyntheseort für Steroidhormone darstellt und aus dem Mesoderm entstanden ist von dem Nebennierenmark, in dem die Synthese von Noradrenalin und Adrenalin stattfindet und das entwicklungsgeschichtlich ein modifiziertes sympathisches Ganglion darstellt [1]. Die Innervation der Zellen des Nebennierenmarks erfolgt über präganglionäre sympathische Neurone [1]. Die ausgeschütteten Katecholamine bewirken über verschiedene Rezeptoren an Herz, Lunge und Gefäßen eine Anpassung des Körpers an Belastungssituationen im Sinne einer „fight or flight“-Antwort [2].

Die Nebenniere wird über drei Arterien mit Blut versorgt. Aus der Arteria (A.) phrenica inferior entspringt die A. suprarenalis superior, direkt der Aorta abdominalis entstammt die A. suprarenalis media und aus der A. renalis die A. suprarenalis inferior [3]. Über sinusoide Kapillaren, die radiär durch die Rinde ziehen und schließlich in Sinusoide des Markes übergehen, werden auch die Markzellen arteriell versorgt und stehen zugleich unter dem Einfluss der Rindenhormone [4], was einer parakrinen Kontrolle durch die äußeren Schichten entspricht [5]. Die venöse Drainage erfolgt jedoch in der Regel über je nur ein Gefäß, nämlich die Vena (V.) suprarenalis, welche auf der rechten Seite direkt in die V. cava inferior und auf der linken Seite in die V. renalis mündet [3].

Histologisch betrachtet teilt man die Nebennierenrinde wie in Abbildung 1 gezeigt in drei Bereiche ein, die sich auch funktionell unterscheiden [4]. In der äußersten Zona glomerulosa werden die Mineralocorticoide synthetisiert, welche entscheidend an der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts beteiligt sind. Die in der Mitte gelegene Zona fasciculata ist Hauptsyntheseort der Glucocorticoide, welche gerade mit dem „Stresshormon“ Cortisol zur Anpassung des Körpers an Belastungssituationen führen. Die an das Nebennierenmark grenzende Zona reticularis ist Ort der Androgensynthese, sowie der Synthese geringer Mengen an Glucocorticoiden [4].



**Abbildung 1 Histologie der Nebenniere**

(A) Schematische Darstellung eines senkrechten Schnitts durch die Nebenniere mit histologischer Entsprechung. Übernommen von [6]; (B) Histologischer Paraffinschnitt der Nebenniere in Azan-Färbung, 90-fache Vergrößerung. Modifiziert nach [7].

## 1.2 Wirkung und Regulation der Steroidhormone der Nebennierenrinde

Da Steroidhormone erst auf einen adäquaten Stimulus hin synthetisiert werden, liegen sie nicht präformiert in den Zellen vor, sondern unterliegen einer Feinregulation durch unterschiedliche Systeme [4].

Im Falle der Mineralocorticoide (v.a. Aldosteron) geschieht die Regulation hauptsächlich über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), indem das infolge verminderter Natriumkonzentrationen im distalen Tubulus der Niere oder eines abfallenden renalen Perfusionsdrucks gebildete Angiotensin II zur Synthese und Sekretion des Aldosterons führt [5]. Genauso führen auch erhöhte Konzentrationen an Kaliumionen zur Sekretionsstimulation [5]. Die Rolle der zentralen Regulation über das hypothalamisch-hypophysäre System ist dahingegen als eher gering einzuschätzen [5]. Zur Hauptwirkung des Aldosterons gehört allgemein eine Natriumretention, Kaliumsekretion und Flüssigkeitsretention [8]. Die Wirkorte befinden sich an den Tubuli der Nieren, dem Darmepithel, sowie den Schweiß- und Speicheldrüsen [8], wo das Aldosteron seine Wirkung über intrazelluläre Mineralocorticosteroidrezeptoren vermittelt [5]. An der Niere sorgt es über den vermehrten Einbau epithelialer Natriumkanäle (ENaC) für eine gesteigerte Natriumrückresorption [5] und kann so im Falle eines Hyperaldosteronismus zu einer medikamentös schwer einstellbaren Hypertonie führen [8]. Das durch vermehrte Vorhofdehnung von Zellen des rechten Vorhofs synthetisierte natriuretische Atriumpeptid (ANP) hemmt bei Volumenbelastung die Aldosteronfreisetzung [9].

Anders verhält es sich bei der Kontrolle der Glucocorticoidsekretion (v.a. Cortisol), welche vornehmlich über das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) aus der Hypophyse reguliert wird [5]. Das hypothalamische Corticotropin-Releasing Hormon (CRH) führt in der Adenohypophyse zur Synthese von Proopiomelanocortin (POMC) und über dessen Spaltung unter anderem zu ACTH [5]. Über den Blutstrom an der Nebennierenrinde angelangt, kommt es hier über G-Protein gekoppelte Rezeptoren zur Aktivierung der Synthese und Sekretion des Cortisols [5]. Im Sinne einer negativen Rückkopplung hemmt das Cortisol auf der Hypothalamus-Hypophysen-Ebene die Expression von CRH und folglich auch von ACTH, niedrige Cortisolspiegel stellen wiederum den physiologischen Reiz zur Sekretion von CRH und ACTH dar [5]. Dieser Regelkreis unterliegt einem zirkadianen Rhythmus und ist durch Stress induzierbar [5]. Folglich findet der Hauptteil der Sekretion in den frühen Morgenstunden statt (6 – 8 Uhr), um Mitternacht hingegen ist die Produktion minimal [8]. Das gebildete Cortisol liegt im Plasma größtenteils an das Transportprotein corticosteroid binding globulin (CBG), auch Transcortin genannt, gebunden vor [5]. Das lipophile Cortisol bindet an intrazelluläre Glucocorticoidrezeptoren, die wiederum an regulatorische DNA-Sequenzen binden und Einfluss auf Transkription und Translation nehmen [10]. Seine Wirkung für den Organismus ist gekennzeichnet durch dessen Anpassung an Stress- und Belastungssituationen [2]. Hierfür muss der Körper Energiereserven mobilisieren. Dies wird u.a. durch die Stimulation der Gluconeogenese, eine gesteigerte Proteinolyse und eine Hemmung der Lipogenese erreicht [5]. Weiterhin entfaltet Cortisol antiphlogistische Wirkung, indem es die zelluläre und humorale Immunabwehr supprimiert [5]. Einige der genannten Wirkungen des Cortisols macht man sich in der Pharmakotherapie beispielsweise bei Autoimmunerkrankungen oder Transplantatabstoßungen zu Nutze [5]. Dass jedoch ein Zuviel an Cortisol dem Körper schadet, zeigen Erkrankungen wie das Cushing-Syndrom oder auch der iatrogene Hypercortisolismus [9].

Wie die Glucocorticoide unterliegen auch die adrenalen Androgene der Steuerung durch ACTH aus der Hypophyse [11]. Sie sind Hormonvorläufer und werden erst in anderen Geweben (Ovar, Hoden) zu aktiven Metaboliten umgewandelt [4]. Die meisten Androgene werden bei Männern jedoch nicht in der Nebenniere, sondern in den Leydig-Zellen des Hodens synthetisiert und unterliegen hypothalamisch-hypophysärer Kontrolle [9]. Durch sie entstehen die männlichen Geschlechtsmerkmale [9]. Bei Frauen entstammen die Androgene zu je etwa der Hälfte der Nebenniere und den Ovarialzellen [9].



### 1.3 Synthese der Steroidhormone

Die ersten Schritte der Steroidhormonbiosynthese sind für alle drei Steroidhormongruppen identisch [9]. Das in der Zelle als Cholesterinester gespeicherte Cholesterin muss zunächst durch die Cholesterinester-Hydrolase freigesetzt werden [9]. Dies wird möglich, nachdem durch Bindung des entsprechenden glandotropen Hormons an den Zellrezeptor die intrazelluläre Konzentration des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) steigt und infolgedessen die Proteinkinase A (PKA) aktiviert wird [9]. Sie phosphoryliert das Enzym Cholesterinester-Hydrolase und aktiviert es somit [9]. Das nun entstandene Cholesterin gelangt an das steroidogenic acute regulatory Protein (StAR-Protein) gebunden in den Intermembranraum der Mitochondrien, wo es an der inneren Membran von der Cholesterin-Desmolase (auch *P450<sub>scc</sub>* oder *CYP11A1* genannt) umgesetzt wird [9]. Wichtigstes Produkt dieser Reaktion ist das Pregnenolon, welches die Ausgangssubstanz für die Biosynthese aller Steroidhormone darstellt [9]. Pregnenolon wird durch die 3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase zu Progesteron und über die 17 $\alpha$ -Steroidhydroxylase zu 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron [9]. Selbiges Enzym katalysiert die Entstehung von 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon aus Pregnenolon [9]. Von hier aus können alle drei Wege der Steroidsynthese eingeschlagen werden (Abbildung 2) [9].

#### Synthese der Mineralocorticoide

Pregnenolon wird durch die 3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase an C<sub>3</sub> oxidiert und die Doppelbindung in den Ring A verschoben, wodurch Progesteron entsteht [9]. Durch Hydroxylierung an C<sub>21</sub> entsteht das 11-Deoxycorticosteron und durch weitere Hydroxylierung an C<sub>18</sub> und C<sub>11 $\beta$</sub>  das 18-Hydroxycorticosteron [9]. Im nachfolgenden Schritt entsteht schließlich durch eine Oxidation an C<sub>18</sub> eine Aldehydgruppe und somit das Aldosteron [9].

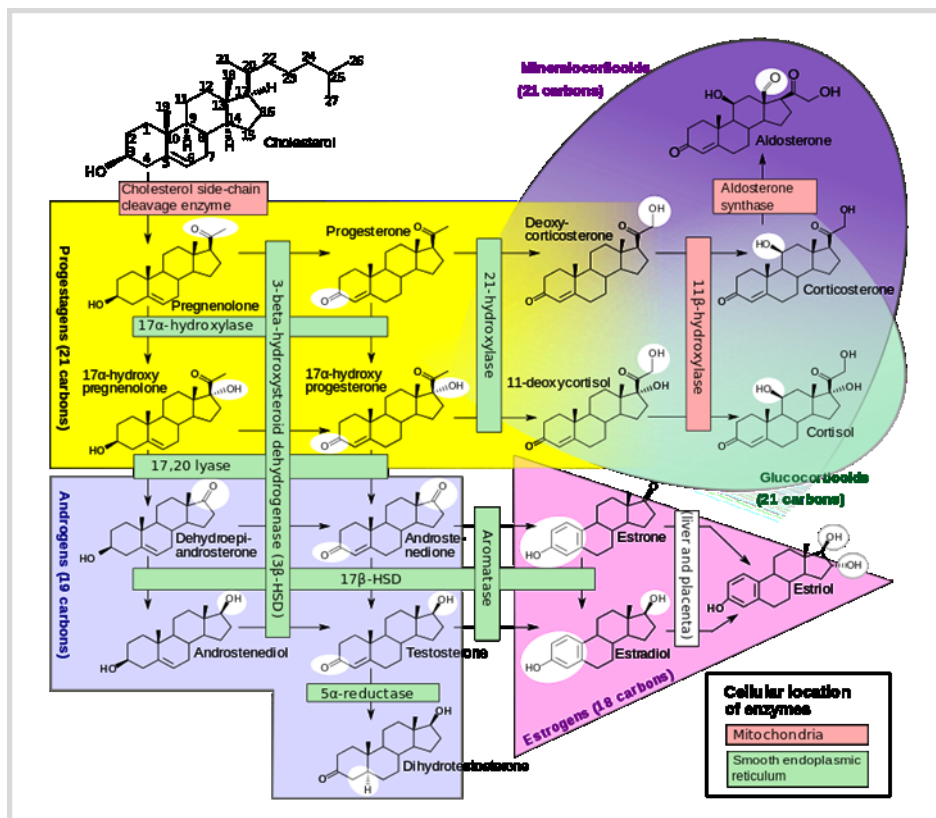
#### Synthese der Glucocorticoide

Wie auch bei den Mineralocorticoiden, wird Pregnenolon zunächst zu Progesteron umgesetzt [9]. Die nachfolgenden drei Hydroxylierungen an den Positionen 17 $\alpha$ , 21 $\beta$  und 11 $\beta$  werden durch die entsprechenden Steroidhydroxylasen katalysiert und es entsteht das Cortisol [9]. Die Hydroxylgruppe an Position 11 wird zur Ketogruppe oxidiert, wodurch aus Cortisol Cortison entsteht [9].

#### Synthese der Androgene

Aus 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon und 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron entstehen über die 17,20-Lyase die androgen wirksamen Substanzen Dehydroepiandrosteron (DHEA) und

Androstendion, die durch die 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase zu Androstendiol und Testosteron reduziert werden [9]. Die nachfolgenden Syntheseschritte finden in Ovarien, Testes oder der Prostata statt [12]. Über die Abspaltung der Methylgruppe an C<sub>19</sub> und nachfolgender Aromatisierung von Ring A entsteht Estron und Estradiol [9]. In der Prostata findet die Umwandlung von Testosteron in das 5-fach stärker wirksame Dihydrotestosteron mit Hilfe der 5 $\alpha$ -Reduktase statt [12].



**Abbildung 2 Steroidhormonbiosynthese**

Synthese der humanen Steroidhormone aus Cholesterin. Die mitochondrialen Enzyme sind in roten Kästen, die des glatten endoplasmatischen Retikulums in grünen Kästen aufgeführt. Übernommen von [13].

## 1.4 Nebenniereninzidentalome

Zufällig im Rahmen einer Bildgebung aufgefallene Raumforderungen der Nebenniere werden als Inzidentalome bezeichnet [14]. Im Zuge des wachsenden Einsatzes moderner Bildgebungen, nimmt ihre Prävalenz stetig zu [15] und wird in Autopsie-Studien mit ca. 3% bei über 50-jährigen beschrieben [16], während in radiologischen Studien ebenfalls von Häufigkeiten von ca. 3% und steigenden Zahlen mit zunehmendem Alter gesprochen wird [14]. Die Ätiologie dieser Raumforderungen ist unterschiedlich und erfordert eine entsprechende Differentialdiagnose. Neben

benignen Tumoren, wie Adenomen, Hyperplasien oder mikro- und makronodulären Veränderungen, kann es sich auch um maligne Befunde handeln [17]. Sie können sich sowohl in der Nebennierenrinde, als auch dem Nebennierenmark manifestieren oder extraadrenalen Ursprungs sein [14]. Nebennierentumore können zu einem Glucocorticoid-, Mineralocorticoid-, Androgen- oder Östrogenexzess führen und so klinisch apparent werden [17].

Zumeist handelt es sich um Adenome der Nebenniere (41%), die entweder hormonell inaktiv sind oder autonom Hormone (Cortisol, Aldosteron) sezernieren und so beispielsweise als adrenales Cushing-Syndrom klinische Relevanz erlangen, aber auch ein Phäochromozytom (8%) oder das sehr seltene Nebennierenrindenzarzinom (10%) kann sich hinter dem zufällig entdeckten Tumor verbergen [17]. Ebenso kann es sich um Myelolipome (9%) oder Metastasen (19%) [17] von Bronchial-, Mamma- oder auch Nierenkarzinomen handeln [8].

#### **1.4.1 Das Nebennierenkarzinom**

Mit einer Inzidenz von jährlich 0,5 bis 2 Fällen pro Million Einwohner, ist das Nebennierenrindenzarzinom (auch: adrenocorticales Carcinom, ACC) eine sehr seltene Tumorerkrankung [18, 19]. Mehr als die Hälfte dieser Karzinome manifestiert sich vor dem 45. Lebensjahr [20], wobei die Erkrankung in jedem Alter auftreten kann [21]. Frauen sind 1,5 Mal häufiger betroffen als Männer [19, 20]. Im Mittel beträgt die Überlebensrate bei Patient\*innen mit Nebennierenkarzinom 45 Monate [22]. Assié *et al* berichten in Zusammenschau mehrerer Studien von einer 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von 11-62% nach kurativer Resektion des Tumors [23]. Je nachdem, ob der Tumor Hormone produziert oder nicht, wird die Erkrankung früher oder später entdeckt [17]. Handelt es sich nämlich um einen hormoninaktiven Tumor, fällt der Tumor nicht selten erst in späten Stadien durch Symptome der lokalen Raumforderung auf [24]. Die Metastasierung erfolgt hauptsächlich in Lymphknoten, Lunge, Leber und Knochen [18]. Bis 2004 die International Union Against Cancer (UICC) mit den TNM-Kriterien die erste Staging-Klassifikation veröffentlichte, war keine einheitliche Klassifikation der Nebennierenkarzinome gegeben. Um die prognostische Aussagekraft zu steigern, werden die Nebennierenrindenzarzinome seit 2008 anhand der in Tabelle 1 dargestellten ENSAT (European Network for the Study of Adrenal Tumors)-Klassifikation in vier Stadien eingeteilt [18]:

**Tabelle 1 Stadieneinteilung des Nebennierenrindenzinoms nach der ENSAT-Klassifikation**

T1: Tumor ≤ 5 cm, T2: Tumor > 5 cm, T3: Tumordinfiltration in umgebendes Gewebe, T4: Tumordinvasion in angrenzende Organe oder venöser Tumorthrombus in V. cava/ V. renalis, N1: Lymphknotenbefall, M1: Fernmetastase(n). Übernommen von [18].

ENSAT-Stadium	TNM
I	T1, N0, M0
II	T2, N0, M0
III	T1-T2, N1, M0
	T3-T4, N0-N1, M0
IV	T1-T4, N0-N1, M1

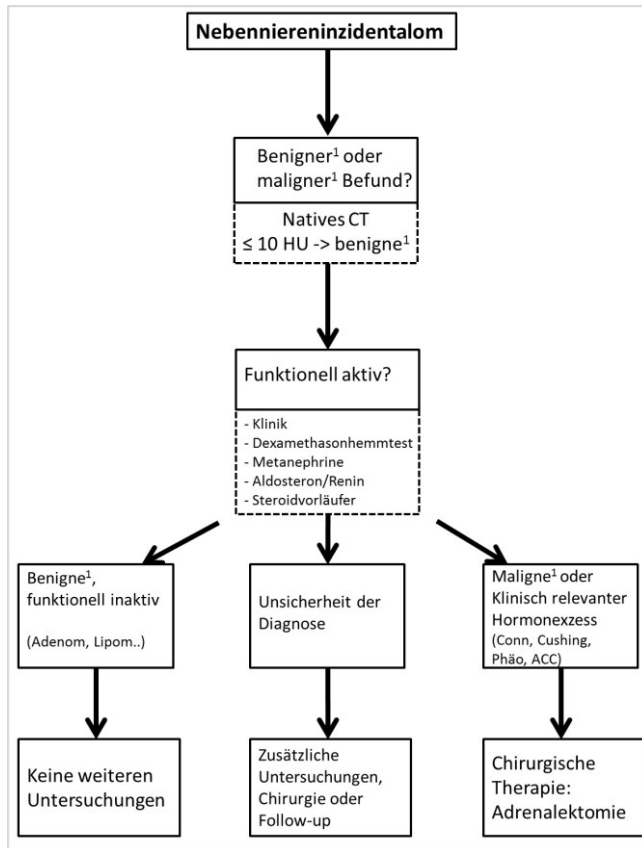
#### 1.4.2 Diagnostisches Vorgehen bei Nebenniereninzidentalomen

Ziel der Diagnostik soll es sein, möglichst schnell zu einer definitiven Diagnose zu gelangen [14]. Hierzu muss, wie in Abbildung 3 zu sehen, zunächst die Frage gestellt werden, ob es sich möglicherweise um einen malignen Tumor handeln könnte [14]. Bildgebende Methode der Wahl ist hierbei die Computertomographie (CT), wobei eine dabei gemessene Abschwächung der Röntgenstrahlen ≤ 10 Hounsfield Units (HU) im nicht kontrastverstärkten CT für einen benignen Befund sprechen [14]. Bei Unklarheiten kann ein washout CT, eine Magnetresonanztomographie (MRT) mit chemical shift oder eine Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET) durchgeführt werden [14]. Hierbei sprechen ein absolutes washout >60% und ein relatives washout >40% im CT genau wie eine fehlende Signalintensität in der „out-phase“ im MRT oder geringe FDG-Aufnahme im FDG-PET für einen benignen Befund [14].

Die Frage nach der funktionellen Aktivität des Tumors kann anhand des klinischen Bildes, sowie einer Reihe biochemischer Tests beantwortet werden [14]. Dazu zählen der Dexamethasonhemmtest, die Bestimmung des Plasma- oder Urinmetanephrins und Normetanephrins (obligater Ausschluss eines Phäochromozytoms), die Bestimmung des Aldosteron/Renin-Quotienten bei Patient\*innen mit Begleiterscheinungen wie Hypertonie oder Hypokaliämie, sowie die Bestimmung der Sexualhormone und Steroidvorläuferhormone bei Verdacht auf Nebennierenkarzinom [14]. Mithin richtet sich das therapeutische Vorgehen entscheidend nach der wahrscheinlichen Dignität und der Hormonaktivität des Tumors. Handelt es sich um eine nicht-funktionelle, gutartige Läsion wie beispielsweise um ein hormonell inaktives Adenom, folgen keine weiteren Untersuchungen und eine chirurgische Therapie wird

nicht empfohlen [14]. Produziert das Adenom hingegen Cortisol, hängt das weitere Vorgehen von dem Ergebnis des 1mg-Dexamethasonhemmtests und dem Vorhandensein Cortisol-bezogener Komorbiditäten ab, sodass dann individuell über die Notwendigkeit einer chirurgischen Therapie entschieden wird [14]. In malignen Fällen oder Fällen mit klinisch relevantem Hormonexzess sollte dann eine Adrenalectomie erfolgen (siehe 1.4.3) [14].

Ist bei der Bildgebung in unterschiedlichen Modalitäten der Befund nicht eindeutig beurteilbar, stehen der European Society of Endocrinology (ESE) und ENSAT-Leitlinie [14] zufolge drei Optionen zur Verfügung: eine umgehende chirurgische Resektion, unmittelbar eine erneute Bildgebung mit einer anderen bildgebenden Methode oder ein erneutes natives CT oder MRT nach 6 - 12 Monaten [14]. Hat in diesem Zeitraum eine Vergrößerung des Befunds um mehr als 20% stattgefunden, wobei der maximale Durchmesser um mindestens 5 mm größer geworden sein muss, wird eine chirurgische Resektion empfohlen [14]. Ist kein signifikantes Wachstum zu sehen, kann eine erneute Bildgebung nach 6 - 12 Monaten durchgeführt werden und ein maligner Befund ist somit eher unwahrscheinlich [14].



**Abbildung 3 Diagnostischer Pfad bei Nebenniereninzidentalomen**

Dignität und funktionelle Aktivität des Tumors entscheiden über weitere Untersuchungen und Therapie. Eigene Darstellung modifiziert nach [14]. <sup>1</sup>Die Begriffe *benigne* und *maligne* bezeichnen hier die mutmaßliche Dignität anhand bildgebender und klinischer Charakteristika. Die tatsächliche Dignität kann jedoch nur histologisch endgültig geklärt werden.

### 1.4.3 Therapie des Nebennierenkarzinoms

Um bei Patient\*innen mit einseitigem Nebennierentumor die adäquate Therapie einzuleiten, müssen die radiologischen und hormondiagnostischen Befunde betrachtet werden [14]. Ist die Bildgebung suspekt für einen malignen Befund oder zeigt sich ein relevanter Hormonexzess, wird die chirurgische Adrenaektomie empfohlen [14]. Finden sich zusätzlich zum malignen Befund in der Bildgebung Zeichen der lokalen Invasion in umliegende Gewebe, soll eine offene Adrenaektomie erfolgen [14]. Liegen hingegen keine lokalinvasiven Zeichen vor und der Tumordurchmesser ist kleiner oder gleich 6 cm oder es besteht lediglich ein relevanter Hormonexzess, wird eine laparoskopische Adrenaektomie empfohlen [14]. In Grenzfällen, bei denen zwar radiologisch ein suspekter Befund besteht und keine Lokalinvasion zu finden ist, der Tumordurchmesser jedoch größer als 6 cm ist, muss über den chirurgischen Zugang individuell entschieden werden [14]. Dies bedeutet jedoch auch, dass Patient\*innen einer Operation und allen mit ihr verbundenen Risiken ausgesetzt werden, um in

möglichst allen Fällen ein Nebennierenkarzinom operativ zu kurieren, dies wäre *ex post* jedoch im Falle einer benignen histologischen Diagnose nicht notwendig gewesen.

Perioperativ soll bei Patient\*innen mit (möglicher) autonomer Cortisol-Sekretion wegen der Gefahr einer Nebenniereninsuffizienz infolge der Entfernung der adrenalen Cortisolquelle und resultierender sekundärer Nebennierenrindeninsuffizienz eine Glucocorticoidsubstitution durchgeführt werden [25].

### **Therapie des primären Nebennierenkarzinoms**

Ziel der chirurgischen Therapie beim Nebennierenkarzinom ist stets eine mikroskopisch komplette Resektion (R0 Resektion) [26]. Ist dies gelungen, werden die Patient\*innen anhand des Proliferationsmarkers Ki67 in „low risk“- (Ki67  $\leq$  10%) und „high risk“- (Ki67  $>$  10%) Gruppen eingeteilt, um die nachfolgende Therapie zu planen [26]. Während für diese „low risk“-Gruppe eine adjuvante Therapie mit Mitotane möglicherweise nicht erforderlich ist, wie erste Ergebnisse der randomisierten ADIUVO (Efficacy of Adjuvant Mitotane Treatment)-Studie zeigten, erhalten in den meisten Europäischen Zentren die Patient\*innen der „high risk“-Gruppe eine adjuvante Mitotanetherapie [26]. Konnte keine R0 Resektion erfolgen (R1/Rx), empfiehlt die ESE-Clinical Practice Guideline [26] eine adjuvante Mitotanetherapie und eine Tumorbettbestrahlung [26, 27].

### **Mitotane**

Mitotane (1,1-dichlorodiphenyldichloroethane, o.p.'-DDD) ist ein seit den 1960er Jahren bekanntes Adrenolytikum, welches in der adjuvanten Situation wahrscheinlich mit einem verlängerten rezidivfreien und möglicherweise Gesamtüberleben assoziiert ist [28]. In der metastasierten Situation wurde ein objektives Tumorausprechen gezeigt [28-31]. Seine Wirkung wird durch die Aktivierung von endoplasmatischem Retikulum-Stress erklärt [32]. Um ein therapeutisches Ansprechen zu gewährleisten, wurden in älteren Publikationen Wirkspiegel von  $\geq 14$  mg/l empfohlen [33, 34]. Bei jedoch geringem therapeutischen Fenster und einer, mit steigenden Konzentrationen zunehmenden Toxizität, sollten Plasmaspiegel zwischen 14 und 20 mg/l eingehalten werden [35-38], wobei diese Wirkspiegel nur in etwa der Hälfte der Patient\*innen erreicht werden [36, 39]. Zu den Nebenwirkungen gehören beispielsweise gastrointestinale Beschwerden (Übelkeit, Diarrhö), neurologische Störungen (Ataxie, Schwindel) und erhöhte Leberwerte [28, 36, 40]. Langfristig führt die Einnahme von Mitotane zu einer Insuffizienz der Nebennierenrinde und erfordert eine entsprechende

Substitutionstherapie [28, 41, 42]. Durch die Induktion des Enzyms CYP3A4 kommt es bei Mitotantherapie zu starken Interaktionen mit anderen Medikamenten (z.B. Makrolid-Antibiotika, Simvastatin), die über diese mikrosomale Monooxygenase verstoffwechselt werden [43].

### **Therapie des Rezidivs**

Die Therapie des Rezidivs ist abhängig von der Dauer des krankheitsfreien Intervalls [26]. Betrug dieses Intervall mehr als 12 Monate, sollte eine chirurgische Resektion angestrebt werden, sofern diese komplett möglich erscheint [26]. Andernfalls kommt eine chirurgische Reduktion der Tumorlast und medikamentöse Therapie (z.B. Mitotane + Cisplatin) in Betracht [26]. In beiden Fällen folgt dann eine Therapie mit Mitotane, außer wenn bei Auftreten des Rezidivs bereits Mitotane eingenommen wurde [26]. In diesem Fall sollte die Therapie mit Mitotane um zusätzliche zytotoxische Therapeutika ergänzt werden [26]. Unterschritt das krankheitsfreie Intervall 6 Monate bis zum Auftreten des Rezidivs, entspricht die Therapie jener des fortgeschrittenen Nebennierenkarzinoms [26]. In Grenzfällen muss eine individuelle Therapieentscheidung im multidisziplinären Team erfolgen [26, 27].

### **Therapie des fortgeschrittenen Nebennierenkarzinoms**

Hat in diesem Stadium bereits eine (adjuvante) Therapie mit Mitotane stattgefunden, sollte das Therapieregime um Etoposid, Doxorubicin und Cisplatin (EDP) ergänzt werden [26]. Andernfalls kann eine Hochdosismonotherapie mit Mitotane eingeleitet werden [26]. Zeichnet sich jedoch ein rapider Verlauf ab, sollte auch hier EDP hinzugenommen werden [26]. Die Mitotanespiegel müssen im Verlauf regelmäßig kontrolliert werden [35]. Als Zweitlinientherapie kommen Streptozotocin plus Mitotane, sowie Gemcitabine plus Capecitabine in Frage [26]. Die weitere Verbesserung der Therapie ist immer noch Gegenstand vieler Studien. Monotherapien mit Multi-Tyrosinkinaseinhibitoren wie Sunitinib, IGF1-Rezeptor-Antikörpern oder Radionuklidtherapie mit [<sup>131</sup>I]Iodometomidat erbrachten kein klinisch signifikantes Ansprechen in der Mehrzahl der Fälle [27]. Grundsätzlich sollen auch lokale Therapieansätze wie Radiofrequenzablation, Chemoembolisation, Bestrahlung oder Kryoablation bei fortgeschrittenen Stadien zusätzlich zur systemischen Therapie in Erwägung gezogen werden [26].



## 1.5 Studien zu Steroidhormonanalysen in der Differentialdiagnose von Nebennierentumoren

Die Suche nach Malignitätsmarkern bei Nebennierenraumforderungen führte schon vor Jahrzehnten auf die Fährte der veränderten Steroidogenese und Steroidhormonproduktion [44, 45]. In neueren Studien wird deren diagnostische Tauglichkeit evaluiert.

An dieser Stelle sei hauptsächlich auf das Paper von Arlt *et al.* [46] hingewiesen. In dieser Studie mit dem Titel „Urine Steroid Metabolomics as a Biomarker Tool for Detecting Malignancy in Adrenal Tumors“ wurde 24-Stunden-Sammelurin von 102 Nebennierenrindenadenom- und 45 Nebennierenrindenkarzinompatient\*innen mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) analysiert, um über das bioinformatische Verfahren einer sogenannten „matrix learning vector quantization“ diejenigen Steroide mit der besten Differenzierungsfähigkeit zu identifizieren. Hierbei wurde eine Kombination von neun Steroiden gefunden, die mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 88% maligne von benignen Nebennierentumoren diskriminiert [46].

In einer prospektiven Validierungsstudie verglichen Bancos und Taylor *et al.* [47] die diagnostische Genauigkeit der drei Bausteine Tumordurchmesser, Bildgebungscharakteristik und Urin-Steroidmetabolomics einzeln, sowie deren diagnostische Kombination. Hierbei konnte in der Trippel-Diagnostik mit Einbezug aller dreier Strategien die beste Treffsicherheit bei gleichzeitig geringster Rate an falsch-positiven Ergebnissen für die Diagnose von ACC gezeigt werden [47].

Die vorhergehende Studie aus diesem Forschungsbereich von Taylor *et al.* [48] zeigt die Entwicklung eines Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS)-basierten Steroidhormonpanels, das die Quantifizierung von 13 Steroidhormonen im Serum erlaubt und diagnostisch die Abgrenzung von ACCs von anderen Nebennierenläsionen erleichtern soll. Hierbei wurde das Serum von Patient\*innen mit ACC (N=10), Phäochromozytomen/Paragangliomen (N=15), Cortisol-produzierenden Adenomen (N=7) und hormonell inaktiven Läsionen (N=16) untersucht und die Analyse als hilfreich für die Differenzialdiagnose ACC und nicht-ACC-Läsion bewertet [48].

Dies würde nicht nur diese schwierige Differenzialdiagnose erleichtern, sondern auch die benötigte Labordiagnostik und Probengewinnung beschleunigen. Anders als in der Studie von Taylor *et al.* [48] wird in der vorliegenden Arbeit nun ein LC-MS/MS-

Plasma-Panel mit 15 Steroiden bei einer deutlich größeren Patient\*innenkohorte verwendet, um dessen diagnostischen Wert zu prüfen.

## **1.6 Metabolismus und Metabolomics bei Tumorerkrankungen**

Um ihren Energie- und Redoxstatus aufrecht zu erhalten, verändern Tumorzellen ihren Stoffwechsel [49, 50]. Schon in den 1920er Jahren entdeckte Otto Warburg eine gesteigerte Glykolyse und Laktatproduktion in Tumorzellen unabhängig der Sauerstoffverfügbarkeit [51]. Allerdings ist auch bekannt, dass die Tumorerkrankung als solche tiefgreifende Auswirkungen auf den Wirtorganismus haben kann [52, 53].

In den letzten Jahren hat es die Weiterentwicklung u.a. von massenspektrometrischen Methoden (v.a. LC-MS/MS) erlaubt, Stoffwechselprozesse auf einer globalen Ebene durch parallele Analyse zahlreicher Stoffwechselprodukte zu untersuchen [54]. Die LC-MS/MS ermöglicht bei gleichzeitig hoher Selektivität und Empfindlichkeit [55, 56] die Quantifizierung einer größeren Anzahl an Analyten, wie zum Beispiel Steroidhormonen, in einer Messung (Multiplexing) mit relativ geringem Zeitaufwand [54].

Als Metabolomics bezeichnet man generell die Analyse niedermolekularer Metaboliten in einer biologischen Probe wie Blut [57]. Dieses Verfahren ist für die Patient\*innenversorgung mit geringem Probengewinnungsaufwand, u.U. sogar minimalinvasiv und relativ schnell verfügbar [57]. Damit eignen sich Metabolomics grundsätzlich für diagnostische Zwecke sehr gut [58]. In mehreren Studien unterschiedlicher Fachbereiche wurden bereits Unterschiede im metabolischen Profil zwischen Tumorpatient\*innen (Kolon-, Pankreas-, Mundkarzinom) und der Kontrollgruppe herausgestellt [59-61], so auch für die Differenzierung zwischen der benignen Prostatahyperplasie (BPH) und dem Prostatakarzinom [58]. Hierbei haben Giskeødegård *et al.* [58] anhand unterschiedlicher Metabolomics-Messtechniken 29 Prostatakarzinompatienten mit 21 Kontrollpatienten verglichen. Dabei haben sie unter anderem auch das in der vorliegenden Arbeit angewandte AbsoluteIDQ p180 Kit (BIOCRATES Life Science AG, Innsbruck, Österreich) verwendet [58].

In dieser Arbeit wird nun ähnlich zur Arbeit von Giskeødegård *et al.* [58] eine metabolische Analyse durchgeführt, bei der Blutproben von Karzinompatient\*innen (ACC) mit denen von Patient\*innen mit adrenocorticalen Adenomen (ACA) verglichen werden und der diagnostische Wert metabolischer Analysen evaluiert wird.

## 1.7 Fragestellung dieser Arbeit

Die Diagnosestellung bei unklaren Nebennierentumoren fällt teilweise schwer: zwar können Tumorgroße, Klinik und Bildgebung Hinweise auf die Dignität des Tumors geben, dennoch können nicht alle Fälle eindeutig diagnostiziert werden [46]. Auch die Durchführung einer Biopsie ist in den meisten Fällen nicht sinnvoll, da sie die Risiken einer invasiven Diagnostik birgt und der pathologische Befund oftmals selbst für erfahrene Pathologen eine Herausforderung darstellt und somit wenig aussagekräftig ist [14, 62, 63]. Dennoch ist es entscheidend, das hochmaligne, mit einer schlechten Prognose [22] einhergehende ACC zuverlässig zu entdecken. Gerade im Hinblick auf die große Zahl an Nebenniereninzidentalomen, die mit dem steigenden Einsatz bildgebender Diagnostik und dem demographischen Wandel weiter zunimmt, wird die Notwendigkeit guter diagnostischer Mittel deutlich, um die dringend therapiebedürftigen Nebennierenkarzinome von den klinisch weniger relevanten Nebennierentumoren unterscheiden zu können [16, 46, 64], sowohl, um die Patient\*innen adäquat behandeln zu können, als auch, um sie vor unnötigen Eingriffen und Follow-up-Untersuchungen zu bewahren [16] und die Kosten für das Gesundheitssystem zu beschränken [65]. Das Hauptziel dieser Arbeit ist es, einen entsprechenden Beitrag zur Erleichterung der klinischen Diagnostik bei Nebennierentumoren zu leisten.

Im Einzelnen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Inwiefern kann die massenspektrometrische Bestimmung veränderter Steroidhormon-/ Metabolitkonzentrationen die Differentialdiagnose von Nebennierentumoren erleichtern?
- Gibt es geschlechtsspezifische Veränderungen der Steroidhormon-/ Metabolitkonzentrationen, die bei der Differentialdiagnose von Nebennierentumoren berücksichtigt werden müssen?
- Lässt sich anhand einer bioinformatisch modellierten Kombination mehrerer Steroidhormone/ Metaboliten die diagnostische Trennschärfe zwischen ACA und ACC verbessern?
- Ergeben sich tumorbedingte Einflüsse auf bestimmte Stoffwechselwege, die sich aus den veränderten Metabolitkonzentrationen ableiten lassen?

Im Rahmen dieser Arbeit ist mit dem Begriff „Steroidhormone“ auch der Steroidmetabolit DHEAS gemeint. Als „Metaboliten“ werden hier die Analyte bezeichnet, die mit dem Metabolomics-Kit gemessen wurden (siehe Tabelle 25 im Anhang).

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Studienpopulation**

Die verwendeten Plasmaproben wurden prospektiv im Rahmen der klinischen Routine als Teil der ENSAT Daten- und Biobank gesammelt. Dies wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg genehmigt (Genehmigungsnummern 86/03 und 88/11). Alle Patient\*innen hatten zuvor eine Einverständniserklärung erteilt.

Die EDTA (Ethyldiamintetraacetat) -Plasmaproben wurden morgens im Rahmen der Routinearbeit abgenommen, zentrifugiert und bei -80°C gelagert.

Eingeschlossen wurden Proben von Patient\*innen mit Cortisol-produzierendem oder hormoninaktivem Nebennierenadenom und Nebennierenkarzinom, wobei bei letzteren eine laufende Therapie mit Mitotane, Ketokonazol, Mifepriston oder Metyrapone ausgeschlossen war, um dadurch bedingte Veränderungen des Steroid- und Intermediatstoffwechsels auszuschließen. Proben von Patient\*innen mit ENSAT Stadium I-IV wurden eingeschlossen, um eine ausreichend große Stichprobenanzahl zu gewährleisten. Die jeweilige Diagnose wurde bei operierten Patient\*innen histologisch gesichert, bei nicht operierten wurde entsprechend der aktuellen ESE- und ENSAT-Leitlinie [14] verfahren, um die Dignität einzuordnen. Proben von Patient\*innen mit Conn-Adenomen wurden von der Studie ausgeschlossen, da diese z.B. im Rahmen einer Hypertonieabklärung durch Messung des Aldosteron-Renin-Quotienten und Bestätigungstest relativ sicher diagnostiziert werden können [66].

Ein Hormonexzess wurde entsprechend der klinischen Aufarbeitung auf Basis der Routinelabortestung mit Serum-Androstendion, DHEAS und Estradiol (in männlichen Patienten), Aldosteron-Renin-Quotient und freiem Cortisol (24-Stunden-Urin), sowie Dexamethasonhemmtest (DST) definiert.

Ein Glucocorticoidexzess wurde anhand der Leitlinie für Inzidentalome [14] definiert. Entsprechend wurden Patient\*innen mit autonomer (1 mg DST Cortisol >5 µg/dL) und möglicher autonomer (1 mg DST Cortisol 1,8-4,9 µg/dL) Cortisolsekretion als Cortisol-produzierende Tumore angenommen. Solche ohne Hinweis auf Hormonsekretion wurden folglich als hormonell inaktiv beschrieben.

## **2.2 Grundlagen der LC-MS/MS**

### **2.2.1 Flüssigchromatographie**

LC-MS/MS steht für Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie, die im Folgenden erklärt werden soll [67]. Bei der Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) werden die Eluenten mit Drücken zwischen 10 und 600 bar durch ein Trennsystem („Säule“) gepresst [68]. Hierbei stehen unterschiedliche Trennmethode zur Auswahl. Die am häufigsten eingesetzte ist die Umkehrphasen-HPLC und wird im Folgenden kurz erläutert [68]. Die Moleküle werden bei dieser Trennmethode nach ihrer Polarität getrennt [68]. Während alkylierte Kieselgelpartikel (C<sub>18</sub>-Ketten) als apolare stationäre Phase fungieren, sind die zu analysierenden Moleküle in einem polaren Lösungsmittel, der mobilen Phase (z.B. Wasser, Methanol, Acetonitril), gelöst [68]. Durchlaufen sie das apolare Säulenmaterial, werden apolare Moleküle durch stärkere Wechselwirkung retiniert, während polare Moleküle die Säule schneller durchlaufen [69]. Entsprechend ergibt sich eine Elutionsreihenfolge von polar nach apolar und die Moleküle werden in Abhängigkeit von der Retentionszeit von der Säule eluiert [69]. Um die durch sehr unterschiedliche Retentionszeiten entstehende lange Analysezeit zu verringern, bietet sich die sogenannte Gradientenelution an, bei der die Elutionskraft der mobilen Phase durch stufenweise Anpassung an die apolare Eigenschaft der stationären Phase verändert wird und sich apolare Moleküle somit schneller von der stationären Phase eluieren lassen [69]. Die anschließende Detektion kann anhand unterschiedlicher Detektionsprinzipien erfolgen [69]. Bei den Versuchen dieser Arbeit wurde eine massenspektrometrische Detektion durchgeführt.

### **2.2.2 Massenspektrometrie und Elektrosprayionisation**

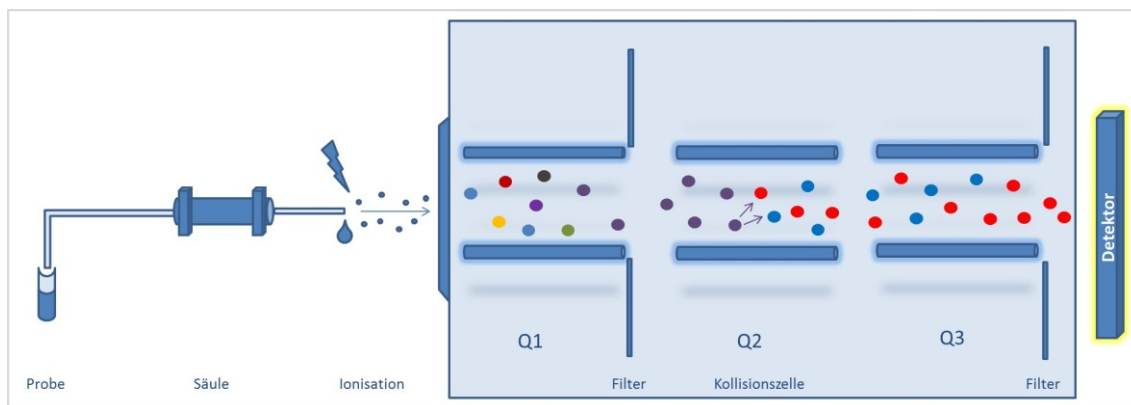
Bei der Massenspektrometrie werden organische oder anorganische Substanzen anhand ihres spezifischen Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses quantitativ und qualitativ bestimmt [70]. Hierzu müssen die Substanzen zunächst ionisiert werden [70]. Es stehen zahlreiche Ionisationsverfahren zur Verfügung, bei welchen es durch thermische Einflüsse, Beschuss mit energiereichen Teilchen (z.B. Ionen, Protonen, Elektronen) oder den Einfluss eines elektrischen Feldes zur Ionisation der Substanz kommt [70]. Obwohl die Proben während des Messvorganges durch Prozesse wie die Ionisation verbraucht werden, wird diese Methode dennoch nicht als destruktiv bezeichnet, da sie eines der wenigen Messinstrumente darstellt, welches mit außergewöhnlich geringen Probenmengen (Nanogramm) auskommen kann [70].

Trifft ein energiereiches Elektron in solcher Weise auf den Analyten, dass die übertragene Energie die Ionisierungsenergie des neutralen Moleküls übertrifft, kommt es durch den Verlust eines Elektrons zur Ionisierung des Moleküls [71]. Die in der Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) am häufigsten eingesetzte Ionisierungsmethode stellt die Elektrosprayionisation (ESI) dar, bei der die Moleküle vom kondensierten Zustand in einen gasförmigen gebracht werden [72]. Hierzu werden sie durch eine Metallkapillare geleitet, die mit der HPLC-Säule verbunden ist und zwischen deren Spitze und der Gegenelektrode ein elektrisches Feld angelegt ist [68]. Es kommt zu einer Anlagerung gleich geladener Ionen an der Spitze der Kapillare, die sich abstoßen [68]. Das nun entstehende Aerosol wird mit einem heißen Inertgas (z.B. Stickstoff) verdampft und es entstehen geladene Tröpfchen, deren Radius immer kleiner wird, bis es schließlich zur Zerreißung des Tropfens, der sogenannten „Coloumb-Explosion“, und der Freisetzung gasförmiger Ionen kommt [55]. Diese werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt und gelangen über ein Linsensystem in das Massenspektrometer [55]. Grundsätzlich gehören zum Aufbau des Massenspektrometers drei Komponenten, die unter Hochvakuumbedingungen betrieben werden: eine Ionenquelle, ein Massenanalysator und ein Detektor [70].

Nachdem die Ionisation erfolgt ist, kommt es entsprechend des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses zur Auftrennung der Analyten durch die Quadrupole [67]. Bei den Quadrupolen handelt es sich um vier Stabelektroden, wobei zwischen den jeweils gegenüberliegenden eine Wechselspannung angelegt ist, die von einer Gleichspannung überlagert wird [73]. Diese ist für ein Stabpaar positiv und für das andere negativ, sodass das jeweilige Ion auf seiner Flugbahn durch den Quadrupol-Analysator durch die Wechselspannung ausgelenkt und in Schwingung versetzt wird [73]. Gleichzeitig wird es abhängig von seiner Ladung von der positiven und negativen Gleichspannung zwischen den Stabpaaren entsprechend Richtung Mittellinie geschoben oder zu den Stäben gezogen [73]. Je nach Masse sind die Ionen zu leicht und entweichen zwischen den Stäben oder so schwer, dass sie an den Stäben entladen werden, wodurch nur Ionen eines definierten Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses detektiert werden [73].

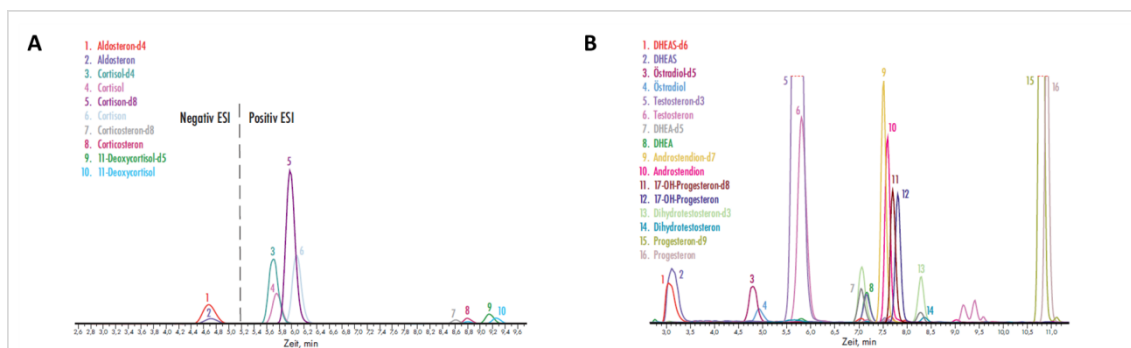
Bei Triple-Quadrupolen durchquert das Ion nach dem ersten Quadrupol noch zwei weitere, sodass mehrere Masseanalysen hintereinandergeschaltet sind, man spricht dann auch von einer Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) [67]. Wurde also bei Durchqueren des ersten Quadrupols das sogenannte Mutterion selektiert, durchläuft dieses anschließend eine Kollisionszelle, in welcher es durch ein Inertgas (z.B. Argon,

Stickstoff) beschossen wird und folglich in zwei Tochterionen fragmentiert [73]. Im letzten Quadrupol kommt es dann wiederum zur Selektion eines dieser Tochterionen und zu dessen Detektion (Abbildung 4) [73, 74]. Hier wurde nun die Auswertung im Selected Reaction Monitoring (SRM) Modus beschrieben. Ein weiterer Modus ist das Multiple Reaction Monitoring (MRM), der im Grunde eine Erweiterung des SRM-Modus auf multiple Tochterionen des fragmentierten Mutterions darstellt [55, 75]. Die detektierten Ionenströme werden jeweils als Massenspektrum abgebildet, das das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis gegen die relative Signalintensität darstellt [68]. Schließlich entsteht ein Chromatogramm (Abbildung 5) aus den nacheinander aufgezeichneten Massenspektren, die sich als Funktion der Retentionszeit darstellen [70].



**Abbildung 4 Schematische Darstellung des Probendurchlaufs durch LC-Säule, Ionisation und Triplequadrupol (Tandem-MS)**

Ionen als bunte Kreise. Nachdem die Probenmoleküle durch die Säule der Flüssigchromatographie aufgetrennt wurden, erfolgt die Ionisation (z.B. ESI) und Analyse im Massenspektrometer. Im ersten Quadrupol (Q1) wird ein Ion spezifischen Masse/Ladungs-Verhältnisses selektiert (lila), in der Kollisionszelle (Q2) mit Stickstoff fragmentiert (rot und blau) und schließlich im dritten Quadrupol (Q3) eines der beiden Tochterionen (rot) anhand seines Masse/Ladungs-Verhältnisses selektiert und folglich detektiert. Eigene Darstellung.



**Abbildung 5 Exemplarisches Chromatogramm von 13 Steroidhormonen nach einem typischen MS-Lauf**

Hier dargestellt für eine Analyse einer Chromsystems Kontrolle in zwei Panels. (A) Panel 1, (B) Panel 2. Übernommen von [76].

### 2.3 LC-MS/MS-Bestimmung der Steroidhormone im Plasma

Zur Bestimmung der 15 Steroide wurde das Reagenzienkit MassChrom® Steroide in Serum /Plasma von Chromsystems® (Gräfelfing) verwendet. Hierbei erfolgte die Bestimmung der Plasmakonzentrationen der folgenden 15 Steroide aufgeteilt in 2 Steroidpanels, die derselben Aufarbeitung unterlagen: Aldosteron, Cortisol, Cortison, Corticosteron, 11-Deoxycortisol, 21-Deoxycortisol, 11-Deoxycorticosteron, Androstendion, Dehydroepiandrosteron (DHEA), Dehydroepiandrosteronsulfate (DHEAS), Dihydrotestosteron, Estradiol, 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron, Progesteron und Testosteron.

#### 2.3.1 Material

Die verwendete Laborausrüstung, sowie die benötigten Reagenzien, Geräte und Materialien werden nachfolgend in tabellarischer Form aufgeführt.

**Tabelle 2 LC-MS/MS Reagenzienkit MassChrom® Steroide im Serum/Plasma**  
Modifiziert nach [76].

<b>Reagenzien und Zubehör</b>
<b>Mobile Phase A</b>
<b>Mobile Phase B</b>
<b>Elution Buffer</b>
<b>Internal Standard Mix</b>
<b>Extraction Buffer</b>
<b>Reconstitution Buffer</b>
<b>Equilibration Reagent 1</b>
<b>Equilibration Reagent 2</b>
<b>Rinsing Solution</b>
<b>Wash Buffer</b>
<b>6PLUS1® Multlevel Serum Calibrator Set MassChrom® Steroid Panel 1 (lyophilisiert)</b>
<b>6PLUS1® Multlevel Serum Calibrator Set MassChrom® Steroid Panel 2 (lyophilisiert)</b>
<b>MassCheck® Steroid Panel 1 Serum Control Level I,II,III (lyophilisiert)</b>
<b>MassCheck® Steroid Panel 2 Serum Control Level I,II,III (lyophilisiert)</b>
<b>Steroid-Auffangplatten</b>
<b>Steroid-96-SPE-Well-Platte</b>
<b>Abdeckfolien, geschlitzt, für 96-SPE-Well-Platten</b>
<b>Analytische Säule (äquilibriert, mit Testchromatogramm)</b>
<b>Edelstahl-Vorfiltergehäuse</b>
<b>Edelstahl-Vorfilterblättchen, 0,5 <math>\mu</math>m</b>
<b>Bördelkappen, 11mm, mit Gummi/PTFE-Septen</b>
<b>Adapter für Autosamplergefäße mit konischem Boden</b>
<b>Röhrchen für die Probenvorbereitung</b>
<b>Waste Plates</b>



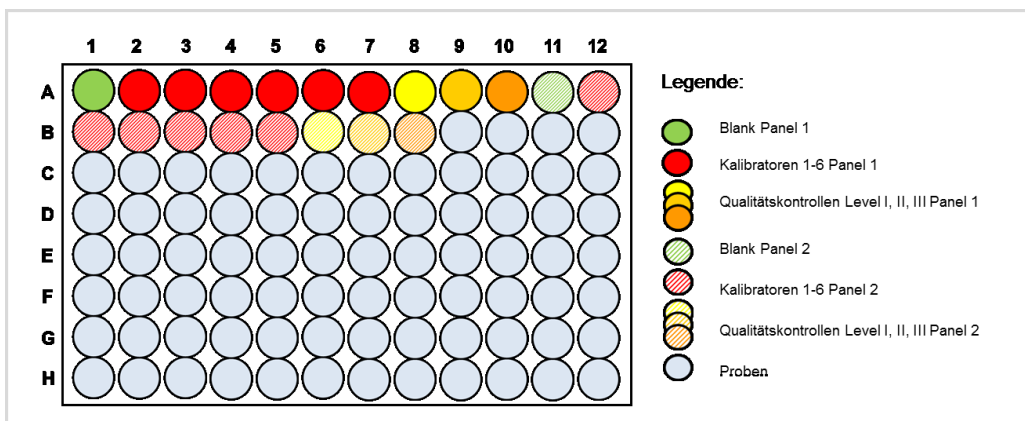
**Tabelle 3**      **Auflistung zusätzlich verwendeter Geräte und Materialien**  
 Modifiziert nach [76].

Geräte und Material	Information
Triple-Quadrupol-Massenspektrometer	Sciex 6500+ QTRAP (SCIEX®, Framingham, USA)
Gradientenfähiges HPLC-System, inkl. Säulenofen und Probengeber mit Kühlfunktion	Agilent 1290 HPLC -System (G4226A autosampler, infinityBinPump, G1316C column-oven, G1330B thermostat, Santa Clara, USA)
Schüttler für 96-Well-Platten	IKA® MS 3 digital
Zentrifuge	Hettich, Universal 320
Probenkonzentrator für 96-Well-Platten	Stickstoffstrom
Pipetten und -spitzen	Eppendorf, 1000 µl
Sonstiges	Alufolie, Stoppuhr

### 2.3.2 Aufarbeitung der Proben

Die benötigte Probenmenge von 500 µl EDTA-Plasma wurde zuvor in Eppendorf-Gefäße aliquotiert, bei -80°C eingefroren und zur Bestimmung wieder aufgetaut. Die Aufarbeitung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben zum Reagenzienkit MassChrom® Steroide in Serum /Plasma von Chromsystems® (Gräfelfing) [76]. Zur Rekonstitution der Serumkalibratoren (6PLUS1® Multilevel) und –kontrollen (MassCheck®) wurden diese mit je 3 ml destilliertem Wasser versetzt und bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Homogenisierung immer wieder geschwenkt (10-15 Minuten) [76]. Im Rahmen der nachfolgend beschriebenen Probenaufarbeitung fand eine Festphasenextraktion statt, eine Extraktionsmethode zur Anreicherung der Analyten [77]. Die theoretischen Grundlagen dieser Methode sind in Kapitel 2.3.3 nachzuvollziehen. Nachdem die 96-Well-Platte auf einer mitgelieferten „Waste Plate“ platziert wurde, wurden 0,8 ml Equilibration Reagent 1 in jedes Well pipettiert, eine Minute bei 200 xg zentrifugiert und der vollständige Durchlauf verworfen. Dieser Schritt wurde gleichermaßen mit 0,8 ml Equilibration Reagent 2 durchgeführt. Nun wurden je 500 µl der vorbereiteten Kalibratoren, Kontrollen und Proben entsprechend des Pipettierschemas (Abbildung 6) in die Wells pipettiert, sowie 50 µl Internal Standard Mix aufgegeben. Da Steroide im Plasma zu einem großen Anteil proteingebunden vorliegen, wurde zur Erfassung der Konzentration der Gesamtsteroide (frei und

gebunden) mittels 450 µl Extraction Buffer die Proteinbindung gelöst. Nach zweiminütigem Schütteln bei 600 U/min und Zentrifugation für eine Minute bei 200 xg, wurde der gesamte Durchlauf erneut verworfen und zweimal mit je 1 ml Wash Buffer eine Minute bei 200 xg zentrifugiert. Zur Trocknung wurde anschließend zwei Minuten bei 3000 xg zentrifugiert und die Eluate verworfen. Die Well-Platte wurde nun auf eine Auffangplatte gestellt, 500 µl Elution Buffer zugegeben und eine Minute bei 200 xg zentrifugiert. Die Eluate in der Auffangplatte wurden bei 45° C eingedampft (Stickstoffstrom), mit 100 µl Reconstitution Buffer versetzt und zwei Minuten bei 900 U/min geschüttelt, sowie 5 Minuten bei 3000 xg zentrifugiert. Für den Transport zum Autosampler wurde die Auffangplatte mit Abdeckfolie bedeckt, anschließend wurden je 15 µl Eluat in das LC-MS/MS-System injiziert [76].



**Abbildung 6 Pipettierschema Steroid Kit**

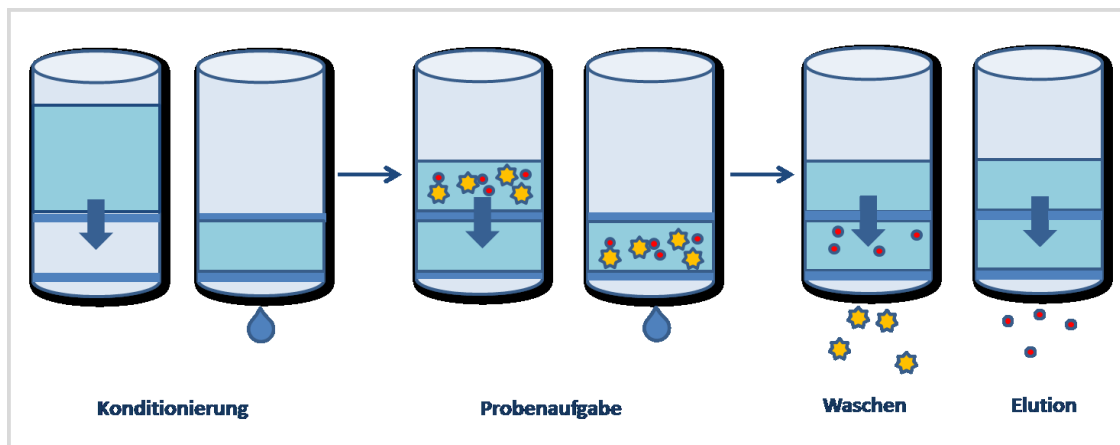
Die Positionen „Blank“ enthalten keine Proben und dienen als Negativkontrolle. Eigene Darstellung.

### 2.3.3 Festphasenextraktion

Im Zuge der Aufarbeitung erfolgte eine Festphasenextraktion, die einer Isolation und Anreicherung der Analyten dient [77]. Dieser Prozess findet zwischen einer festen (Sorbens) und einer flüssigen Phase (hier Plasma) statt, wobei das Sorbens hierbei so beschaffen ist, dass es stärkere Wechselwirkung mit den Analyten eingeht als mit dem Lösungsmittel [77]. Grundsätzlich stehen unterschiedliche Festphasenmaterialien zu Verfügung, die aufgrund ihrer jeweiligen Beschaffenheit unterschiedliche Substanzklassen adsorbieren können [77].

Zunächst wird, wie in Abbildung 7 dargestellt, bei der sogenannten Konditionierung das Sorbens mit einem Lösungsmittel vorbehandelt, dann wird die zu analysierende Probe (flüssige Phase) aufgegeben und mit einem geeigneten Lösungsmittel nachgewaschen, wobei die dabei entstehenden Eluate verworfen werden [77]. Während die Analyten am Sorbens adsorbiert bleiben, werden die restlichen

Komponenten durch das Waschen entfernt [77]. In einem letzten Schritt werden nun die Analyten mit einem geeigneten Lösungsmittel vom Sorbens eluiert und können der weiteren Analytik zugeführt werden [77, 78].



**Abbildung 7 Schematische Darstellung der Festphasenextraktion**

Konditionierung zum Anfeuchten des Sorbens. Probenaufnahme und Nachwaschen, sodass selektiv die Analyte adsorbieren. Nachfolgende Elution der Analyte. Eigene Abbildung modifiziert nach [79].

### 2.3.4 Quantifizierung, Ionisationsverfahren und Messmodus

Um eine reproduzierbare Quantifizierung zu gewährleisten, wurde pro Analyt ein isotope markierter stabiler interner Standard mitgemessen.

Die nachfolgende Analyse per LC-MS/MS wurde mit einem Sciex 6500+ QTRAP (SCIEX®, Framingham, USA) MS-System, verbunden mit einem Agilent 1290 Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) -System (G4226A autosampler, infinityBinPump, G1316C column-oven, G1330B thermostat, Santa Clara, USA) durchgeführt. Die Konzentrationen wurden mit Analyst® Software (1.6.3) über 6-Punkt-Kalibrierung und  $1/x$  Gewichtung berechnet. Um korrekte Messungen zu gewährleisten, wurden kommerzielle Qualitätskontrollen mitgeführt und regelmäßig Ringversuche durchgeführt.

Als Ionisationsverfahren wurde die Elektrospray-Ionisation (ESI) verwendet, die die massenspektrometrische Analyse der Moleküle durch das Verhältnis von Masse zu Ladung ( $m/z$ ) erlaubt [67]. Um höchste Selektivität mit hoher Sensitivität zu gewährleisten, wurde als Messmodus das Multiple Reaction Monitoring (MRM) angewandt [67]. Die entsprechenden MRM-Modi sind im Anhang in Tabelle 18 zu finden.

Die Konzentrationen wurden in den in der Tabelle 4 gezeigten Einheiten bestimmt und zur besseren Vergleichbarkeit für die statistische Auswertung, sowie den Ergebnisteil

in nmol/l umgerechnet. Ebenso sind die jeweiligen Messbereiche und Bestimmungsgrenzen in Tabelle 4 zu finden.

**Tabelle 4 Einheiten/ Messbereiche/ LLOQ**

Abkürzungen: LLOQ=lower limit of quantification, LLOQ wurde definiert als: S/N > 5.  
Publiziert in [80].

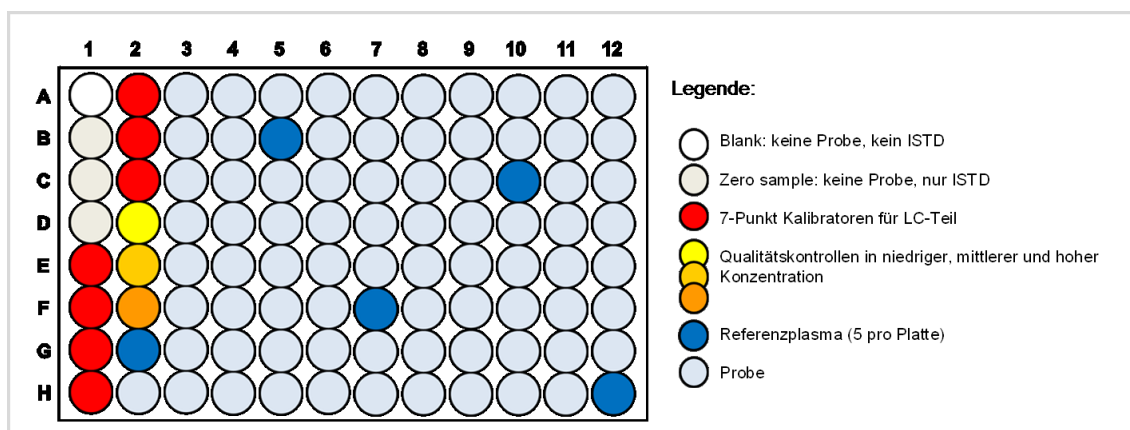
Analyte	Einheit	Messbereich		LLOQ
Aldosteron	ng/l	10.0	6000	10.0
Corticosteron	µg/l	0.2	100.0	0.2
Cortisol	µg/dl	0.22	52.1	0.22
Cortison	µg/l	0.4	51.8	0.1
11-Deoxycortisol	µg/l	0.02	30.00	0.02
21-Deoxycortisol	µg/l	0.07	10.000	0.027
Androstendion	µg/l	0.03	30.00	0.03
Dehydroepiandrosteron (DHEA)	µg/l	0.06	12.00	0.06
Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS)	µg/dl	2.40	1800.00	2.40
Dihydrotestosteron (DHT)	ng/l	165	3000	165
Estradiol	ng/l	30.00	10000.00	30.00
17a-Hydroxyprogesteron	µg/l	0.06	30.00	0.06
Progesteron	µg/l	0.05	25.00	0.05
11-Deoxycorticosteron	µg/l	0.02	6.00	0.02
Testosteron	µg/l	0.025	24.000	0.025

## 2.4 p180 Metabolomics Kit (LC-MS/MS)

Unter „Metabolomics“ wird die Messung und Analyse einer großen Anzahl niedermolekularer Moleküle (Metaboliten) in einer biologischen Probe wie Urin, Blutplasma oder Gewebe verstanden [81, 82]. Hierbei unterscheidet man zwei Zugänge: bei der nicht zielgerichteten sogenannten „untargeted“ Herangehensweise geht es um die Quantifizierung aller bekannten und unbekannt Metaboliten (< 1000 Da), während bei den sogenannten „targeted Metabolomics“ die zu quantifizierenden Metaboliten bekannt und biochemisch annotiert sind [83] und man somit von einer gezielten Analyse sprechen kann [84, 85]. Letztere Variante bietet den Vorteil der besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Labore [86] und ist Grundlage des für diese Arbeit verwendeten AbsoluteIDQ® p180 Kit (BIOCRATES Life Science AG, Innsbruck, Österreich) [87]. Die zu analysierenden Stoffwechselverbindungen gehören unterschiedlichen Substanzklassen an. In dem für diese Arbeit verwendeten Kit sind dies Aminosäuren, Acylcarnitine, biogene Amine, Glycerophospholipide, Sphingolipide und Hexose [87, 88]. Die genaue Auflistung der

gemessenen Metaboliten ist in Tabelle 25 im Anhang zu finden. Das genannte Kit ist für die Analyse von humanem EDTA Plasma validiert [87].

Es werden zwei Messdurchgänge durchgeführt: zunächst der LC-Teil, bei welchem dem Massenspektrometer eine flüssigchromatographische Auftrennung über eine Säule vorgeschaltet ist, und anschließend der FIA-Teil („flow injection analysis“), bei dem die Säule entfernt und der Autosampler direkt mit dem Massenspektrometer verbunden wird [87]. Da die Stabilität einiger biogener Amine kürzer ist als die der Analyte des FIA-Teils, wird der LC-Teil zuerst durchgeführt [87]. Hierbei werden biogene Amine und Aminosäuren quantifiziert, alle restlichen Substanzklassen im FIA-Teil [87]. Als Referenzplasma wurde ein von unserem Kooperationspartner, dem Helmholtz-Zentrum München stammender Plasmapool verwendet, welcher in regelmäßigen Abständen auf der jeweiligen Kit-Platte verteilt wurde (Abbildung 8). Dies ermöglicht eine Normierung zwischen verschiedenen Durchläufen und zwischen verschiedenen Labors [86].



**Abbildung 8 Pipettierschema p180 Kit**

Die Position „Blank“ enthält keine Probe und Internal Standard Mix (ISTD) und dient als Negativkontrolle. Eigene Darstellung modifiziert nach [87].

### 2.4.1 Material

Zur übersichtlichen Darstellung werden die Kit-Bestandteile, die verwendete Laborausrüstung, sowie die benötigten Lösungen und Chemikalien nachfolgend in tabellarischer Form aufgeführt.

**Tabelle 5 Verwendete Bestandteile des AbsoluteIDQ® p180 Kit**

Modifiziert nach Biocrates AbsoluteIDQ® Kit User Manual p180 [87].

Verwendete Kit-Bestandteile	Details
<b>AbsoluteIDQ Kit Platte</b>	Filter- und Auffangplatte
<b>96-Well-Platte</b>	Leere Auffangplatte
<b>2 Silikonmatten</b>	Abdeckung der Platte nach Aufarbeitung
<b>Biocrates Solvent I</b>	Verschlossene Glasampulle, zur Herstellung der FIA mobilen Phase

Verwendete Kit-Bestandteile	Details
Röhrchen für die Derivatisierungslösung	Plastikröhrchen zur Herstellung der PITC Lösung
3 Flakons p180/MetaDis QC	Biocrates Qualitätskontrollen (lyophilisiertes Plasma in unterschiedlichen Konzentrationslevels)
7 Flakons KIT2 Cal	Biocrates Kalibratoren (lyophilisiert, für LC-MS Teil)
1 Flakon KIT2 ISTD	Biocrates Interner Standard Mix (lyophilisiert)
MetIDQ Software	Version Boron
OracleXE (Express Edition) Database	Version 11.2

**Tabelle 6 Nicht im Kit beinhaltete Ausrüstung**  
 Modifiziert nach Biocrates AbsoluteIDQ® Kit User Manual p180 [87].

Massenspektrometer und Laborausrüstung	Details
Massenspektrometer	Triple Quadrupol Massenspektrometer LC-MS/MS System: SCIEX QTRAP 4500 MD mit TurboV™ Ionenquelle
System	UHPLC System mit Entgaser und Säulenofen
Autosampler	Autosampler: 1290 Infinity UHPLC-System (G4226A), Pumpeneinheit: 1290 Infinity Bin Pump, Säulenofen: column-oven (G1316C), Thermostat: thermostat (G1330B); Fa. Agilent, Santa Clara, USA Geeignet für 96-Well-Platten, Temperaturkontrolle (10°), Injektor fähig zur Durchbohrung einer Silikonmatte, Probenschleife 20 µl
Säule	ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 µm 2.1 x 75 mm
Vor-Säule	ACQUITY BEH C18 1.7 VANGUARD
Zentrifuge	Passend für 5 cm hohe 96-Well Platten, 500 xg
Stickstoffverdampfer	VLM GmbH
Schüttler	IKA® MS 3 digital, geeignet für 96-Well Platten
Pipetten	Eppendorf 10 – 1000 µl
Multi-Kanal Pipette	8-Kanal
Multipipette	Eppendorf Multipipette®, Spitzen mit 1, 2,5 und 10 ml
Vortexer	
Waage	Genauigkeit < 1 mg
Fläschchen	50 – 1000 ml
Analyst® Software	Version 1.5.2 MD, Datenerhebung und Quantifizierung

Alle nicht im Kit mitgelieferten Reagenzien wie Acetonitril, Ammoniumacetat, Ethanol, Ameisensäure, Isopropanol, Methanol, Phenylisothiocyanat, Phosphate Buffered Saline (PBS), Pyridin und Wasser wurden in höchstem Reinheitsgrad von der Firma Sigma (Taufkirchen) gekauft.

#### 2.4.2 Aufarbeitung

Die benötigte Probenmenge von 10 µl EDTA-Plasma wurde zuvor in Eppendorf-Gefäße aliquotiert, bei -80°C eingefroren und zur Bestimmung wieder aufgetaut. Die Aufarbeitung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben zum AbsoluteIDQ® p180 Kit von BIOCRATES Life Science AG (Innsbruck) [87]. Vor der eigentlichen Aufarbeitung der zu messenden Plasmaproben mussten bestimmte Reagenzien vorbereitet werden (Tabelle 21 im Anhang) [87].

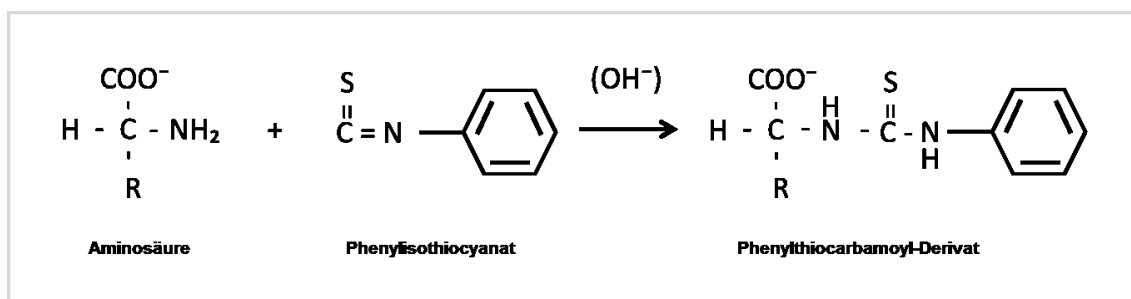
Die Phosphate Buffered Saline (PBS) wurde entsprechend der Herstellerangaben vorbereitet, der Internal Standard Mix (ISTD), sowie die Calibration Standards (Cal1-Cal7) und die Quality Control Samples (QC1-QC3) erst kurz vor dem Gebrauch bei 10,000 xg 2 Minuten zentrifugiert. 1200 µL HPLC grade Wasser wurde zu dem ISTD gegeben und für 15 Minuten bei 1200 rpm geschüttelt und einige Male gevortext. Es wurden 100 µl HPLC grade Wasser zu jedem Calibration Standard hinzugegeben, 15 Minuten bei 1200 rpm geschüttelt, einige Male gevortext und kurz anzentrifugiert. Zu den Quality Control Samples wurden jeweils 100 µl HPLC grade Wasser zugegeben und ebenfalls für 15 Minuten bei 1200 rpm geschüttelt, dann gevortext und bei 4°C für 5 Minuten bei 2750 xg zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde auch für die Plasmaproben angewendet. Für den Pre-Mix for Derivatization wurden je 1900 µl Ethanol, H<sub>2</sub>O und Pyridin unter dem Abzug in ein Plastikröhrchen pipettiert und 10 Sekunden gevortext. Kurz vor der Derivatisierung wurden 300 µl Phenylisothiocyanat (PITC) Derivatization Solution zu dem Pre-Mix gegeben und unter dem Abzug bis zur Aufklärung der Lösung gevortext. Für das Extraction Solvent wurden 19 mg Ammoniumacetat in 50 ml HPLC grade Methanol gelöst. Zur Vorbereitung der Mobilen Phase des LC Teils wurden für Solvent A 2 ml Ameisensäure zu 1000 ml Wasser und für Solvent B 1 ml Ameisensäure zu 500 ml Acetonitril gegeben. Die Mobile Phase des FIA Teils wurde mit einer Ampulle Biocrates Solvent I und 290 ml HPLC grade Methanol vorbereitet [87].

Nach den genannten Vorbereitungen wurde mit der eigentlichen Probenaufarbeitung begonnen. Zu Beginn wurden je 10 µl des Internal Standard Mix (ISTD) in alle Wells der Kit-Platte außer in Position A1 (Abbildung 8) gegeben. Entsprechend des Pipettierschemas (Abbildung 8) wurden zunächst je 10 µl Phosphate Buffered Saline (PBS), Calibration Standards (Cal1-7) und Quality Control Samples (QC1-3) in die Wells pipettiert, in die restlichen Wells der Platte je 10 µl Plasma-Patient\*innenproben. Die Platte wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Stickstoff bei 3,5 bar getrocknet. Die Nadeln des Verdampfers schwebten hierbei mindestens 5 mm über

dem Filter. Die nachfolgenden Schritte erfolgten unter dem Abzug. Pre-Mix und Derivatisation Solution wurden gemäß den Herstellerangaben vorbereitet. 50 µl der Derivatisation Solution wurden umgehend auf jede Position pipettiert (Eppendorf Multipipette), mit der Plastikkappe abgedeckt und während der Reaktion für 20 Minuten bei Raumtemperatur unter dem Abzug stehen gelassen, danach erneut unter Stickstoff für 70 Minuten getrocknet. Es wurden 300 µl des Extraction Solvent zu jeder Position zugegeben und die Platte mit Plastikkappe 30 Minuten bei 450 rpm geschüttelt und aus dem Abzug entnommen. Die Platte wurde 2 Minuten bei 500 xg zentrifugiert und danach die Fülllevel visuell kontrolliert. Nach Entfernen des Klebebandes, wurde die untere Platte (enthält die Proben-Extrakte, beschriftet mit „Use for FIA“) von der oberen Filter-Platte getrennt. 50 µl jeder Position der ursprünglichen Platte wurden auf die mitgelieferte leere Platte „Use for LC“ gegeben. 20 µl jeder Position der ursprünglichen Platte wurden auf die leere Platte „Use for FIA dilution – If required“ gegeben. Um die Platte „Use for LC“ vorzubereiten, wurden 250 µl 40% Methanol zu jeder Position dieser Platte zugegeben. Analog wurde die Platte „Use for FIA dilution – If required“ mit 380 µl der FIA Mobile Phase vorbereitet. Beide Platten wurden mit einer Silikonmatte abgedeckt und für 2 Minuten bei 600 rpm geschüttelt. Die Platten konnten bei 10°C in den Autosampler gegeben werden [87]. Alle Aufarbeitungsschritte sind zusätzlich in tabellarischer Schritt-für-Schritt Anleitung im Anhang (Tabelle 20 und 21) zu finden.

### 2.4.3 Derivatisierung der Aminosäuren

Da die Auftrennung der reinen Aminosäuren (AS) in der Säule nicht zuverlässig funktioniert [89], ist der Trennung eine Vorsäulenderivatisierungsreaktion mit Phenylisothiocyanat vorgeschaltet [90]. Hierbei kommt es zur Derivatisierung der AS durch Reaktion mit Phenylisothiocyanat (PITC) und es entstehen Phenylthiocarbamoyl-Verbindungen (Abbildung 9) [90]. Die hierbei entstandenen sogenannten PITC-AS ermöglichen eine bessere Auftrennung und exakte Detektion [90].



**Abbildung 9 Derivatisierungsreaktion**

Reaktion von Aminosäuren mit Phenylisothiocyanat zum Phenylthiocarbamoyl-Derivat (Phenylthiocarbamoyl-Verbindung). Eigene Darstellung modifiziert nach [90].



#### **2.4.4 Quantifizierung**

Die Analyse wurde mit einem Sciex 4500 series (SCIEX®, Framingham, USA) MS-System durchgeführt. Da einige biogene Amine relativ instabil sind, wurde zunächst der LC-MS-Teil durchgeführt [87]. Für die LC-MS/MS wurde die Säule ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 µm 2.1 x 75 mm verwendet. Die Vorsäule ACQUITY BEH C18 1.7 VANGUARD wurde mit 95% Solvent B (siehe 2.4.2) bei einer Flussrate von 1 ml/min für 5 Minuten gespült, dann an die Säule konnektiert und mit 95% Solvent B bei einer Flussrate von 800 µl/min 15 Minuten lang gespült. Zum Ausgleichen des Systems wurde es vor der Probeninjektion 10 Minuten mit 100% Solvent A gespült. Zur Durchführung des FIA-Teils wurde die Säule entfernt und der Autosampler direkt mit der Ionenquelle des Massenspektrometers verbunden. Die Spülung erfolgte mit FIA Mobile Phase (siehe 2.4.2). Die Konzentrationen des LC-MS-Teils wurden mit der Analyst® Software (1.5.2 MD) über 6-Punkt-Kalibrierung und 1/x Gewichtung berechnet und dann zur Validierung nach MetIDQ (Version Boron) importiert, um mit den FIA-Daten weiter verarbeitet zu werden. Die Konzentrationen wurden in µmol/l gemessen. Als Referenzplasma wurde ein aus München stammender Plasmapool verwendet, welcher in regelmäßigen Abständen auf der jeweiligen Kit-Platte verteilt wurde. Um korrekte Messungen zu gewährleisten, wurden kommerzielle Qualitätskontrollen mitgeführt. Als Ionisationsverfahren wurde die Elektrospray-Ionisation (ESI) verwendet und als Messmodus das Multiple Reaction Monitoring (MRM) angewandt. Die entsprechenden MRM-Modi sind im Anhang unter Tabelle 19 zu finden.

#### **2.5 Statistische Auswertung**

Die Datenauswertung erfolgte hinsichtlich des Vergleichs der Plasmakonzentration bei Adenom- versus Karzinompatient\*innen. Zunächst wurden die beiden Gesamtgruppen miteinander verglichen und dann geschlechtsspezifisch untersucht. Des Weiteren erfolgte je ein Vergleich der Gruppen mit hormoninaktiven und hormonproduzierenden Tumoren. Die Klassifizierung nach Hormonsekretionsstatus wurde bereits unter 2.1 „Studienpopulation“ beschrieben. Im Folgenden werden Patient\*innenproben als „hormonproduzierend“ kategorisiert, sofern bei den jeweiligen Patient\*innen tumorbedingt eine Sekretion von Androgenen, Östrogenen, Mineralocorticoiden oder Cortisol allein oder in Kombination dokumentiert wurde.

### 2.5.1 Analyse der Steroidhormondaten

Für die statistische Datenanalyse wurden die Software IBM® SPSS® Statistics Version 25, sowie R Version 3.4.4 (R Core Team and contributors worldwide) verwendet. Die Analyse des Datensatzes wurde aufgrund der Tatsache, dass keine Normalverteilung im Shaapiro-Wilk-Test und Kolmogorov-Smirnov-Test vorlag, anhand des Wilcoxon Rangsummentest (Mann-Whitney-U-Test, nicht-parametrischer Test) und einer logistischen Regressionsanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Median und Interquartilsabstand (IQR) angegeben und als Boxplots, receiver operating characteristics (ROC) Kurven (IBM® SPSS® Statistics und ROCR package [91]), Area under the curve (AUC, ROCR package [91]) und Klassifikationstabelle (SDMTools package [92]) dargestellt. Für alle Werte unter dem „lower limit of quantification“ (LLOQ) wurde  $0,5 \times \text{LLOQ}$  angenommen. Unterschiede im jeweiligen Gruppenvergleich wurden ab einem p-Wert von kleiner 0,05 ( $p < 0,05$ ) als signifikant angenommen.

Für die logistische Regressionsanalyse wurden die Funktionen glm (stats package) und stepAIC (MASS package) von R Core Team and contributors worldwide verwendet [93]. Diese Modellselektion basiert auf dem Akaike Information Criteria (AIC), einem Wert, der die Güte des den Datensatz beschreibenden statistischen Modells beurteilt [94, 95].

Die in der Tabelle 7 aufgeführten schrittweisen Regressionsmethoden wurden angewandt.

**Tabelle 7**      **Übersicht über die verwendeten Regressionsmethoden**  
Eigene Darstellung modifiziert nach [94, 95].

<b>Selektion</b>	<b>Beschreibung</b>
<b>Forward Selection</b>	Beginnt mit leerem Modell und fügt schrittweise Steroidhormone mit bestem AIC hinzu
<b>Backward Selection</b>	Beginnt mit vollem Modell (alle 15 Steroide) und entfernt schrittweise Steroidhormone mit schlechtestem AIC
<b>Bothside Stepwise Selection</b>	Kombination von Forward und Backward Selection: Bothside Stepwise Selection kann mit leerem Modell (Stepwise Forward) oder mit vollem Modell (Stepwise Backward) beginnen, wobei das Steroidhormon mit bestem/schlechtestem AIC hinzugefügt/entfernt wird.

Die folgenden Parameter wurden bestimmt [96]:

- Sensitivität:  $t_p / t_p + f_n$
- Spezifität:  $t_n / t_n + f_p$
- positiver Vorhersagewert:  $t_p / t_p + f_p$

- negativer Vorhersagewert:  $t_n / t_n + f_n$

- Genauigkeit:  $t_p + t_n / t_p + f_p + t_n + f_n$

( $t_p$ =richtig positiv,  $f_p$ =falsch positiv,  $f_n$ =falsch negativ,  $t_n$ =richtig negativ).

Die Regressionsmodellierung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dandekar am Institut für Bioinformatik (Dr. Meik Kunz, Johannes Vey; Einverständnisse liegen vor). Alle anderen statistischen Auswertungen wurden von der Promovendin selbstständig vorgenommen.

### **2.5.2 Analyse der Metabolomics Daten**

Zur statistischen Analyse der Daten wurde R Version 3.4.4 (R Core Team and contributors worldwide) und IBM® SPSS® Statistics Version 25 verwendet. Da die Daten nicht-normalverteilt sind, wurde zur Beurteilung der signifikanten Unterschiede der Plasmametabolitkonzentrationen zwischen den ACC-Patient\*innen und den Kontrollen der Mann-Whitney-U-Test (nicht-parametrischer Test) durchgeführt. Die Konzentrationen wurden als Mediane verglichen. Unterschiede im jeweiligen Gruppenvergleich wurden bei  $p < 0,05$  als signifikant angenommen. Receiver-operator characteristic (ROC) Kurven und berechnete areas under the curve (AUCs), sowie Sensitivität und Spezifität wurden zur Abschätzung des diagnostischen Wertes betrachtet. Zur Variablen-Selektion wurden logistische Regressionen mit dem Regularisierungsverfahren LASSO (Least Absolute Shrinkage and Selection Operator) angewandt [95]. Das Modell beschreibt dabei das kleinstmögliche und dabei informativste Metabolit-Panel, das die Gruppen diskriminiert [95]. Die Ergebnisse werden als Median, AUC, sowie ihre Accuracy, Sensitivität, Spezifität, positiv prädiktiver Wert (PPV) und negativ prädiktiver Wert (NPV) angegeben. Metaboliten respektive Patient\*innen mit mehr als 40% unvaliden Werten ( $<LLOQ$  = Lower Limit of Quantification,  $<LOD$  = Limit of Detection) wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Für die wenigen Proben, bei denen kein Signal detektiert wurde, wurde anhand der Formel  $c = \frac{LOD}{\sqrt{2}} x$  (Zufallszahl zwischen 0,75 – 1,25) eine Zufallszahl generiert. Die Konzentrationen wurden in  $\mu\text{M}$  gemessen.

Die Regressionsmodellierung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dandekar am Institut für Bioinformatik (Dr. Meik Kunz, Johannes Vey; Einverständnisse liegen vor). Alle anderen statistischen Auswertungen wurden von der Promovendin selbstständig vorgenommen.

### **3. ERGEBNISSE**

#### **3.1 Ergebnisse der Steroid-Studie**

##### **3.1.1 Die Studienpatient\*innen**

Die für die vorliegende Arbeit zur Verfügung stehenden EDTA-Plasmaproben wurden im Rahmen der klinischen Routine als Teil der ENSAT Daten- und Biobank abgenommen und bei -80°C gelagert. Für die hier vorliegende Arbeit wurden nachfolgend Proben von nicht-Aldosteron-produzierenden ACA und ACC aus der genannten Datenbank retrospektiv ermittelt. Hierbei konnten insgesamt 108 Patient\*innenproben in die Studie eingeschlossen werden. Demographische und klinische Charakteristika der Studienpatient\*innen sind in Tabelle 8 aufgeführt. Während in der Kontrollgruppe (ACA) 44% Patient\*innen männlich sind, finden sich in der ACC-Gruppe lediglich 36% Männer, was unter epidemiologischen Gesichtspunkten jedoch nicht sehr überrascht, da Frauen 1,5 Mal häufiger von einem Nebennierenkarzinom betroffen sind als Männer [19, 20]. Das mediane Alter ist in beiden Gruppen vergleichbar (58 vs. 57 Jahre). Hormoninaktive Tumore sind in der Kontrollgruppe zu ca. zwei Dritteln zu finden. Das restliche Drittel besteht aus Cortisol-produzierenden Tumoren. In der Karzinomgruppe sind hingegen signifikant mehr hormonproduzierende Tumore zu verzeichnen. Hier zeigt sich ein heterogeneres Bild, wobei 62% der Tumore endokrin aktiv sind, das heißt, Androgene, Östrogene oder Cortisol allein oder Cortisol in Kombination mit Mineralocorticoiden oder Geschlechtshormonen sezernieren. In dieser Gruppe der hormonproduzierenden ACC finden sich 17% mit alleiniger Cortisolsekretion und insgesamt weitere 34% mit kombinierter Cortisolsekretion. 60% der ACC-Gruppe befand sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im lokalisierten Stadium der Erkrankung (ENSAT Stadium I-III). Während in der Kontrollgruppe alle Adenome Primärtumore darstellen, finden sich in der ACC-Gruppe nur 31% Primärtumoren. Alle anderen Patient\*innen dieser Gruppe haben zum Zeitpunkt der Probenentnahme bereits Lokalrezidive oder Metastasen.

**Tabelle 8 Demographische und klinische Charakteristika der NNR-Tumor Patient\*innen**

Die Daten sind als n (%) dargestellt. Vergleich kategorialer Variablen zwischen Gruppen mit Chi-Square Test durchgeführt. Eigene Daten, publiziert in [80].

<sup>†</sup>Die Daten sind in Jahren (Median (Range)) dargestellt.

<sup>a</sup>Vergleich zwischen ACA und ACC: endokrin inaktiv vs. hormonproduzierend.

<sup>b</sup>Vergleich zwischen ACA und ACC: endokrin inaktiv vs. alleinige Cortisolsekretion.

	ACA (n=66)	ACC (n=42)	P
<b>Geschlecht</b> , männlich	29 (44)	15 (36)	0.396
<b>Alter</b> zum Zeitpunkt der Probenentnahme <sup>†</sup> ; Jahre, Median (Range)	58 (21-81)	57 (20-80)	
<b>Hormon Sekretion</b>			
Inaktiv	42 (64)	16 (38)	
Endokrin aktiv	24 (36)	26 (62)	0.009 <sup>a</sup>
Cortisol (alleinig)	24 (36)	7 (17)	0.607 <sup>b</sup>
Androgene		4 (10)	
Cortisol & Mineralocorticoide		2 (5)	
Cortisol & Geschlechtshormone		12 (29)	
Estrogene		1 (2)	
<b>ENSAT stage</b> bei Diagnosestellung			
I		4 (10)	
II		14 (33)	
III		7 (17)	
IV		17 (40)	
<b>Tumormanifestation</b> zum Probenzeitpunkt			
Primärtumor	66 (100)	13 (31)	
Primärtumor + Metastasen		11 (26)	
Lokalrezidiv		3 (7)	
Metastasen		9 (21)	
Lokalrezidiv + Metastasen		6 (14)	

### 3.1.2 Steroidhormon-Profiling

Bei Vergleich der beiden Gesamtgruppen hatten die ACC-Patient\*innen signifikant höhere Konzentrationen (Median ACA vs. Median ACC [nmol/l]) von Vorläuferhormonen (Progesteron, 0,08 vs. 0,55,  $P < 0,001$ ; 17-Hydroxyprogesteron, 1,13 vs. 2,10,  $P = 0,005$ ; 11-Deoxycortisol, 1,99 vs. 3,03,  $P = 0,01$ ), Sexualhormonen (DHEA, 2,67 vs. 5,43,  $P = 0,002$ ; DHEAS, 1468,82 vs. 3279,10,  $P = 0,001$ ; Estradiol, 0,06 vs. 0,22,  $P < 0,001$ ), Mineralocorticoiden (11-Deoxycorticosteron, 0,08 vs. 0,29,  $P < 0,001$ ) und Cortisol (269,10 vs. 378,12,  $P = 0,015$ ) als die ACA-Patient\*innen (Abbildung 10). Die medianen Plasmasteroidhormonkonzentrationen aller 15 Steroidhormone der Gesamtgruppe sind im Anhang in Tabelle 22 zu finden.

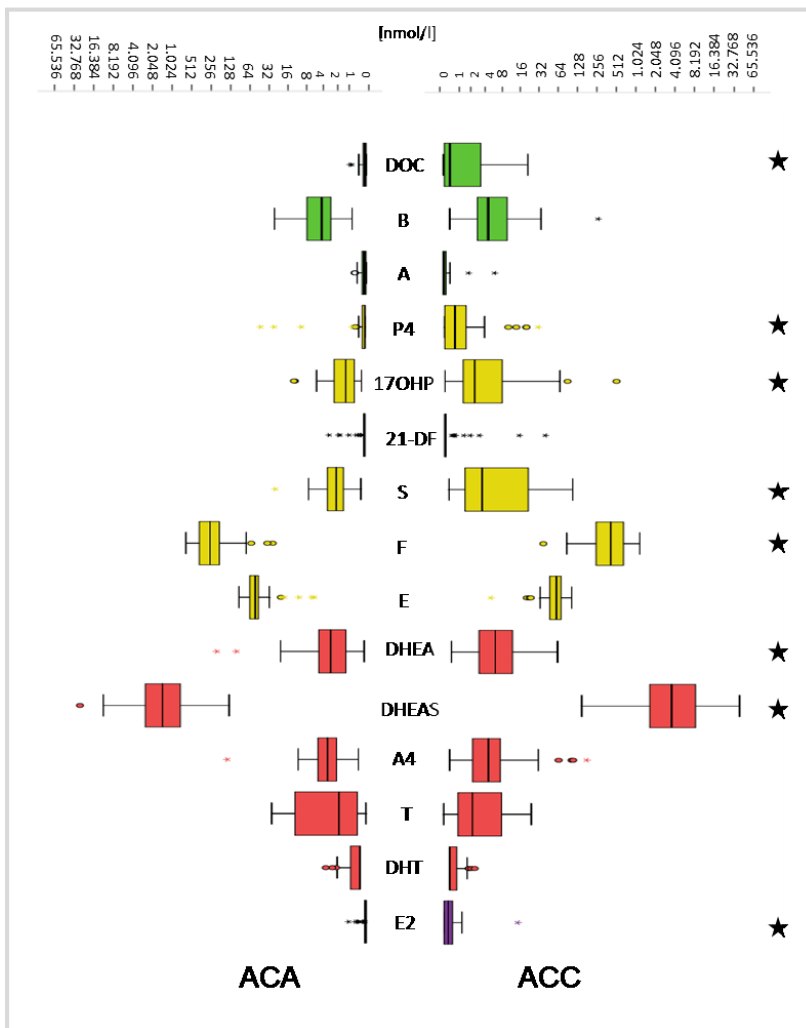


Abbildung 10

**Steroidhormonprofil bei ACA und ACC Patient\*innen [nmol/l]**

Log-2-transformierte Boxplots der per LC-MS/MS quantifizierten absoluten Konzentrationen [nmol/l] der 15 Steroidhormone 11-Deoxycorticosteron (DOC), Corticosteron (B), Aldosteron (A), Progesteron (P4), 17-Hydroxyprogesteron (17OHP), 21-Deoxycortisol (21-DF), 11-Deoxycortisol (S), Cortisol (F), Cortisol (E), DHEA, DHEAS, Androstendion (A4), Testosteron (T), Dihydrotestosteron (DHT) und Estradiol (E2) bei Patient\*innen mit nicht-Aldosteron-produzierenden ACA (n=66) und ACC (n=42). Mineralocorticoide und ihre Vorläuferhormone sind in grün, Glucocorticoide und ihre Vorläuferhormone in gelb, Androgene in rot und Estradiol in lila farbcodiert. Sterne zeigen P < 0,05 an. Eigene Darstellung.

In einem separaten Schritt wurden dann Untergruppen entsprechend ihrer Hormonsekretion verglichen. Aufgrund der zu geringen Populationsgröße wurden hierfür alle Proben mit alleiniger oder kombinierter Cortisol-Sekretion als „hormonproduzierende Gruppe“ zusammengefasst und werden im Folgenden als „Cortisol-produzierend“ definiert.

Im Vergleich zu den klinisch inaktiven Adenomen, zeigte die Gruppe der hormoninaktiven Karzinome signifikante Unterschiede (Median ACA vs. Median ACC [nmol/l]) für Estradiol (0,06 vs. 0,06, P=0,018), 11-Deoxycorticosteron (0,05 vs. 0,10,

P=0,046) und Progesteron (0,08 vs. 0,17, P=0,015) (siehe Abbildung 11). Auch beim Vergleich der Adenome und Karzinome mit klinischer oder biochemischer Cortisol-Sekretion zeigten sich im Vergleich zur Adenomgruppe, wie in Abbildung 11 zu sehen, signifikant höhere Konzentrationen in der Karzinomgruppe (Median ACA vs. Median ACC [nmol/l]) für Cortisol (379,50 vs. 593,40, P=0,004), 11-Deoxycortisol (2,10 vs. 8,12, P<0,001), Progesteron (0,08 vs. 0,70, P<0,001), 17-Hydroxyprogesteron (0,88 vs. 4,64, P<0,001), 11-Deoxycorticosteron (0,11 vs. 0,52, P=0,007), DHEA (1,61 vs. 5,90, P=0,01), DHEAS (775,06 vs. 5257,40, P=0,002) und Estradiol (0,06 vs. 0,23, P<0,001).

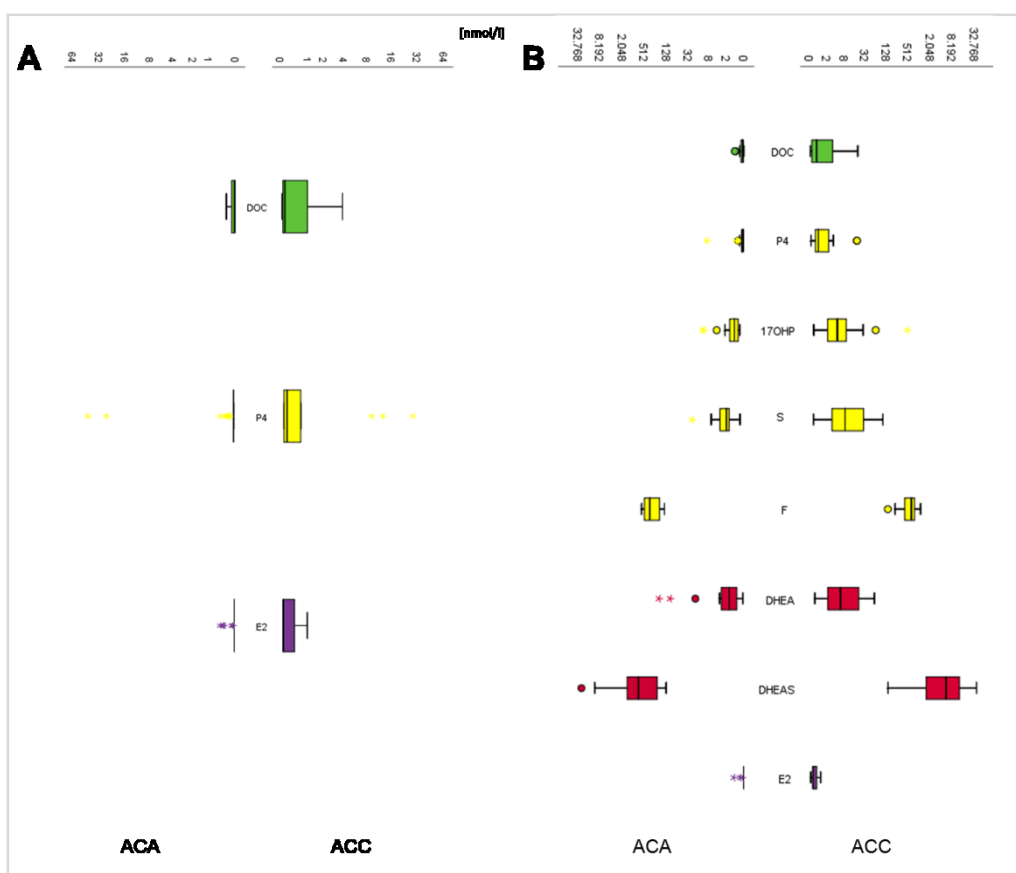


Abbildung 11

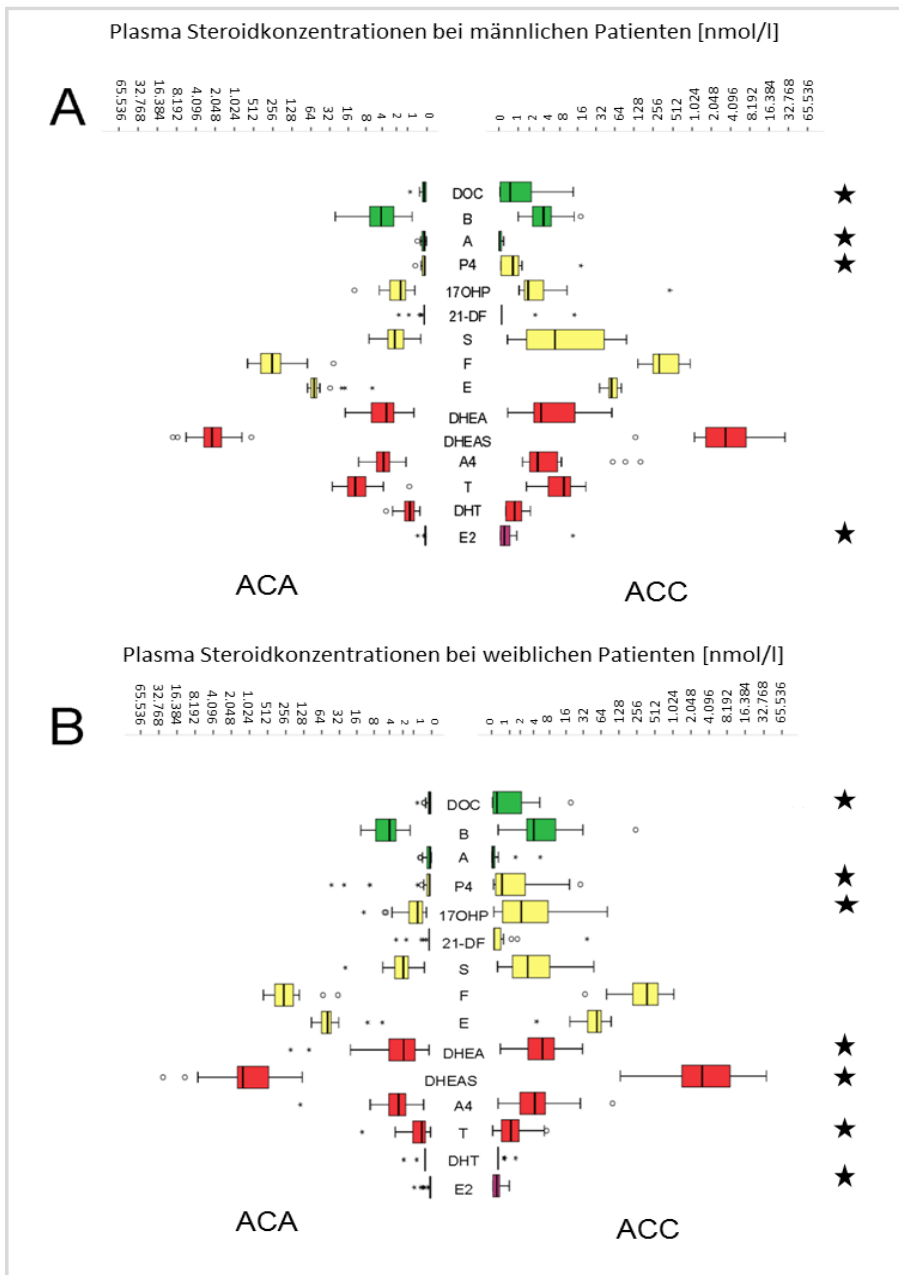
**Profil ausgewählter Steroide bei hormoninaktiven und Cortisol-produzierenden NNR-Tumoren [nmol/l]**

**(A)** Log-2-transformierte Boxplots der Steroide 11-Deoxycorticosteron (DOC), Progesteron (P4) und Estradiol (E2) im Vergleich zwischen Patient\*innen mit hormoninaktiven ACA (links) und ACC (rechts). Alle drei Steroide zeigten im Wilcoxon-Test signifikant höhere Werte in der Karzinom-Gruppe. Signifikanz wurde bei  $P < 0,05$  angenommen. **(B)** Log-2-transformierte Boxplots der Steroide 11-Deoxycorticosteron (DOC), Progesteron (P4), 17-Hydroxyprogesteron (17OHP), 11-Deoxycortisol (S), Cortisol (F), DHEA, DHEAS und Estradiol (E2) im Vergleich zwischen Patient\*innen mit Cortisol-produzierenden ACA (links) und ACC (rechts). Alle acht Steroide zeigten im Wilcoxon-Test signifikant höhere Werte in der Karzinom-Gruppe. Signifikanz wurde bei  $P < 0,05$  angenommen. Mineralocorticoide und ihre Vorläuferhormone sind in grün, Glucocorticoide und ihre Vorläuferhormone in gelb, Androgene in rot und Estradiol in lila farbcodiert. Eigene Darstellung.

Die medianen Plasmasteroidhormonkonzentrationen aller 15 Steroidhormone der hormoninaktiven und Cortisol-produzierenden Gruppe sind im Anhang in Tabelle 23 und 24 zu finden.

Um geschlechtsspezifische Einflüsse aufzuzeigen, wurden die Steroidprofile anschließend einzeln für beide Geschlechter analysiert (Abbildung 12 und Tabelle 9). Tabelle 9 beinhaltet den konkreten Vergleich der jeweiligen Plasmasteroidkonzentrationen zwischen den geschlechtsspezifischen Gruppen. Die Plasmakonzentrationen sind als Median und IQR angegeben. Hierbei zeigten sich im Wilcoxon-Test (Männer (m)/ Frauen (f): Median ACA vs. Median ACC) 11-Deoxycorticosteron (m: 0,11 vs. 0,50; f: 0,08 vs. 0,23), Progesteron (m: 0,08 vs. 0,66; f: 0,08 vs. 0,49) und Estradiol (m: 0,06 vs. 0,22; f: 0,06 vs. 0,22) signifikant höher bei den Karzinomen sowohl in der Männer- (m) als auch in der Frauengruppe (f) (alle  $P < 0,05$ ). Aldosteron war bei den Adenomen der Männergruppe zudem höher (0,11 vs. 0,01;  $P = 0,002$ ). In der Frauengruppe waren 17-Hydroxyprogesteron (0,71 vs. 2,14;  $P = 0,015$ ), DHEA (1,92 vs. 5,89;  $P = 0,002$ ), DHEAS (1322,48 vs. 3143,60;  $P = 0,001$ ) und Testosteron (0,46 vs. 1,10;  $P = 0,027$ ) signifikant bei den Karzinomen erhöht.





**Abbildung 12 Geschlechtsspezifisches Steroidhormonprofil bei ACA und ACC Patient\*innen**

Log-2-transformierte Boxplots der per LC-MS/MS quantifizierten absoluten Konzentrationen der 15 Steroidhormone 11-Deoxycorticosteron (DOC), Corticosteron (B), Aldosteron (A), Progesteron (P4), 17-Hydroxyprogesteron (17OHP), 21-Deoxycortisol (21-DF), 11-Deoxycortisol (S), Cortisol (F), Cortison (E), DHEA, DHEAS, Androstendion (A4), Testosteron (T), Dihydrotestosteron (DHT) und Estradiol (E2) bei Patient\*innen mit nicht-Aldosteron-produzierenden ACA (links) und ACC (rechts). Mineralocorticoide und ihre Vorläuferhormone sind in grün, Glucocorticoide und ihre Vorläuferhormone in gelb, Androgene in rot und Estradiol in lila farbcodiert. Sterne zeigen  $P < 0,05$  an. **(A)** Vergleich männlicher Patienten: signifikant erhöhte Konzentrationen von DOC, A, P4 und E2 in ACC-Patienten (rechte Seite,  $n=15$ ) vs. ACA-Patienten (linke Seite,  $n=29$ ). A war in der ACA-Gruppe signifikant höher als in der ACC-Gruppe. **(B)** Vergleich weiblicher Patientinnen: signifikant erhöhte Konzentrationen von DOC, P4, 17OHP, DHEA, DHEAS, T und E2 in ACC-Patientinnen ( $n=27$ ) vs. ACA-Patientinnen ( $n=37$ ). Eigene Darstellung, publiziert in [80].

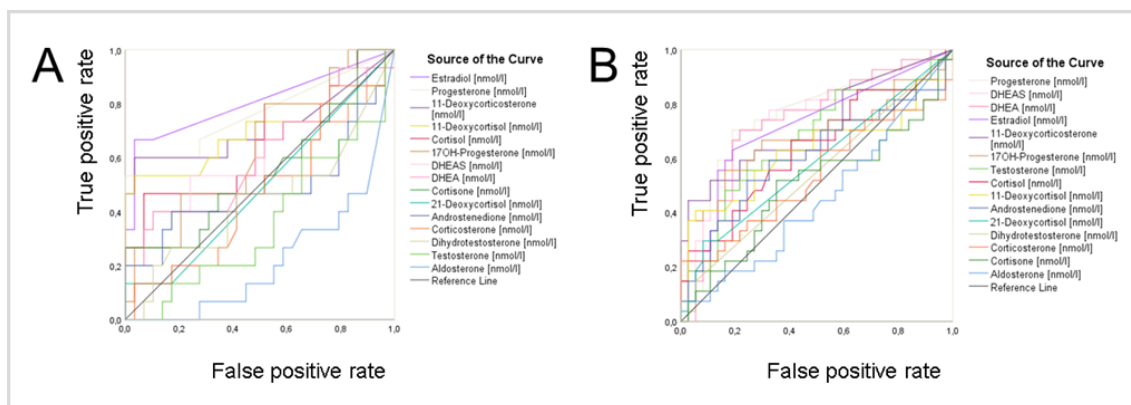
Tabelle 9

### Plasmakonzentration der Steroidhormone in Patient\*innen mit ACA und ACC

Konzentrationen [nmol/l] als Median und IQR dargestellt. <sup>a</sup> P-Wert bezieht sich auf den Vergleich von ACA und ACC in männlichen Patienten. <sup>b</sup> P-Wert bezieht sich auf den Vergleich von ACA und ACC in weiblichen Patientinnen. Für Werte unter LLOQ wurde 0,5xLLOQ angenommen und in kursiv gedruckt. Eigene Darstellung, publiziert in [80].

Steroid Bezeichnung	Plasmakonzentrationen der 15 Steroide, Median (IQR, nmol/l)			
	ACA (n=66)		ACC (n=42)	
	Männer (n = 29)	Frauen (n = 37)	Männer (n = 15) <sup>a</sup>	Frauen (n = 27) <sup>b</sup>
11-Deoxycorticosteron	0.11 (0.03-0.17)	0.08 (0.03-0.14)	0.50 (0.03-3.18), <i>P</i> = 0.021	0.23 (0.07-2.86), <i>P</i> = 0.003
Corticosteron	4.19 (2.27-7.25)	4.02 (2.90-7.75)	3.99 (2.35-5.81), <i>P</i> = 0.804	4.05 (2.67-10.64), <i>P</i> = 0.605
Aldosteron	0.11 (0.06-0.19)	0.07 (0.02-0.19)	0.01 (0.01-0.09), <i>P</i> = 0.002	0.05 (0.01-0.13), <i>P</i> = 0.519
Progesteron	0.08 (0.08-0.18)	0.08 (0.08-0.20)	0.66 (0.08-1.24), <i>P</i> = 0.001	0.49 (0.16-3.00), <i>P</i> < 0.001
17-OHP	1.57 (1.15-2.96)	0.71 (0.40-1.49)	1.86 (1.45-4.64), <i>P</i> = 0.144	2.14 (0.44-7.88), <i>P</i> = 0.015
21-Deoxycortisol	<i>0.10</i> ( <i>0.10-0.10</i> )	<i>0.10</i> ( <i>0.10-0.10</i> )	<i>0.10</i> ( <i>0.10-0.10</i> ), <i>P</i> = 0.892	<i>0.10</i> ( <i>0.10-0.45</i> ), <i>P</i> = 0.1
11-Deoxycortisol	2.17 (1.29-3.18)	1.95 (1.44-3.11)	6.53 (1.21– 58.67), <i>P</i> = 0.05	3.01 (1.21-8.12), <i>P</i> = 0.085
Cortisol	262.20 (192.09– 412.62)	276.0 (190.85-397.44)	320.16 (255.85-654.12), <i>P</i> = 0.077	378.12 (211.97– 593.4), <i>P</i> = 0.068
Cortison	57.06 (49.86-64.40)	50.97 (43.91– 64.68)	56.79 (51.25– 76.73), <i>P</i> = 0.586	54.57 (37.12-64.54), <i>P</i> = 0.984
DHEA	3.29 (2.28-7.06)	1.92 (0.87-4.23)	3.57 (2.09-17.04), <i>P</i> = 0.379	5.89 (2.63-9.89), <i>P</i> = 0.002
DHEAS	2295,37 (1516.25- 3550.10)	1322.48 (482.38-1676.14)	3414,60 (1520,31-7289,90), <i>P</i> = 0.185	3143,60 (1430,88– 11056,80), <i>P</i> = 0.001
Androstendion	3.77 (2.78-5.18)	2.54 (1.59-4.43)	3.04 (1.89-8.52), <i>P</i> = 0.892	4.19 (1.69-6.67), <i>P</i> = 0.152
Testosteron	12.21 (7.91-16.50)	0.46 (0.27-1.06)	9.4 (3.36-12.84), <i>P</i> = 0.134	1.10 (0.44-1.88), <i>P</i> = 0.027
Dihydrotestosteron	0.85 (0.43-1.24)	<i>0.28</i> ( <i>0.28-0.28</i> )	0.76 (0.28-1.38), <i>P</i> = 0.521	<i>0.28</i> ( <i>0.28-0.28</i> ), <i>P</i> = 0.237
Estradiol	<i>0.06</i> ( <i>0.06-0.06</i> )	<i>0.06</i> ( <i>0.06-0.06</i> )	0.22 (0.06-0.53), <i>P</i> < 0.001	0.22 (0.06-0.39), <i>P</i> = 0.001

Zusammenfassend musste jedoch im Hinblick auf die jeweiligen IQR eine deutliche Überlappung der Plasmasteroidkonzentrationen der beiden Gruppen festgestellt werden, sodass auch die diagnostische Aussagekraft einzelner Steroide als gering eingestuft werden musste. Dies zeigten auch die ROC-Analysen mit höchsten AUC-Werten (Männer (m)/ Frauen (f)) für Estradiol (m: 0,805; f: 0,722) und Progesteron (m: 0,767; f: 0,754) (Abbildung 13).



**Abbildung 13**

### Diagnostische Aussagekraft einzelner Steroidhormone

**(A)** ROC Kurven der 15 einzelnen Steroide in männlichen Patienten. Beste AUC-Werte für Estradiol mit 0,805 und Progesteron mit 0,767. **(B)** ROC Kurven der 15 einzelnen Steroide in weiblichen Patientinnen. Beste AUC-Werte für Estradiol mit 0,722 und Progesteron mit 0,754. Eigene Darstellung, publiziert in [80].

### 3.1.3 Logistisches Regressionsmodell

Zur Steigerung der diagnostischen Aussagekraft wurden im Folgenden, in Kooperation mit den oben genannten Mitarbeitern des bioinformatischen Lehrstuhls der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Kombinationen von Steroiden mit höchsten AUC- und kleinsten AIC-Werten berechnet. Angesichts der geschlechtsspezifischen Unterschiede, die aus der vorhergehenden Analyse hervorgehen, wurden getrennte Modelle für männliche und weibliche Patient\*innen beschrieben.

Im Rahmen der logistischen Regressionsmodell-Auswahl wurden unterschiedliche Tests durchgeführt: die Forward Selection beginnt mit einem leeren Modell, testet jedes Steroidhormon und fügt schrittweise dasjenige mit dem besten AIC-Wert hinzu [95]. Bei der Backward Selection wird mit einem vollen Modell der 15 Steroide begonnen, jedes Steroidhormon getestet und jeweils das Steroidhormon mit dem schlechtesten AIC-Wert schrittweise entfernt [95]. Die Bothside Stepwise Selection testet bei jedem Schritt, welches Steroidhormon hinzugefügt oder entfernt werden kann. Dabei kann mit einem leeren Modell (Stepwise Forward) und mit einem vollen Modell (Stepwise Backward) begonnen werden [94, 95].

## Modell für männliche Patienten

Die Bothside Stepwise Selection (beginnend mit leerem Modell) zeigte eine Signatur dreier Steroidhormone mit Corticosteron, Estradiol und Progesteron, die den kleinsten AIC (34,14) und den höchsten AUC-Wert (0,88) erbrachte (Abbildung 14 A und C).

In der Forward Selection ergab sich eine Viererkombination aus Corticosteron, Estradiol, Progesteron und Aldosteron mit schlechterem AIC (35,58) und besserer AUC (0,90) (Abbildung 14 B und C).

In beiden Modellierungen ergab sich mit 73,3% jedoch eine relativ geringe Sensitivität, die in der nachfolgenden Analyse einer Sechs-Steroid-Signatur verbessert werden konnte.

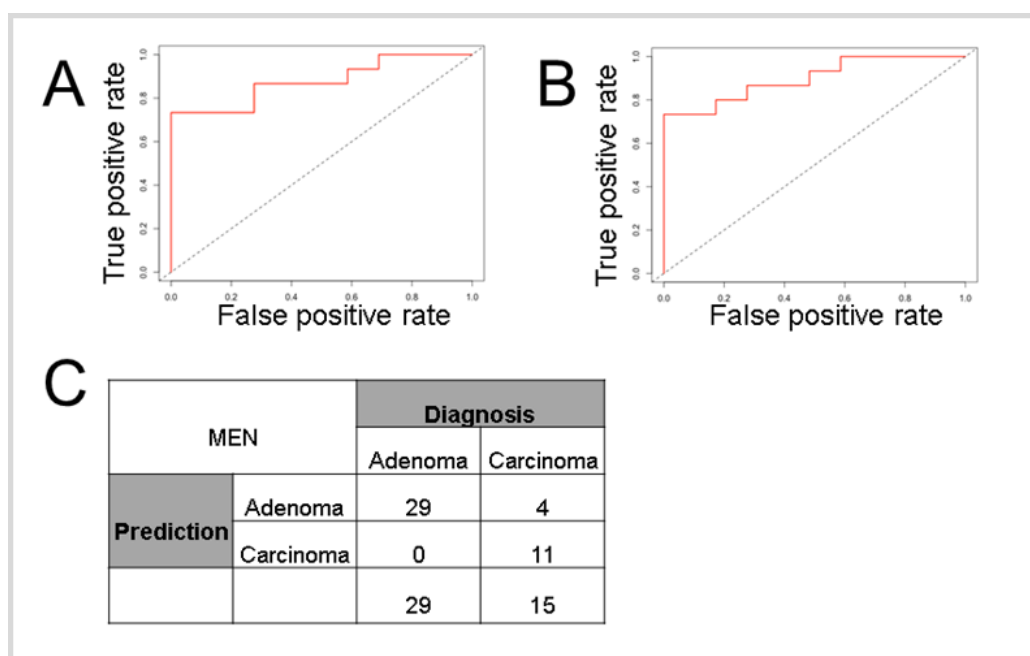


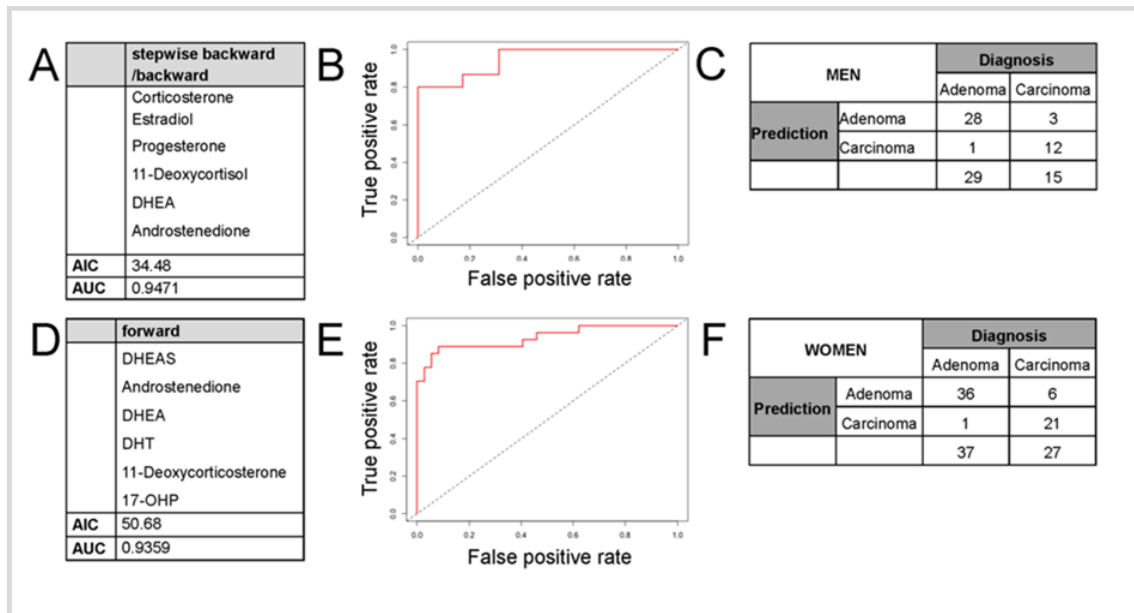
Abbildung 14

### Alternativ-Modelle für die Diagnose von ACC in männlichen Patienten

(A) ROC Kurve der Signatur mit Corticosteron, Estradiol und Progesteron nach Bothside Stepwise Modellselektion (beginnend mit leerem Modell) (AIC: 34,14; AUC: 0,88). (B) ROC Kurve der Signatur mit Corticosteron, Estradiol, Progesteron und Aldosteron nach Forward Modellselektion (AIC: 35,58; AUC 0,90). (C) Konfusionsmatrix beider Signaturen in männlichen Patienten (Sensitivität: 73,3%; Spezifität: 100%; PPV: 100%; NPV: 87,9%; Genauigkeit: 90,9%). Eigene Darstellung, publiziert in [80].

Sowohl die Analyse mit der Bothside Stepwise Selection (beginnend mit vollem Modell), als auch mit der Backward Selection identifizierte eine Sechs-Steroid-Signatur der Steroidhormone Corticosteron, Estradiol, Progesteron, 11-Deoxycortisol, DHEA und Androstendion. Hierfür zeigte sich ein AIC von 34,48 mit dem höchsten AUC-Wert von 0,95 (Abbildung 15 A, B). Für dieses Modell wurde eine Konfusionsmatrix der

diagnostischen Parameter erstellt, bei der die Sechs-Steroid-Signatur die beste Vorhersagekraft zeigte (Abbildung 15 C). Mit einer Sensitivität von 80% und gleichzeitiger Spezifität von 96,6% konnte anhand dieser Signatur in der Männergruppe die Diagnose richtig bestimmt werden. Gleichzeitig konnte auf diese Weise ein PPV von 92,3% und ein NPV von 90,3% erreicht werden.



**Abbildung 15**

**Modelle mit 6-Steroid-Signatur für die Diagnose von ACC**

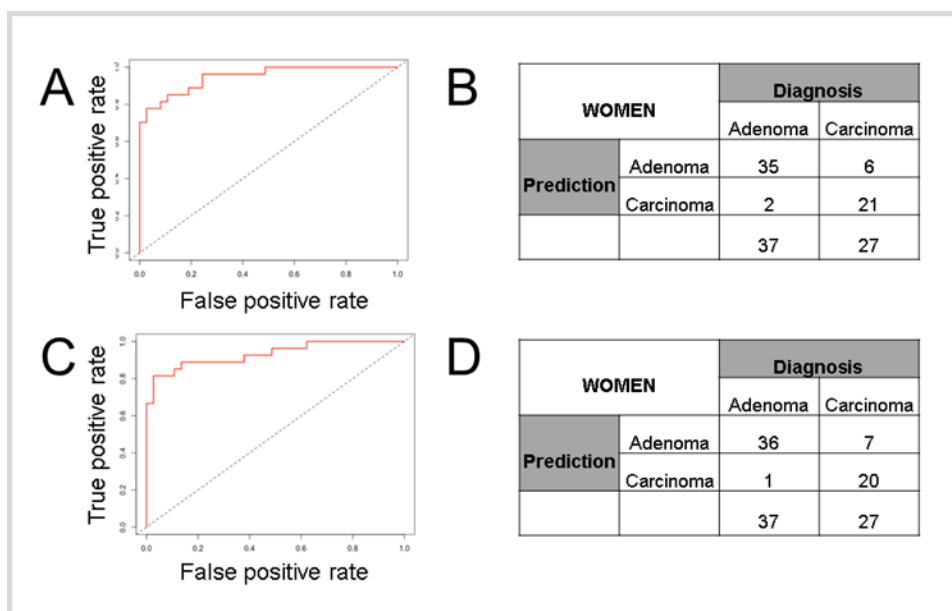
(A) 6-Steroid-Kombination mit bester Trennschärfe bei Bothside Stepwise (beginnend mit vollem Modell) und Backward Modellselektion bei männlichen Patienten: Corticosteron, Estradiol, Progesteron, 11-Deoxycortisol, DHEA, Androstendion. (B) ROC Kurve der unter (A) genannten 6er-Signatur (AIC: 34,48; AUC: 0,95) bei männlichen Patienten. (C) Konfusionsmatrix der unter (A) genannten Signatur bei männlichen Patienten (Sensitivität: 80,0%; Spezifität: 96,6%; PPV: 92,3%; NPV: 90,3%; Genauigkeit: 90,0%). (D) 6-Steroid-Kombination mit bester Trennschärfe bei Forward Modellselektion bei weiblichen Patientinnen: DHEAS, Androstendion, DHEA, Dihydrotestosteron, 11-Deoxycorticosteron, 17-Hydroxyprogesteron. (E) ROC Kurve der unter (D) genannten 6er-Signatur (AIC: 50,68; AUC: 0,94) bei weiblichen Patientinnen. (F) Konfusionsmatrix der unter (D) genannten Signatur bei weiblichen Patientinnen (Sensitivität: 77,8%; Spezifität: 97,3%; PPV: 95,5%; NPV: 85,7%; Genauigkeit: 89,1%). Eigene Darstellung, publiziert in [80].

**Modell für weibliche Patientinnen**

Die Bothside Stepwise Regressionsmodelle (beginnend mit leerem bzw. vollem Modell) ergaben eine Kombination der sechs Steroidhormone DHEAS, Androstendion, DHEA, Dihydrotestosteron, 11-Deoxycorticosteron und Aldosteron mit einem AIC von 49,91 und einer AUC von 0,95 (Abbildung 16 A und B). Bei Testung der Backward Selection zeigte sich eine Fünfersignatur von DHEAS, Androstendion, DHEA, Dihydrotestosteron und 11-Deoxycorticosteron mit vergleichbarem AIC (49,92) und schlechterem AUC-Wert (0,93) (Abbildung 16 C und D). Bezüglich der Vorhersagewerte erreichte die

Fünfersignatur einen besseren PPV von 95,2% (gegenüber 91,3%), bei schlechterem NPV von 83,7% (gegenüber 85,4%). Beide Modelle erwiesen jedoch eine relativ geringe Sensitivität mit 77,9% und 74,1%.

Bei der Forward Selection wurde eine ähnliche Sechser-Signatur wie bei den Bothside Stepwise Regressionen identifiziert, welche statt Aldosteron 17-Hydroxyprogesteron beinhaltete (DHEAS, Androstendion, DHEA, Dihydrotestosteron, 11-Deoxycorticosteron, 17-Hydroxyprogesteron). Diese Signatur zeigte ähnlich gute Werte für AIC (50,68) und AUC (0,94) (Abbildung 15 D und E) und die besten Ergebnisse für die Vorhersagewerte mit einer Sensitivität von 77,8%, einer Spezifität von 97,3%, sowie einen PPV von 95,5% und NPV von 85,7% (Abbildung 15 F).



**Abbildung 16** **Alternativ-Modelle für die Diagnose von ACC in weiblichen Patientinnen**

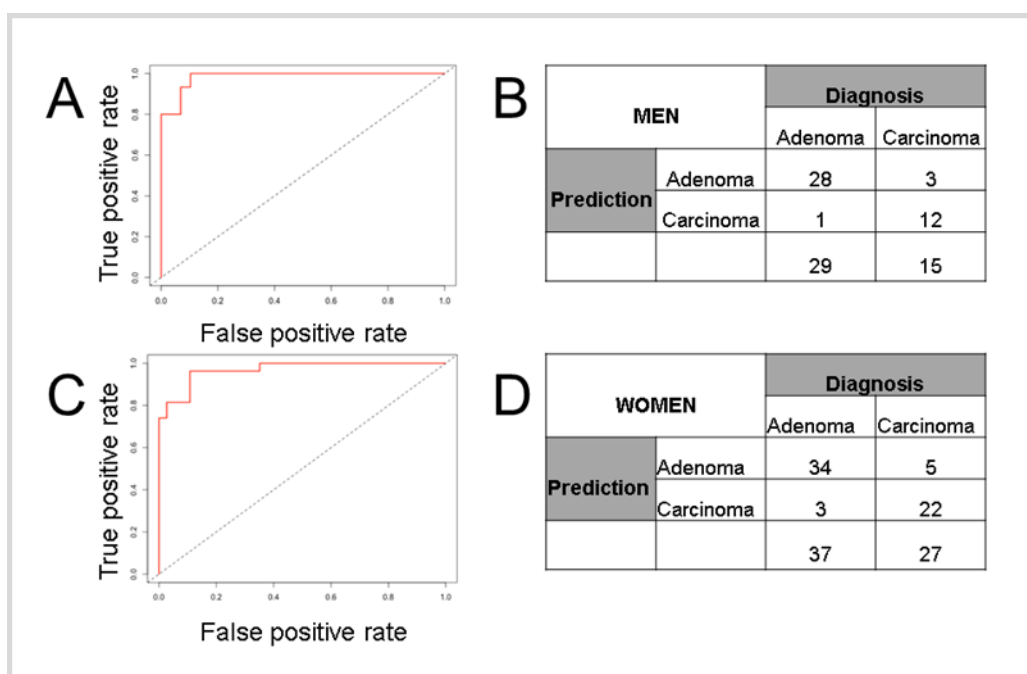
(A) ROC Kurve der Signatur mit DHEAS, Androstendion, DHEA, Dihydrotestosteron, 11-Deoxycorticosteron und Aldosteron nach Bothside Stepwise (beginnend mit leerem bzw. vollem Modell) Modellselektion (AIC: 49,91; AUC: 0,95). (B) Konfusionsmatrix der 6-Steroid-Signatur in weiblichen Patientinnen (Sensitivität: 77,9%; Spezifität: 94,6%; PPV: 91,3%; NPV: 85,4%; Genauigkeit: 87,5%). (C) ROC Kurve der Signatur mit DHEAS, Androstendion, DHEA, Dihydrotestosteron und 11-Deoxycorticosteron nach Backward Modellselektion (AIC: 49,92; AUC: 0,93). (D) Konfusionsmatrix der 5-Steroid-Signatur in weiblichen Patientinnen (Sensitivität: 74,1%, Spezifität: 97,3%; PPV: 95,2%; NPV: 83,7%; Genauigkeit: 87,5%). Eigene Darstellung, publiziert in [80].

### 15-Steroid-Modell und neutrales Modell für Gesamtkohorte

Um auszuschließen, dass ein Modell mit einer Kombination aller 15 Steroidhormone deutlich bessere diagnostische Trennschärfe aufzeigt, wurde für beide Geschlechter ein 15-Steroid-Modell getestet (Abbildung 17). Hierbei konnten keine signifikant

besseren Werte für AIC und AUC erreicht werden, sodass die 6-Steroid-Signatur (Abbildung 15) für die vorliegende Studienpopulation als diagnostisches Minimum mit bestmöglichem Aussagewert anzusehen ist.

In einem weiteren Schritt wurde mit den gleichen Regressionsmodellen ein nicht-geschlechtsspezifisches Modell erprobt. Hier konnte mit einer Sechs-Steroid-Signatur in der Forward Selection und Bothside Stepwise Selection (beginnend mit vollem Modell) (DHEAS, DHEA, Testosteron, Dihydrotestosteron, 11-Deoxycorticosteron und Aldosteron) lediglich ein AUC-Wert von 91,38 erreicht werden und auch die Vorhersagewerte PPV und NPV blieben unter denen der geschlechtsspezifischen Modellierung, sodass die geschlechtsspezifische Analyse gerechtfertigt erscheint.



**Abbildung 17**

**15-Steroid-Modell zur Diagnose von ACC**

(A) ROC Kurve der Signatur mit der Kombination aller 15 Steroide in männlichen Patienten (AIC: 45,93; AUC: 0,98). (B) Konfusionsmatrix der 15-Steroid-Signatur in männlichen Patienten (Sensitivität: 80,0%; Spezifität: 96,6%; PPV: 92,3%; NPV: 90,3%; Genauigkeit: 90,9%). (C) ROC Kurve der Signatur mit der Kombination aller 15 Steroide in weiblichen Patientinnen (AIC: 59,83; AUC: 0,97). (D) Konfusionsmatrix der 15-Steroid-Signatur in weiblichen Patientinnen (Sensitivität: 81,5%; Spezifität: 91,9%; PPV: 88,0%; NPV: 87,2%; Genauigkeit: 87,5%). Eigene Darstellung, publiziert in [80].

Dieser Teil meiner Ergebnisse wurde in [80] publiziert (Wiederveröffentlicht mit der Genehmigung von Bioscientifica Limited aus *Plasma steroid metabolome profiling for the diagnosis of adrenocortical carcinoma*, Schweitzer, S., et al., 180 (2), 2019 in European Journal of Endocrinology; Genehmigung erteilt durch Copyright Clearance Center, Inc.).

## 3.2 Ergebnisse der Metabolomics-Studie

### 3.2.1 Die Studienpatient\*innen

In diese Analyse flossen 42 Proben von Karzinompatient\*innen und 44 Proben von Adenompatient\*innen ein, die alle demselben Patient\*innenpool entstammen, der auch für die vorangehende Steroidhormonanalyse genutzt wurde. Die demographischen Parameter der Studienpatient\*innen können Tabelle 10 entnommen werden. Das mediane Alter beträgt in der Adenomgruppe 59 und in der Karzinomgruppe 57 Jahre. In beiden Gruppen sind Frauen entsprechend der bei diesen höheren Inzidenz repräsentiert [20], wodurch gerade in der Karzinomgruppe nur 36% männliche Patienten zu finden sind. Fast 60% der Patient\*innen in der Adenomgruppe haben hormonell inaktive Tumore, der Rest Cortisol-produzierende. In der Karzinomgruppe ist das Sekretionsbild diverser. Genaueres hierzu, sowie bezüglich des ENSAT Stadiums und der Tumormanifestation zum Probenzeitpunkt kann Kapitel 3.1.1 entnommen werden, da dort dieselbe Karzinomkohorte bereits beschrieben wurde.

**Tabelle 10 Demographische und klinische Charakteristika der NNR-Tumor-Patient\*innen der Metabolomics-Messung**

Die Daten sind als n (%) dargestellt. Vergleich kategorialer Variablen zwischen Gruppen mit Chi-Square Test durchgeführt. Eigene Daten.

<sup>a</sup>Die Daten sind in Jahren (Median (Range)) dargestellt. <sup>a</sup>Vergleich zwischen ACA und ACC: endokrin inaktiv vs. hormonproduzierend. <sup>b</sup>Vergleich zwischen ACA und ACC: endokrin inaktiv vs. alleinige Cortisolsekretion.

	ACA (n=44) n (%), Range)	ACC (n=42) n (%), Range)	P-Wert
<b>Geschlecht</b> , männlich	21 (48)	15 (36)	0.259
<b>Alter</b> zum Zeitpunkt der Probenentnahme <sup>a</sup> :	59 (21-81)	57 (20-80)	
<b>Hormon Sekretion</b>			
Inaktiv	26 (59)	16 (38)	
Endokrin aktiv	18 (41)	26 (62)	0.052 <sup>a</sup>
Cortisol (alleinig)	18 (41)	7 (17)	0.400 <sup>b</sup>
Androgene		4 (10)	
Cortisol & Mineralocorticoide		2 (5)	
Cortisol & Geschlechtshormone		12 (29)	
Estrogene		1 (2)	
<b>ENSAT stage</b> bei Diagnosestellung			
I		4 (10)	
II		14 (33)	
III		7 (17)	
IV		17 (40)	
<b>Tumormanifestation</b> zum Probenzeitpunkt			
Primärtumor	44 (100)	13 (31)	
Primärtumor + Metastasen		11 (26)	
Lokalrezidiv		3 (7)	
Metastasen		9 (21)	
Lokalrezidiv + Metastasen		6 (14)	



### 3.2.2 Metabolomics-Profilung

Da Metaboliten, bei denen mehr als 40% der Proben unterhalb des Detektions- (<LLOD) bzw. Quantifizierungslimits (<LLOQ) lagen, von der statistischen Analyse ausgeschlossen wurden, konnten von den ursprünglich 188 Metaboliten letztendlich 133 in der Statistik berücksichtigt werden. Eine Liste aller 188 Metaboliten, einschließlich der 55 nicht berücksichtigten ist im Anhang (Tabelle 25) zu finden. Die statistischen Analysen erfolgten größtenteils nach den einzelnen Metabolitklassen der Acylcarnitine, Aminosäuren, Monosaccharide, Glycerophospholipide, Sphingolipide und biogenen Amine, um eine bessere Übersichtlichkeit zu erreichen. Nachfolgend werden für die einzelnen Metaboliten Abkürzungen entsprechend der Tabelle 25 im Anhang verwendet. Das dort zu findende Schema für die Glycerophospholipide und Sphingolipide ist wie folgt zu verstehen:

**Tabelle 11 Nomenklatur der Glycerophospholipide und Sphingolipide.**  
Eigene Darstellung modifiziert nach [97].

Phosphatidylcholin	PC aa C[x:y] PC ae C[x:y]	x = Anzahl C-Atome in der Acyl- bzw. Alkylkette  y = Anzahl der Doppelbindungen	aa = Diacylkette ae = Acylalkylkette
Lyso- phosphatidylcholin	lysoPC a C[x:y]		a = Acylkette
Sphingomyelin	SM C[x:y]		

Auf die Nennung des IQR, sowie der exakten Mediane im Fließtext wurde an dieser Stelle aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Die Werte können in den Tabellen 12-16 eingesehen werden, die zur leichteren Handhabung an entsprechender Stelle in diesem Ergebnisteil aufgeführt werden.

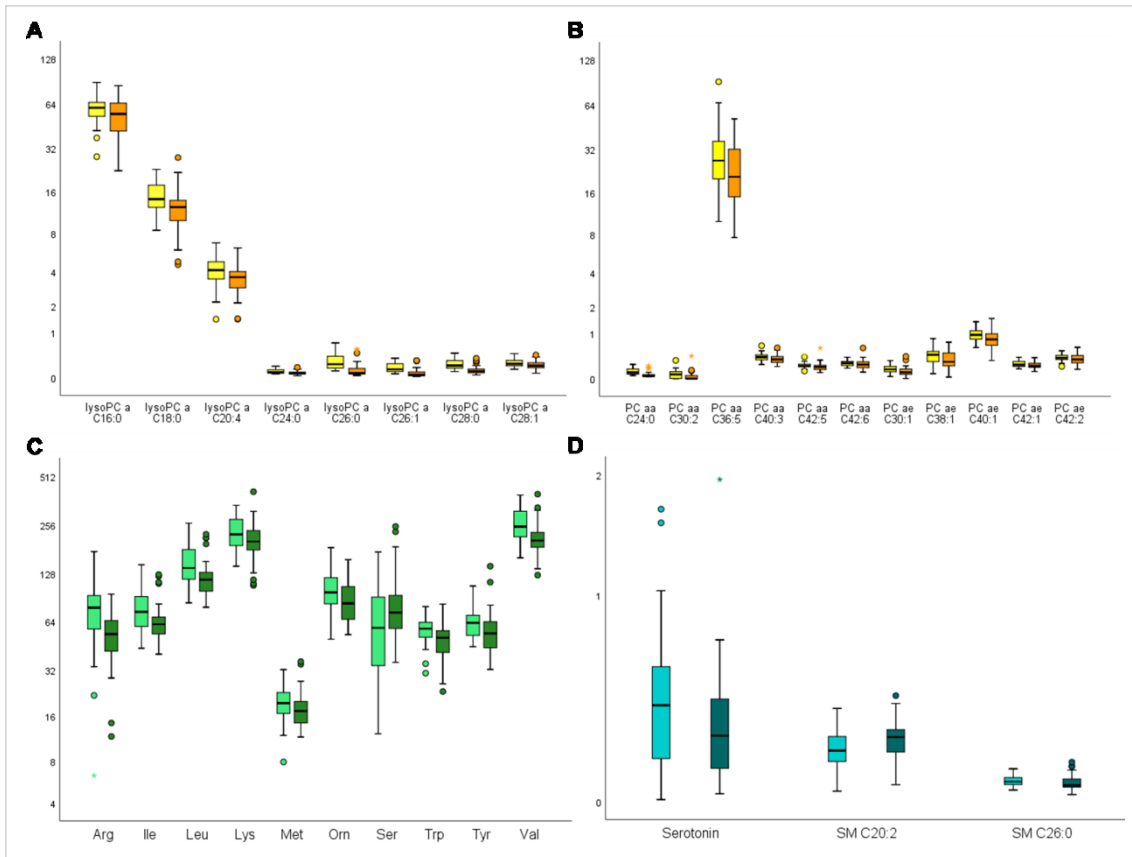
Bei Analyse der Gesamtgruppen ( $\mu\text{M}$ , Median), konnten im Mann-Whitney U-Test für den Vergleich zwischen der Karzinom- und der Kontrollgruppe signifikante Unterschiede für zehn Aminosäuren, 19 Glycerophospholipide, zwei Sphingolipide und ein biogenes Amin gezeigt werden. Der Vergleich der medianen Konzentrationen dieser Metaboliten ist in Tabelle 12 abzulesen. Bei den Aminosäuren Arginin, Isoleucin, Leucin, Methionin, Ornithin, Tryptophan, Tyrosin und Valin waren die medianen Konzentrationen in der Kontrollgruppe signifikant höher als in der Karzinomgruppe. Nur für Serin zeigten sich signifikant höhere Konzentrationen bei den Karzinomen. Unter den Glycerophospholipiden zeigten sich in der Karzinomgruppe alle folgenden Metaboliten signifikant niedriger als in der Gruppe der Adenome: lysoPC a C16:0, lysoPC a C18:0, lysoPC a C20:4, lysoPC a C24:0, lysoPC a C26:0, lysoPC a C26:1,

lysoPC a C28:0, lysoPC a C28:1, PC aa C24:0, PC aa C30:2, PC aa C36:5, PC aa C40:3, PC aa C42:5, PC aa C42:6, PC ae C30:1, PC ae C38:1, PC ae C40:1, PC ae C42:1, PC ae C42:2. Das Sphingolipid SM C20:2 war in der Karzinomgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe, während SM C26:0 in der Kontrollgruppe höhere Konzentrationen zeigte. Die Serotoninkonzentration lag in der Adenomgruppe ebenfalls höher als in der Karzinomgruppe. Graphisch sind die Ergebnisse in Abbildung 18 dargestellt.

**Tabelle 12 Metaboliten mit signifikant unterschiedlichen Plasmakonzentrationen des Gesamtgruppen-Vergleichs.** Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ] als Median und IQR dargestellt. Eigene Darstellung.

<b>Metaboliten mit signifikant unterschiedlichen Plasmakonzentrationen (Median (IQR) [<math>\mu\text{M}</math>]) in der Gesamtgruppe</b>				
		<b>ACA</b>	<b>ACC</b>	<b>p-Wert</b>
Aminosäuren	Arginin	78,5 (56,5-94,1)	53,6 (41,7-65,2)	<0,001
	Isoleucin	73,9 (59,5-92,6)	61,8 (53,4-68,8)	0,007
	Leucin	138,5 (116,5-180,0)	117,0 (99,2-130,3)	0,001
	Lysin	223,5 (190,3-280,5)	202,0 (117,5-237,3)	0,033
	Methionin	19,6 (16,7-22,9)	17,4 (14,5-20,0)	0,027
	Ornithin	97,7 (82,7-121,8)	83,4 (66,4-107,0)	0,016
	Serin	58,8 (33,9-91,3)	73,1 (58,2-94,9)	0,039
	Tryptophan	58,0 (51,3-63,5)	50,9 (41,1-56,3)	0,002
	Tyrosin	63,2 (52,3-70,3)	54,2 (43,5-64,2)	0,004
	Valin	249,5 (215,0-314,8)	204,5 (185,0-231,8)	<0,001
Glycerophospholipide	lysoPC a C16:0	60,2 (52,7-65,9)	54,7 (41,6-64,9)	0,045
	lysoPC a C18:0	14,2 (12,3-17,8)	12,5 (10,0-14,1)	0,001
	lysoPC a C20:4	4,2 (3,5-4,9)	3,6 (2,9-4,1)	0,011
	lysoPC a C24:0	0,09 (0,07-0,13)	0,07 (0,06-0,09)	0,001
	lysoPC a C26:0	0,23 (0,16-0,39)	0,07 (0,06-0,15)	<0,001
	lysoPC a C26:1	0,14 (0,10-0,24)	0,04 (0,03-0,09)	<0,001
	lysoPC a C28:0	0,2 (0,15-0,30)	0,1 (0,08-0,14)	<0,001
	lysoPC a C28:1	0,24 (0,20-0,30)	0,20 (0,17-0,26)	0,016
	PC aa C24:0	0,10 (0,07-0,16)	0,04 (0,04-0,07)	<0,001

<b>Metaboliten mit signifikant unterschiedlichen Plasmakonzentrationen (Median (IQR) [µM]) in der Gesamtgruppe</b>				
		<b>ACA</b>	<b>ACC</b>	<b>p-Wert</b>
	PC aa C30:2	0,07 (0,002-0,12)	0,001 (0,001-0,05)	0,001
	PC aa C36:5	26,8 (20,0-36,6)	20,7 (14,9-32,1)	0,026
	PC aa C40:3	0,39 (0,33-0,44)	0,34 (0,28-0,41)	0,040
	PC aa C42:5	0,22 (0,20-0,25)	0,19 (0,15-0,23)	0,021
	PC aa C42:6	0,27 (0,22-0,30)	0,24 (0,18-0,29)	0,042
	PC ae C30:1	0,15 (0,11-0,21)	0,10 (0,07-0,16)	0,001
	PC ae C38:1	0,44 (0,30-0,52)	0,29 (0,21-0,48)	0,031
	PC ae C40:1	0,95 (0,82-1,08)	0,82 (0,66-0,98)	0,014
	PC ae C42:1	0,24 (0,21-0,30)	0,22 (0,19-0,26)	0,043
	PC ae C42:2	0,37 (0,34-0,43)	0,34 (0,27-0,42)	0,049
Sphingolipide	SM C20:2	0,19 (0,14-0,24)	0,24 (0,18-0,27)	0,011
	SM C26:0	0,07 (0,06-0,08)	0,06 (0,05-0,08)	0,014
Biogene Amine	Serotonin	0,38 (0,15-0,59)	0,25 (0,12-0,41)	0,048



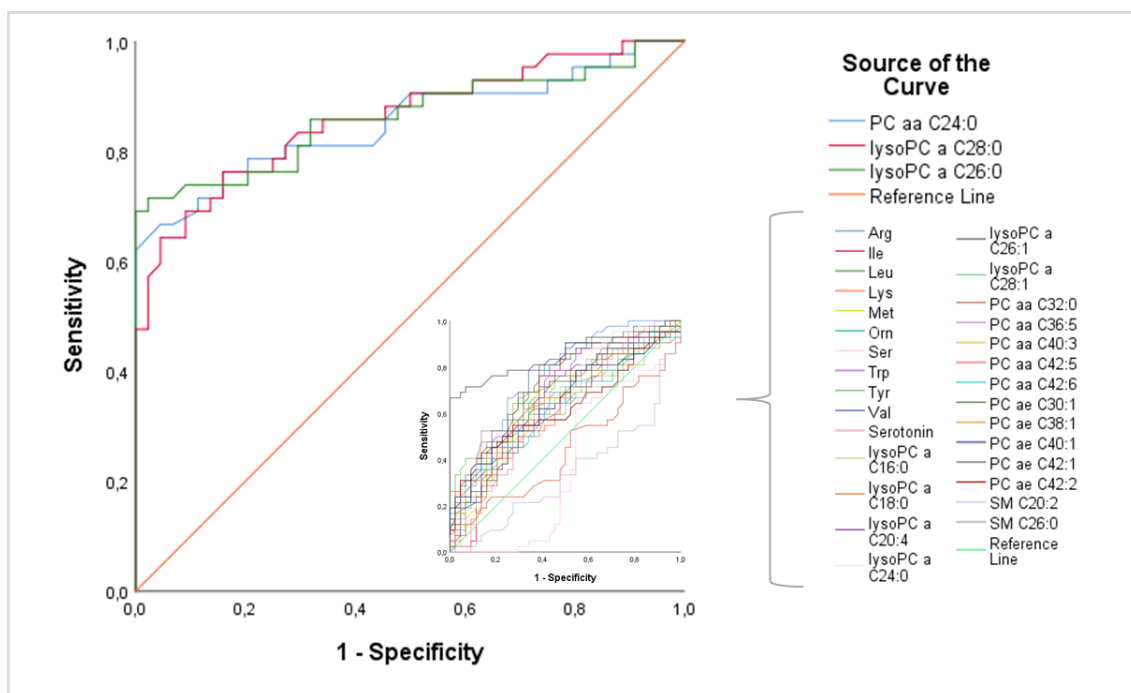
**Abbildung 18**

### Signifikant unterschiedliche Metabolitkonzentrationen bei ACA und ACC

Log-2-transformierte Boxplots der per LC-MS/MS quantifizierten absoluten Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ] der 32 Metaboliten mit signifikanten Unterschieden bei Patient\*innen mit nicht-Aldosteron-produzierenden ACA (jew. hellere Farbnuance) und ACC (jew. dunklere Farbnuance). Signifikanz wurde bei  $P < 0,05$  angenommen. Pfeile geben im Folgenden für ACC eine signifikant erhöhte ( $\uparrow$ ) bzw. erniedrigte ( $\downarrow$ ) Konzentration im Vergleich zu ACA an. (Lyso-) Phosphatidylcholine in gelb/orange, Aminosäuren in grün, biogene Amine und Sphingolipide in blau. **(A)** Signifikant niedrigere Konzentrationen der acht Lyso-Phosphatidylcholine lysoPC a C16:0, lysoPC a C18:0, lysoPC a C20:4, lysoPC a C24:0, lysoPC a C26:0, lysoPC a C26:1, lysoPC a C28:0 und lysoPC a C28:1 in ACC. **(B)** Signifikant niedrigere Konzentrationen der 11 Phosphatidylcholine in ACC: PC aa C24:0, PC aa C30:2, PC aa C36:5, PC aa C40:3, PC aa C42:5, PC aa C42:6, PC ae C30:1, PC ae C38:1, PC ae C40:1, PC ae C42:1, PC ae C42:2. **(C)** Signifikant unterschiedliche Konzentrationen der zehn Aminosäuren Arginin (Arg)  $\downarrow$ , Isoleucin (Ile)  $\downarrow$ , Leucin (Leu)  $\downarrow$ , Lysin (Lys)  $\downarrow$ , Methionin (Met)  $\downarrow$ , Ornithin (Orn)  $\downarrow$ , Serin (Ser)  $\uparrow$ , Tryptophan (Trp)  $\downarrow$ , Tyrosin (Tyr)  $\downarrow$  und Valin (Val)  $\downarrow$ . **(D)** Signifikant niedrigere Konzentration des biogenen Amins Serotonin  $\downarrow$  in ACC und signifikant unterschiedliche Konzentrationen der zwei Sphingolipide SM C20:2  $\uparrow$  und SM C26:0  $\downarrow$ . Eigene Darstellung.

Aufgrund des Überlappungsbereiches und des mäßig guten Diskriminierungsvermögens mit maximalen AUC-Werten von 0,85 für PC aa C24:0 und 0,86 für lyso PC a C28:0 und lyso PC a C26:0 (Abbildung 19) in der receiver operating characteristic Statistik derjenigen Metaboliten, die aufgrund ihrer signifikanten P-Werte im Mann-Whitney U-Test analysiert wurden, wurden die Gruppen im Folgenden nach

Sekretionsstatus und Geschlecht weiter aufgeteilt und untersucht. Die AUC-Werte der einzelnen Metaboliten können in Tabelle 26 im Anhang nachvollzogen werden. An dieser Stelle seien nur die drei höchsten Werte genannt.



**Abbildung 19**

**Diagnostische Aussagekraft einzelner Metaboliten**

ROC Kurven der im Mann Whitney U-Test signifikanten Metaboliten in der Gesamtgruppe. Die ROC Kurven der drei Metaboliten mit besten AUC-Werten sind groß dargestellt. Maximaler AUC-Wert von 0,86 für lyso PC a C26:0. Das Inlay zeigt die ROC Kurven der restlichen signifikanten Metaboliten. Eigene Darstellung.

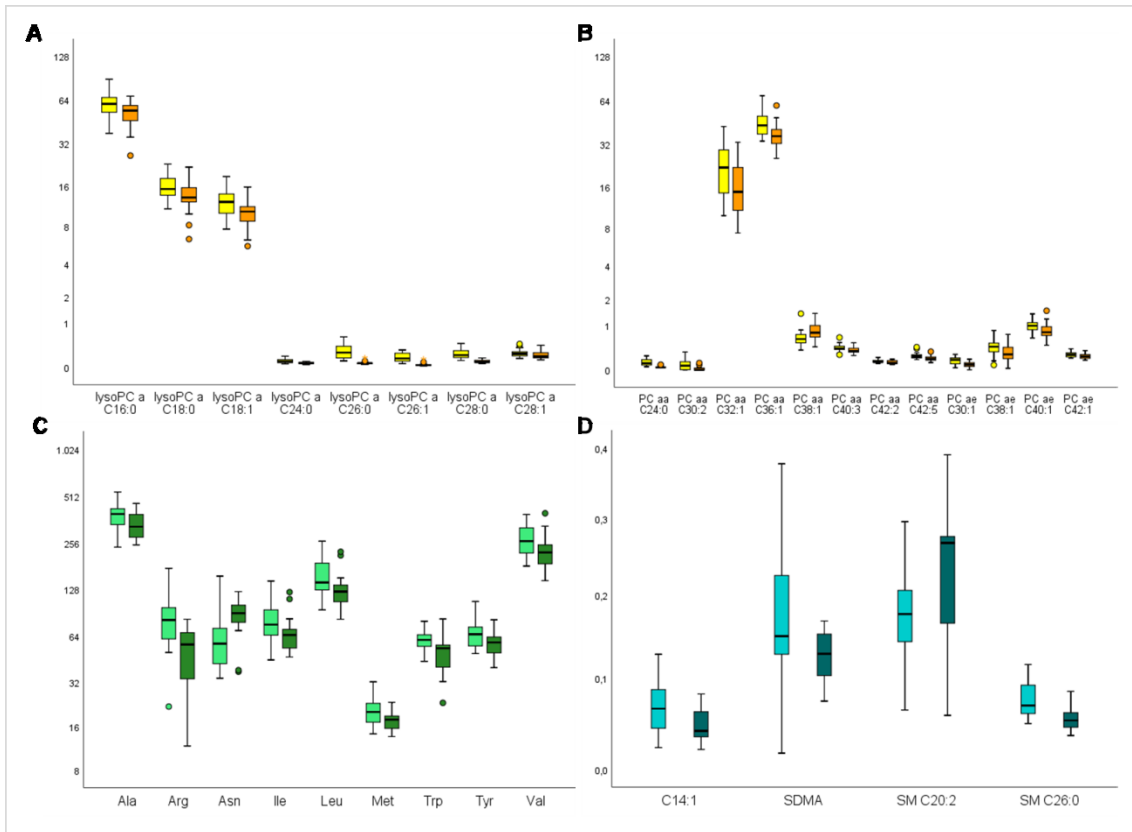
Bei der Analyse der hormoninaktiven Adenom- und Karzinomgruppe zeigten neun Aminosäuren, 20 Glycerophospholipide, jeweils ein Acylcarnitin und ein biogenes Amin, sowie zwei Sphingolipide signifikant unterschiedliche Konzentrationen in den beiden Vergleichsgruppen. Die medianen Metabolitkonzentrationen des Vergleichs der hormoninaktiven Gruppen sind in Tabelle 13 abzulesen. Die Konzentration des Acylcarnitins C14:1 war in der Karzinomgruppe signifikant niedriger (siehe Abbildung 20 D). Bei den Aminosäuren (siehe Abbildung 20 C) waren die Konzentrationen für Alanin, Arginin, Isoleucin, Leucin, Methionin, Tryptophan, Tyrosin und Valin in der Karzinomgruppe signifikant niedriger als bei den Kontrollen. Nur die Konzentration von Asparagin war in der Karzinomgruppe höher. Wie auch bei den meisten Aminosäuren lag die Konzentration des biogenenamins (siehe Abbildung 20 D) SDMA in der Karzinomgruppe signifikant niedriger. Bis auf PC aa C38:1 zeigten alle folgenden Glycerophospholipid-Konzentrationen signifikant niedrigere Werte bei den ACCs (Abbildung 20 A und B): lyso PC a C16:0, lyso PC a C18:0, lyso PC a C18:1, lyso PC a

C24:0, lyso PC a C26:0, lyso PC a C26:1, lyso PC a C28:0, lyso PC a C28:1, PC aa C24:0, PC aa C30:2, PC aa C32:1, PC aa C36:1, PC aa C40:3, PC aa C42:2, PC aa C42:5, PC ae C30:1, PC ae C38:1, PC ae C40:1, PC ae C42:1. Wie schon in der Gesamtgruppe gesehen, lag auch in diesem Vergleich der hormoninaktiven Gruppen die Konzentration des Sphingolipids SM C20:2 in der Karzinomgruppe höher als bei den Adenomen. Genau umgekehrt zeigten sich die Konzentrationsvergleiche von SM C26:0 (Abbildung 20 D).

**Tabelle 13 Metaboliten mit signifikant unterschiedlichen Plasmakonzentrationen des Vergleichs der hormoninaktiven Gruppen.** Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ] als Median und IQR dargestellt. Eigene Darstellung.

<b>Metaboliten mit signifikant unterschiedlichen Plasmakonzentrationen (Median (IQR) [<math>\mu\text{M}</math>]) in den hormoninaktiven Gruppen</b>				
		<b>ACA</b>	<b>ACC</b>	<b>p-Wert</b>
Aminosäuren	Alanin	391,5 (329,5-425,0)	325,0 (277,3-391,0)	0,033
	Arginin	81,2 (60,9-99,4)	56,2 (31,8-68,4)	0,003
	Asparagin	57,0 (42-73,5)	89,8 (78,0-102,1)	0,01
	Isoleucin	75,8 (64,3-96,9)	64,9 (52,5-71,2)	0,035
	Leucin	142,0 (126,5-189,8)	124,0 (106,3-137,3)	0,026
	Methionin	20,2 (16,9-23,4)	17,9 (15,4-19,0)	0,026
	Tryptophan	60,3 (54,2-66,0)	53,2 (37,9-56,0)	0,003
	Tyrosin	65,6 (54,7-73,7)	58,0 (48,9-63,7)	0,042
	Valin	262,0 (219,8-319,8)	221,5 (184,8-248,5)	0,014
Glycerophospholipide	lyso PC a C16:0	60,2 (52,0-67,0)	54,1 (45,6-59,0)	0,033
	lyso PC a C18:0	15,2 (13,7-18,2)	13,2 (12,1-16,0)	0,03
	lyso PC a C18:1	12,3 (10,0-14-1)	10,4 (8,7-11,4)	0,047
	lyso PC a C24:0	0,10 (0,08-0,13)	0,07 (0,06-0,08)	0,001
	lyso PC a C26:0	0,26 (0,16-0,39)	0,07 (0,06-0,08)	<0,001
	lyso PC a C26:1	0,15 (0,10-0,25)	0,04 (0,03-0,05)	<0,001
	lyso PC a C28:0	0,21 (0,17-0,30)	0,09 (0,08-0,12)	<0,001
	lyso PC a C28:1	0,24 (0,20-0,29)	0,19 (0,16-0,26)	0,049
	PC aa C24:0	0,11 (0,08-0,17)	0,04 (0,03-0,05)	<0,001
	PC aa C30:2	0,07 (0,002-0,14)	0,001 (0,001-0,03)	0,001

<b>Metaboliten mit signifikant unterschiedlichen Plasmakonzentrationen (Median (IQR) [µM]) in den hormoninaktiven Gruppen</b>				
		<b>ACA</b>	<b>ACC</b>	<b>p-Wert</b>
	PC aa C32:1	22,0 (14,4-29,3)	14,8 (10,7-22,4)	0,035
	PC aa C36:1	43,2 (37,5-51,0)	36,4 (32,3-40,0)	0,008
	PC aa C38:1	0,61 (0,52-0,74)	0,78 (0,65-1,00)	0,02
	PC aa C40:3	0,40 (0,37-0,44)	0,34 (0,32-0,40)	0,017
	PC aa C42:2	0,13 (0,12-0,16)	0,11 (0,10-0,16)	0,037
	PC aa C42:5	0,24 (0,20-0,27)	0,19 (0,16-0,22)	0,007
	PC ae C30:1	0,17 (0,10-0,21)	0,09 (0,05-0,12)	0,001
	PC ae C38:1	0,43 (0,32-0,51)	0,27 (0,19-0,46)	0,027
	PC ae C40:1	0,98 (0,86-1,09)	0,79 (0,70-0,96)	0,025
	PC ae C42:1	0,27 (0,23-0,30)	0,23 (0,20-0,27)	0,033
Acylcarnitine	C14:1	0,07 (0,04-0,09)	0,04 (0,03-0,06)	0,023
Biogenes Amin	SDMA	0,15 (0,13-0,23)	0,13 (0,10-0,15)	0,038
Sphingolipide	SM C20:2	0,18 (0,14-0,21)	0,27 (0,16-0,28)	0,045
	SM C26:0	0,07 (0,06-0,09)	0,05 (0,05-0,06)	0,001



**Abbildung 20**

**Signifikant unterschiedliche Metabolitkonzentrationen bei hormoninaktiven ACAs und ACCs.**

Log-2-transformierte Boxplots der per LC-MS/MS quantifizierten absoluten Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ] der 33 Metaboliten mit signifikanten Unterschieden bei Patient\*innen mit nicht-Aldosteron-produzierenden ACA (jew. hellere Farbnuance) und ACC (jew. dunklere Farbnuance). Signifikanz wurde bei  $P < 0,05$  angenommen. Pfeile geben im Folgenden für ACC eine signifikant erhöhte ( $\uparrow$ ) bzw. erniedrigte ( $\downarrow$ ) Konzentration im Vergleich zu ACA an. (Lyso-) Phosphatidylcholins in gelb/orange, Aminosäuren in grün, Sphingolipide, SDMA und C14:1 in blau. **(A)** Signifikant niedrigere Konzentrationen der acht Lyso-Phosphatidylcholins lysoPC a C16:0, lysoPC a C18:0, lyso PC a C18:1, lyso PC a C24:0, lyso PC a C26:0, lyso PC a C26:1, lyso PC a C28:0, lyso PC a C28:1 (alle  $\downarrow$ ). **(B)** Signifikant unterschiedliche Konzentrationen der zwölf Phosphatidylcholins PC aa C24:0  $\downarrow$ , PC aa C30:2  $\downarrow$ , PC aa C32:1  $\downarrow$ , PC aa C36:1  $\downarrow$ , PC aa C38:1  $\uparrow$ , PC aa C40:3  $\downarrow$ , PC aa C42:2  $\downarrow$ , PC aa C42:5  $\downarrow$ , PC ae C30:1  $\downarrow$ , PC ae C38:1  $\downarrow$ , PC ae C40:1  $\downarrow$ , PC ae C42:1  $\downarrow$ . **(C)** Signifikant unterschiedliche Konzentrationen der neun Aminosäuren Alanin (Ala)  $\downarrow$ , Arginin (Arg)  $\downarrow$ , Asparagin (Asn)  $\uparrow$ , Isoleucin (Ile)  $\downarrow$ , Leucin (Leu)  $\downarrow$ , Methionin (Met)  $\downarrow$ , Tryptophan (Trp)  $\downarrow$ , Tyrosin (Tyr)  $\downarrow$  und Valin (Val)  $\downarrow$ . **(D)** Signifikant niedrigere Konzentration des Acylcarnitins C14:1  $\downarrow$ , des biogenen Amins SDMA  $\downarrow$  und der zwei Sphingolipide SM C20:2  $\uparrow$  und SM C26:0  $\downarrow$  in ACC. Eigene Darstellung.

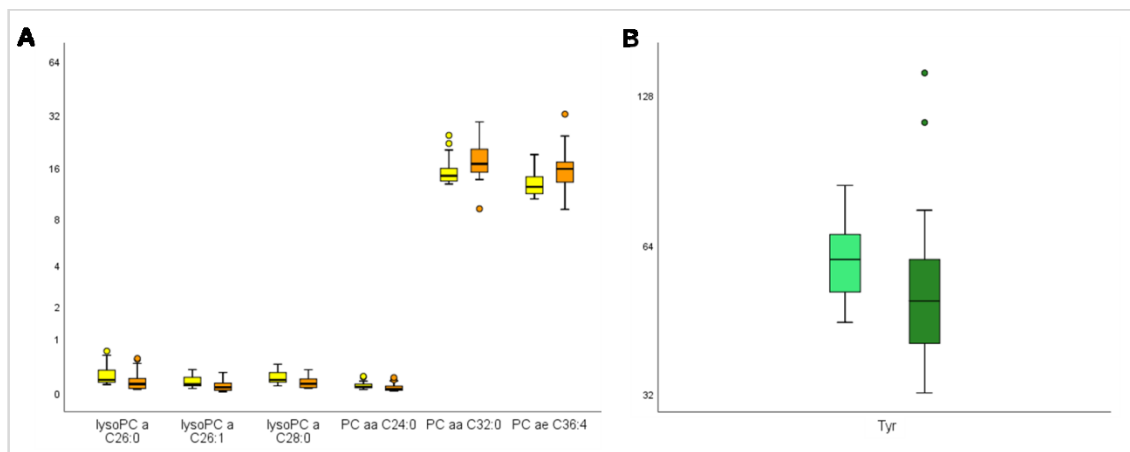
Die medianen Metabolitkonzentrationen des Vergleichs der Cortisol-produzierenden Gruppen sind in Tabelle 14 abzulesen. Die Untersuchung der Cortisol-produzierenden Adenome (Abbildung 21) und Karzinome ergab für die Aminosäure Tyrosin, sowie die vier Glycerophospholipide lyso PC a C26:0, lyso PC a C26:1, lyso PC a C28:0 und PC aa C24:0 signifikant niedrigere Konzentrationen in der Gruppe der Karzinome im



Vergleich zur Kontrollgruppe. Lediglich die Konzentrationen von PC aa C32:0 und PC ae C 36:4 waren im Vergleich in der Karzinomgruppe signifikant höher.

**Tabelle 14 Metaboliten mit signifikant unterschiedlichen Plasmakonzentrationen des Vergleichs der Cortisol-produzierenden Gruppen.** Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ] als Median und IQR dargestellt. Eigene Darstellung.

Metaboliten mit signifikant unterschiedlichen Plasmakonzentrationen (Median (IQR) [ $\mu\text{M}$ ]) in den Cortisol-produzierenden Gruppen				
		ACA	ACC	p-Wert
Aminosäuren	Tyrosin	60,0 (51,5-67,7)	49,9 (40,2-65,1)	0,037
Glycerophospholipide	lyso PC a C26:0	0,18 (0,15-0,37)	0,12 (0,06-0,23)	0,017
	lyso PC a C26:1	0,12 (0,10-0,24)	0,08 (0,03-0,14)	0,022
	lyso PC a C28:0	0,18 (0,15-0,30)	0,13 (0,07-0,20)	0,013
	PC aa C24:0	0,08 (0,07-0,13)	0,05 (0,04-0,10)	0,019
	PC aa C32:0	14,4 (13,4-16,0)	16,9 (15,1-20,6)	0,036
	PC ae C36:4	12,4 (11,3-14,3)	15,8 (12,6-17,4)	0,042

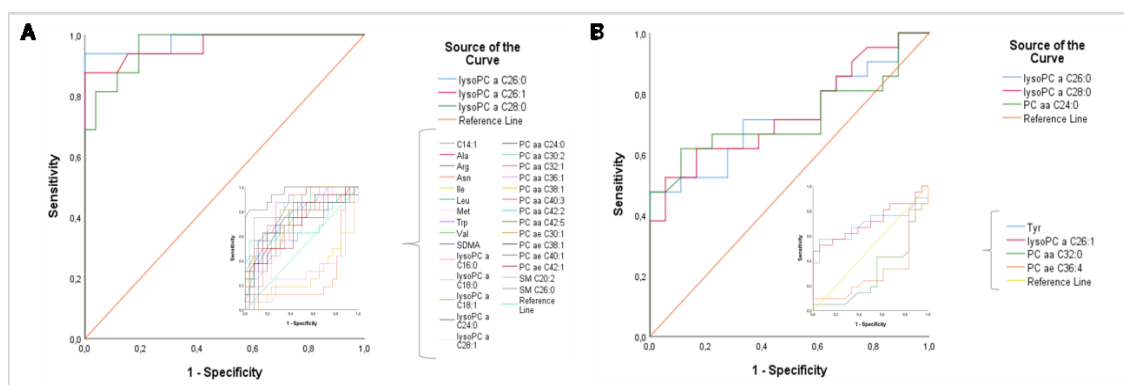


**Abbildung 21**

**Signifikant unterschiedliche Metabolitkonzentrationen bei Cortisol-produzierenden ACAs und ACCs.**

Log-2-transformierte Boxplots der per LC-MS/MS quantifizierten absoluten Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ] der 7 Metaboliten mit signifikanten Unterschieden bei Patient\*innen mit nicht-Aldosteron-produzierenden ACA (jew. hellere Farbnuance) und ACC (jew. dunklere Farbnuance). Signifikanz wurde bei  $P < 0,05$  angenommen. Pfeile geben im Folgenden für ACC eine signifikant erhöhte (↑) bzw. erniedrigte (↓) Konzentration im Vergleich zu ACA an. (Lyso-) Phosphatidylcholine in gelb/orange, Aminosäuren in grün. **(A)** Signifikant unterschiedliche Konzentrationen der 6 Glycerophospholipide lyso PC a C26:0 ↓, lyso PC a C 26:1 ↓, lyso PC a C28:0 ↓, PC aa C24:0 ↓, PC aa C32:0 ↑, PC ae C 36:4 ↑. **(B)** Signifikant niedrigere Konzentration der Aminosäure Tyrosin (Tyr) ↓ in ACC. Eigene Darstellung.

Die AUC-Werte für die Gruppe der hormoninaktiven adrenalen Tumore waren im Vergleich zu denen der Gesamtgruppe besser. Lyso PC a C28:0 und lyso PC a C26:1 erreichten AUC-Werte von 0,96 und 0,97. Für lyso PC a C26:0 konnte sogar ein AUC-Wert von 0,98 erreicht werden. Für die Gruppe der Cortisol-produzierenden Tumore lagen die höchsten AUC-Werte bei 0,73 für lyso PC a C28:0 und lyso PC a C26:0 und 0,72 für PC aa C24:0 (Abbildung 22). Die AUC-Werte der einzelnen Metaboliten können in Tabelle 26 im Anhang nachvollzogen werden. An dieser Stelle seien nur die höchsten Werte genannt.



**Abbildung 22**

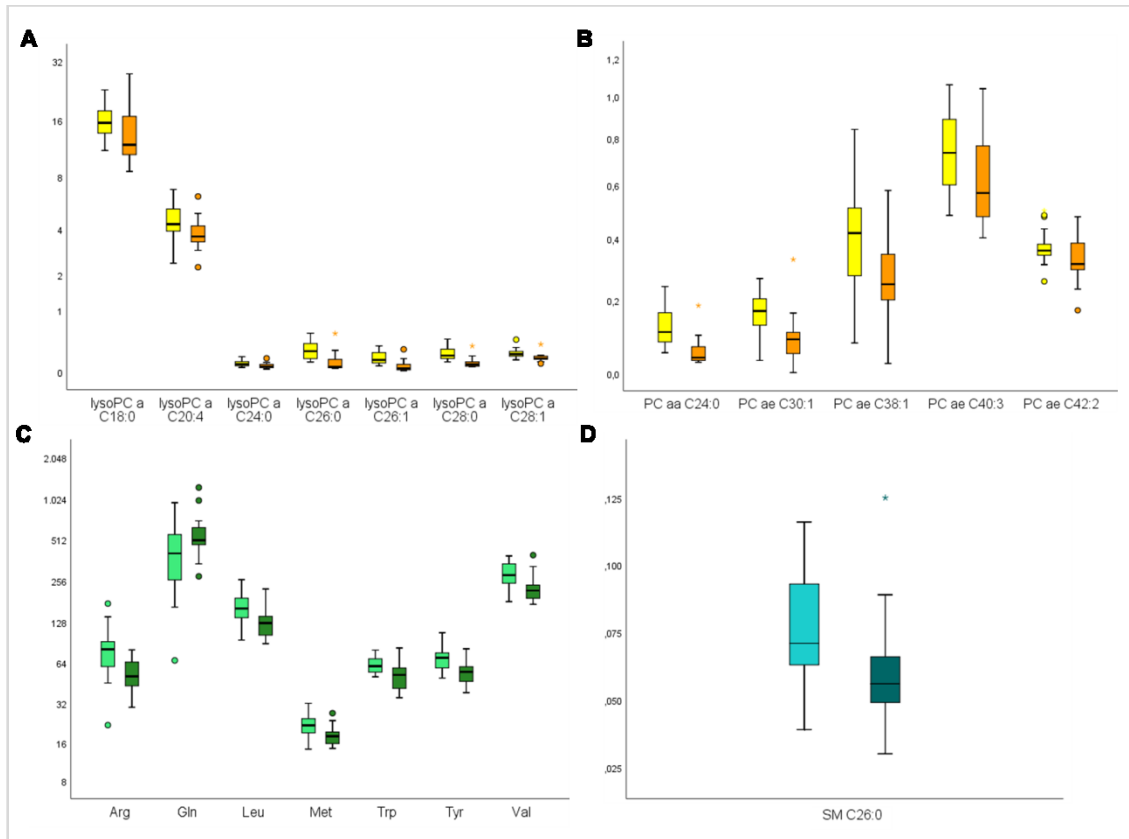
**Diagnostische Aussagekraft einzelner Metaboliten**

(A) ROC Kurven der im Mann Whitney U-Test signifikanten Metaboliten in der Gruppe der inaktiven Tumore. Die ROC Kurven der drei Metaboliten mit besten AUC-Werten sind groß dargestellt. Maximaler AUC-Wert von 0,98 für lyso PC a C26:0. (B) ROC Kurven der im Mann Whitney U-Test signifikanten Metaboliten in der Gruppe der Cortisol-produzierenden Tumore. Die ROC Kurven der drei Metaboliten mit besten AUC-Werten sind groß dargestellt. Maximaler AUC-Wert von 0,73 für lyso PC a C28:0. Das Inlay zeigt jeweils die ROC Kurven der restlichen signifikanten Metaboliten. Eigene Darstellung.

Analog des Vorgehens in der Steroidhormonanalyse, wurden auch die Daten der Metabolomics-Studie geschlechtsspezifisch untersucht. Die medianen Metabolitkonzentrationen des Vergleichs der Männergruppen sind in Tabelle 15 abzulesen. Hierbei zeigten sich für die Gruppe der männlichen Patienten (Abbildung 23) signifikante Unterschiede in den Konzentrationen der sieben Aminosäuren Arginin, Glutamin, Leucin, Methionin, Tryptophan, Tyrosin und Valin, wobei alle Konzentrationen bis auf die von Glutamin in der Karzinomgruppe signifikant niedriger lagen. Signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe zeigten sich auch alle zwölf Glycerophosphlipide lyso PC a C18:0, lyso PC a C20:4, lyso PC a C24:0, lyso PC a C26:0, lyso PC a C26:1, lyso PC a C28:0, lyso PC a C28:1, PC aa C24:0, PC ae C30:1, PC ae C38:1, PC ae C40:3, PC ae C42:2 und das Sphingolipid SM C26:0.

**Tabelle 15 Metaboliten mit signifikant unterschiedlichen Plasmakonzentrationen des Vergleichs der Männergruppen.** Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ] als Median und IQR dargestellt. Eigene Darstellung.

<b>Metaboliten mit signifikant unterschiedlichen Plasmakonzentrationen (Median (IQR) [<math>\mu\text{M}</math>]) in den Männergruppen</b>				
		<b>ACA</b>	<b>ACC</b>	<b>p-Wert</b>
Aminosäuren	Arginin	80,7 (57,7-94,8)	50,9 (41,9-65,1)	0,002
	Glutamin	408,0 (251,0-565,5)	509,0 (468,0-642,0)	0,038
	Leucin	161,0 (135,0-195,5)	126,0 (101,0-142,0)	0,043
	Methionin	21,8 (18,8-24,7)	18,0 (15,0-20,1)	0,028
	Tryptophan	60,6 (53,8-68,6)	52,2 (41,1-58,8)	0,012
	Tyrosin	79,9 (57,0-78,9)	55,0 (46,2-61,2)	0,005
	Valin	283,0 (246,5-342,5)	218,0 (189,0-249,0)	0,006
Glycerophospholipide	lyso PC a C18:0	15,5 (13,5-18,0)	11,9 (10,5-17,0)	0,019
	lyso PC a C20:4	4,3 (3,8-5,3)	3,6 (3,2-4,5)	0,021
	lyso PC a C24:0	0,10 (0,08-0,14)	0,07 (0,06-0,10)	0,013
	lyso PC a C26:0	0,27 (0,16-0,39)	0,06 (0,05-0,16)	<0,001
	lyso PC a C26:1	0,15 (0,11-0,26)	0,05 (0,03-0,10)	<0,001
	lyso PC a C28:0	0,21 (0,17-0,30)	0,09 (0,07-0,14)	<0,001
	lyso PC a C28:1	0,23 (0,19-0,27)	0,17 (0,16-0,20)	0,004
	PC aa C24:0	0,11 (0,08-0,17)	0,04 (0,03-0,07)	<0,001
	PC ae C30:1	0,17 (0,13-0,21)	0,09 (0,04-0,11)	0,001
	PC ae C38:1	0,42 (0,26-0,53)	0,25 (0,20-0,37)	0,038
	PC ae C40:3	0,74 (0,59-0,89)	0,57 (0,48-0,81)	0,033
	PC ae C42:2	0,36 (0,34-0,39)	0,32 (0,30-0,42)	0,036
Sphingolipide	SM C26:0	0,07 (0,06-0,09)	0,06 (0,04-0,07)	0,010



**Abbildung 23**

**Signifikant unterschiedliche Metabolitkonzentrationen im Vergleich der Männergruppen von ACA und ACC**

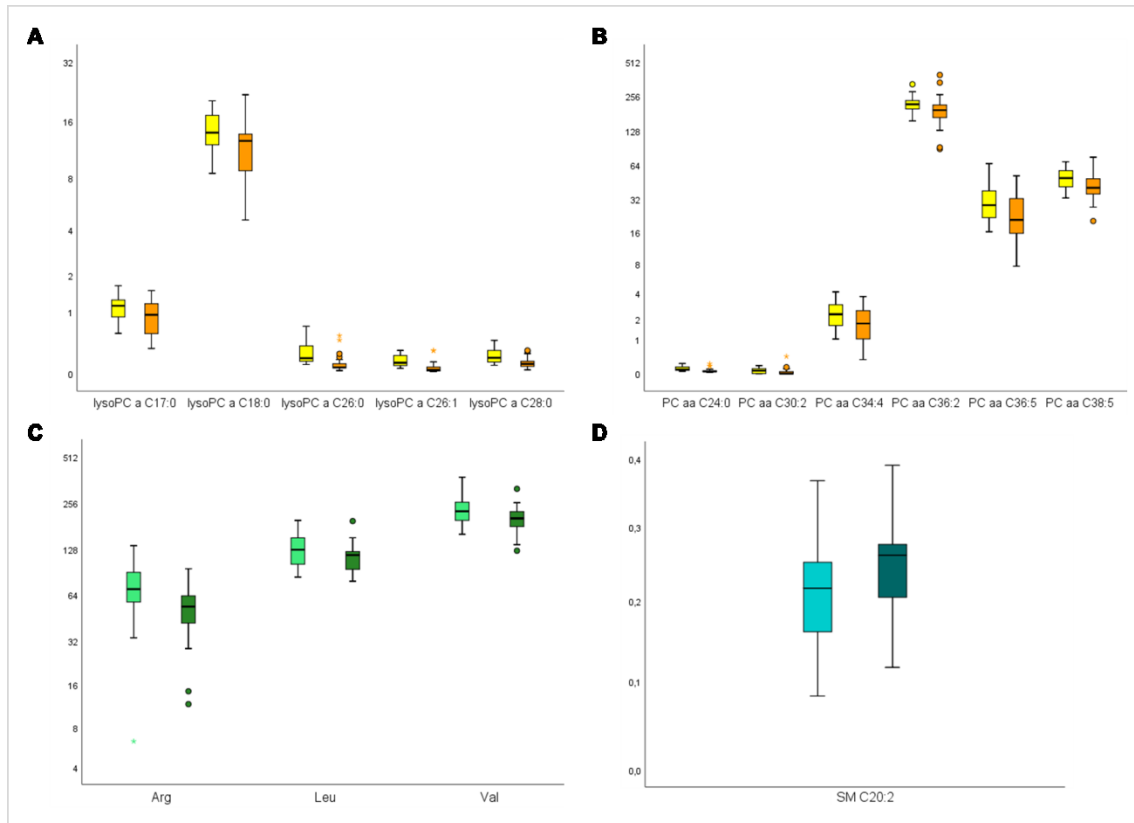
Log-2-transformierte Boxplots der per LC-MS/MS quantifizierten absoluten Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ] der 20 Metaboliten mit signifikanten Unterschieden bei Patienten mit nicht-Aldosteron-produzierenden ACA (jew. hellere Farbnuance) und ACC (jew. dunklere Farbnuance). Signifikanz wurde bei  $P < 0,05$  angenommen. Pfeile geben im Folgenden für ACC eine signifikant erhöhte ( $\uparrow$ ) bzw. erniedrigte ( $\downarrow$ ) Konzentration im Vergleich zu ACA an. (Lyso-)Phosphatidylcholone in gelb/orange, Aminosäuren in grün, Sphingolipide in blau. **(A)** Signifikant niedrigere Konzentrationen der sieben Lyso-Phosphatidylcholone lyso PC a C18:0, lyso PC a C20:4, lyso PC a C24:0, lyso PC a C26:0, lyso PC a C26:1, lyso PC a C28:0, lyso PC a C28:1 (alle  $\downarrow$ ) in ACC. **(B)** Signifikant niedrigere Konzentrationen der fünf Phosphatidylcholone PC aa C24:0, PC ae C30:1, PC ae C38:1, PC ae C40:3, PC ae C42:2 (alle  $\downarrow$ ) in ACC. **(C)** Signifikant unterschiedliche Konzentrationen der sieben Aminosäuren Arginin (Arg)  $\downarrow$ , Glutamin (Gln)  $\uparrow$ , Leucin (Leu)  $\downarrow$ , Methionin (Met)  $\downarrow$ , Tryptophan (Trp)  $\downarrow$ , Tyrosin (Tyr)  $\downarrow$  und Valin (Val)  $\downarrow$ . **(D)** Signifikant niedrigere Konzentration des Sphingolipids SM C26:0  $\downarrow$  in ACC. Eigene Darstellung.

Die medianen Metabolitkonzentrationen des Vergleichs der Frauengruppen sind in Tabelle 16 abzulesen. In der Gruppe der weiblichen Patientinnen (Abbildung 24) konnten für die Konzentrationen der drei Aminosäuren Arginin, Leucin und Valin signifikant niedrigere Konzentrationen in der Gruppe der Karzinome festgestellt werden. Genauso verhielt es sich auch bei den elf Glycerophospholipidkonzentrationen von lyso PC a C17:0, lyso PC a C18:0, lyso PC a C26:0, lyso PC a C26:1, lyso PC a C28:0, PC aa C24:0, PC aa C30:2, PC aa C34:4, PC aa C36:2, PC aa C36:5 und PC

aa C38:5. Im Falle des Sphingolipids SM C20:2 war die Konzentration in der Karzinom-signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

**Tabelle 16 Metaboliten mit signifikant unterschiedlichen Plasmakonzentrationen des Vergleichs der Frauengruppen.** Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ] als Median und IQR dargestellt. Eigene Darstellung.

<b>Metaboliten mit signifikant unterschiedlichen Plasmakonzentrationen (Median (IQR) [<math>\mu\text{M}</math>]) in den Frauengruppen</b>				
		<b>ACA</b>	<b>ACC</b>	<b>p-Wert</b>
Aminosäuren	Arginin	70,1 (54,3-94,8)	53,8 (41,2-65,6)	0,009
	Leucin	127,0 (100,0-163,0)	117,0 (90,0-125,0)	0,040
	Valin	226,0 (193,0-260,0)	203,0 (177,0-227,0)	0,039
Glycerophospholipide	lyso PC a C17:0	1,14 (0,79-1,29)	0,94 (0,56-1,24)	0,046
	lyso PC a C18:0	13,9 (12,0-17,2)	12,6 (8,7-13,8)	0,023
	lyso PC a C26:0	0,19 (0,15-0,39)	0,07 (0,07-0,12)	<0,001
	lyso PC a C26:1	0,13 (0,09-0,23)	0,04 (0,03-0,08)	<0,001
	lyso PC a C28:0	0,20 (0,14-0,30)	0,12 (0,08-0,16)	<0,001
	PC aa C24:0	0,09 (0,07-0,16)	0,04 (0,04-0,06)	<0,001
	PC aa C30:2	0,06 (0,001-0,11)	0,001 (0,001-0,05)	0,003
	PC aa C34:4	2,28 (1,59-3,14)	1,73 (0,95-2,56)	0,049
	PC aa C36:2	218,0 (198,0-237,0)	194,0 (162,0-221,0)	0,044
	PC aa C36:5	28,1 (20,9-37,8)	20,7 (15,5-32,4)	0,028
	PC aa C38:5	49,0 (41,0-59,9)	40,2 (35,0-49,3)	0,031
Sphingolipide	SM C20:2	0,22 (0,14-0,26)	0,26 (0,20-0,28)	0,035

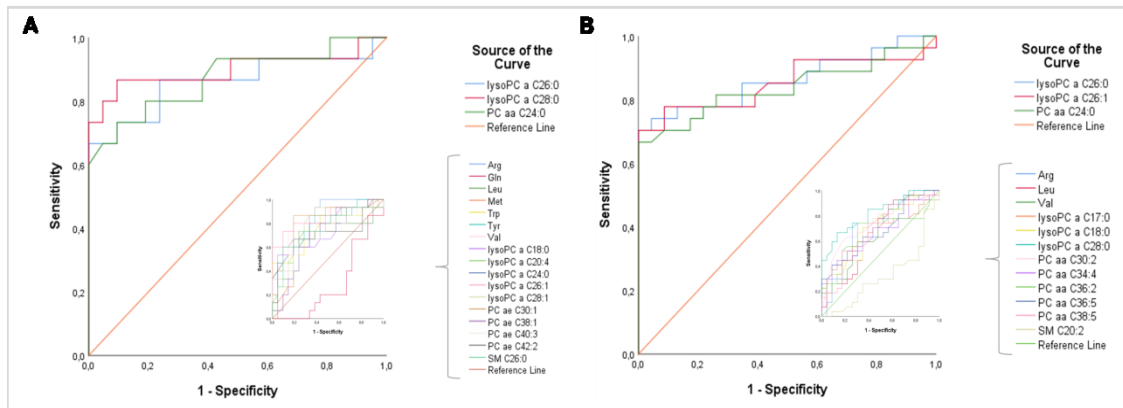


**Abbildung 24**

### Signifikant unterschiedliche Metabolitkonzentrationen im Vergleich der Frauengruppen von ACA und ACC

Log-2-transformierte Boxplots der per LC-MS/MS quantifizierten absoluten Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ] der 15 Metaboliten mit signifikanten Unterschieden bei Patientinnen mit nicht-Aldosteron-produzierenden ACA (jew. hellere Farbnuance) und ACC (jew. dunklere Farbnuance). Signifikanz wurde bei  $P < 0,05$  angenommen. Pfeile geben im Folgenden für ACC eine signifikant erhöhte ( $\uparrow$ ) bzw. erniedrigte ( $\downarrow$ ) Konzentration im Vergleich zu ACA an. (Lyso-)Phosphatidylcholine in gelb/orange, Aminosäuren in grün, Sphingolipide in blau. **(A)** Signifikant niedrigere Konzentrationen der fünf Lyso-PC a C17:0, lyso PC a C18:0, lyso PC a C26:0, lyso PC a C26:1, lyso PC a C28:0 (alle  $\downarrow$ ) in ACC. **(B)** Signifikant niedrigere Konzentrationen der sechs Phosphatidylcholine PC aa C24:0, PC aa C30:2, PC aa C34:4, PC aa C36:2, PC aa C36:5 und PC aa C38:5 (alle  $\downarrow$ ) in ACC. **(C)** Signifikant niedrigere Konzentrationen der drei Aminosäuren Arginin (Arg), Leucin (Leu) und Valin (Val) (alle  $\downarrow$ ) in ACC. **(D)** Signifikant höhere Konzentration des Sphingolipids SM C20:2  $\uparrow$  in ACC. Eigene Darstellung.

Für die ROC Kurven der Männergruppe konnten beste AUC-Werte von 0,86 und 0,87 für lyso PC a C26:0 und PC aa C24:0, sowie ein AUC-Wert von 0,9 für lyso PC a C28:0 erreicht werden. Auch in der Frauengruppe konnten mit 0,84 für PC aa C24:0, 0,85 für lyso PC a C26:1 und 0,86 für lyso PC a C26:0 ähnlich gute AUC-Werte gezeigt werden (Abbildung 25). Die AUC-Werte der einzelnen Metaboliten können in Tabelle 27 im Anhang nachvollzogen werden. An dieser Stelle seien nur die drei höchsten Werte genannt.



**Abbildung 25**

### Diagnostische Aussagekraft einzelner Metaboliten

**(A)** ROC Kurven der im Mann Whitney U-Test signifikanten Metaboliten in der Gruppe der Männer. Die ROC Kurven der drei Metaboliten mit besten AUC-Werten sind groß dargestellt. Maximaler AUC-Wert von 0,9 für lyso PC a C28:0. **(B)** ROC Kurven der im Mann Whitney U-Test signifikanten Metaboliten in der Gruppe der Frauen. Die ROC Kurven der drei Metaboliten mit besten AUC-Werten sind groß dargestellt. Maximaler AUC-Wert von 0,86 für lyso PC a C26:0. Das Inlay zeigt jeweils die ROC Kurven der restlichen signifikanten Metaboliten. Eigene Darstellung.

Unter den bis hierhin gezeigten Metaboliten, die in jedem Gruppenvergleich signifikant unterschiedliche Konzentrationen in der ACC-Gruppe verglichen mit den Kontrollen zeigten, konnten 27 Metaboliten ausgemacht werden, die in mindestens zwei der unterschiedlichen Gruppenvergleiche statistisch signifikant waren (siehe Tabelle 17), darunter acht Lysophosphatidylcholine, zehn Phosphatidylcholine, sieben Aminosäuren und zwei Sphingomyeline. Alle genannten Metaboliten zeigten in der ACC-Gruppe niedrigere Konzentrationen verglichen mit der Kontrollgruppe, nur die Konzentration von SM C20:2 war in der ACC-Gruppe höher.

Tabelle 17

**In mindestens zwei Gruppenvergleichen statistisch signifikant diskriminierende Metaboliten**

Tabellarische Darstellung derjenigen Metaboliten mit signifikanten Ergebnissen im Mann-Whitney-U-Test in  $\geq 2$  Gruppenvergleichen, sortiert nach Metabolitklassen und unter Angabe der jeweiligen P-Werte. Erhöhte Konzentrationen in der ACC-Gruppe im Vergleich mit der ACA-Gruppe in Rot-, erniedrigte Konzentrationen in Blautönen unterlegt. Je dunkler die Farbnuance, desto mehr Gruppenvergleiche fielen für denjenigen Metaboliten signifikant aus. Eigene Darstellung.

Metabolit-klasse	Metabolit	Gesamt (P-Wert)	Inaktiv (P-Wert)	Cortisol (P-Wert)	Männer (P-Wert)	Frauen (P-Wert)
<b>Glycerophospholipide</b>	Lyso PC a C16:0 ↓	0,045	0,033			
	Lyso PC a C18:0 ↓	0,001	0,030		0,019	0,023
	Lyso PC a C20:4 ↓	0,011			0,021	
	Lyso PC a C24:0 ↓	0,001	0,001		0,013	
	Lyso PC a C26:0 ↓	<0,001	<0,001	0,017	<0,001	<0,001
	Lyso PC a C26:1 ↓	<0,001	<0,001	0,022	<0,001	<0,001
	Lyso PC a C28:0 ↓	<0,001	<0,001	0,013	<0,001	<0,001
	Lyso PC a C28:1 ↓	0,016	0,049		0,004	
	PC aa C24:0 ↓	<0,001	<0,001	0,019	<0,001	<0,001
	PC aa C30:2 ↓	0,001	0,001			0,003
	PC aa C36:5 ↓	0,026				0,028
	PC aa C40:3 ↓	0,040	0,017			
	PC aa C42:5 ↓	0,021	0,007			
	PC ae C30:1 ↓	0,001	0,001		0,001	
	PC ae C38:1 ↓	0,031	0,027		0,038	
	PC ae C40:1 ↓	0,014	0,015			
	PC ae C42:1 ↓	0,043	0,033			
	PC ae C42:2 ↓	0,049			0,036	
	<b>Aminosäuren</b>	Arginin ↓	0,001	0,003		0,002
Isoleucin ↓		0,007	0,035			
Leucin ↓		0,001	0,026		0,043	0,040
Methionin ↓		0,027	0,026		0,028	
Tryptophan ↓		0,002	0,003		0,012	
Tyrosin ↓		0,004	0,042	0,037	0,005	
Valin ↓		<0,001	0,014		0,006	0,039
<b>Sphingo-lipide</b>	SM C20:2 ↑	0,011	0,045			0,035
	SM C26:0 ↓	0,014	0,001		0,010	



### 3.2.3 Bioinformatische Modellierung

Um die diagnostische Trennschärfe zu verbessern, erfolgte in Kooperation mit dem bioinformatischen Institut der Universität Würzburg eine bioinformatische Modellierung, in deren Rahmen das regularisierte Regressionsverfahren LASSO angewendet wurde. Hiermit konnte das diagnostische Potenzial der Metabolit-Signaturen mit besten Werten für AUC, Accuracy, Sensitivität, Spezifität, positiv prädiktiven Wert (PPV) und negativ prädiktiven Wert (NPV) evaluiert werden. Dabei sollten die Signaturen mit größtmöglichem Informationsgehalt zur diagnostischen Diskriminierung zwischen den ACC-Patient\*innen und ihren Kontrollen bei geringstmöglicher Anzahl an Metaboliten ermittelt werden.

Für die Untersuchung der Gesamtgruppe ergab sich bei der LASSO-Regression eine Metabolit-Signatur, die 26 Metaboliten beinhaltet und bei der Vorhersage der zur Erstellung der Signatur verwendeten Proben mit einem AUC von 0,989 gutes Diskriminierungspotenzial zeigte (Abbildung 26).

Vorhersage	Diagnose		C3	lysoPC a C28:0
	Adenom (0)	Carcinom (1)		
Adenom (0)	42	1	C14.1	PC aa C36:5
Carcinom (1)	2	41	Arg	PC aa C38:4
	44	42	Asn	PC aa C38:5
			Glu	PC ae C32:1
			Gly	PC ae C34:1
			Orn	PC ae C38:1
			Ser	PC ae C42:2
Sensitivität:	0,976	PPV:	Val	SM OH C22:2
Spezifität:	0,955	NPV:	Creatinine	SM C16:0
			Kynurenine	SM C20:2
			Sarcosine	SM C24:1
Accuracy	0,965		H1	SM C26:0

**Abbildung 26**

#### **26-Metabolit Signatur der Gesamtgruppe**

Gezeigt ist die Metabolit-Signatur des Vergleichs der ACC-Gesamtgruppe mit den Kontrollen, die anhand des Regularisierungsverfahrens LASSO berechnet wurde, sowie die Werte der Vorhersage, Accuracy, Sensitivität, Spezifität, PPV und NPV. Eigene Darstellung.

Das gezeigte Ergebnis der bioinformatischen Modellierung soll als erster gemeinsamer Schritt bei der Suche nach diagnostisch geeigneten Modellen verstanden werden. Zu diesem Zeitpunkt sind weitere bioinformatische Modellierungen geplant, die im Rahmen einer Validierungsstudie an einer anderen Kohorte Steroidhormon- und Metabolitdaten miteinbeziehen.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Limitationen der Studie

Die vorliegende Studie unterliegt einigen Limitationen. Zwar ist sie eine der bisher größten (n=108 und n=86) zur Untersuchung von diagnostischen Plasma-Steroid- bzw. Metabolitprofilen in ACCs und ACAs, jedoch sind die einzelnen Untergruppen immer noch relativ klein. Vor allem betrifft dies die männliche Gruppe der ACC-Patient\*innen mit nur 15 Proben. Dennoch ist die Stichprobe relativ reich an ACC-Proben, was den klinischen Alltag, in dem benigne Befunde überwiegen [98], nicht gut abbildet. Dies resultiert aus der Probenrekrutierung in einem tertiären Referenzzentrum für Nebennierentumoren. Ebenso führt auch die Selektion von ausschließlich nicht-Aldosteron-produzierenden Adenomen zu einer Stichprobenbias, da somit nicht das gesamte Spektrum der Adenome miteinbezogen wird. Dementsprechend muss vor Anwendung des hier gezeigten Modells ein primärer Hyperaldosteronismus ausgeschlossen worden sein. Dies scheint jedoch angesichts der hohen Detektionsrate Aldosteron-produzierender Nebennierentumore im Zuge der Hypertonieabklärung gerechtfertigt zu sein [66]. Aldosteron-produzierende ACCs sind sehr selten [98] und meist besteht zusätzlich eine Sekretion anderer Steroidhormone, was sich auch in dieser Studie zeigt (Tabellen 8 und 10). In die Studie wurden auch Patient\*innen mit Tumoren im ENSAT Stadium IV eingeschlossen. Diese Tumoren treten oftmals klinisch mit schwerwiegenderen Stoffwechselveränderungen in Erscheinung [98], was sich wahrscheinlich auch durch die in diesem Stadium bestehende große Tumormasse erklären lässt [18]. Auch in den Studien von Taylor *et al.* [48], Arlt *et al.* [46] und Kerkhofs *et al.* [99] ist dieses Phänomen anzutreffen. Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit der Parameter der Tumorgroße und dessen potentielle Auswirkung auf die Steroidhormonproduktion bei den statistischen Tests nicht miteinbezogen. Dass jedoch die Berücksichtigung der Tumorgroße in Kombination mit weiteren bildgebenden Kriterien (> 20 HU im CT) und Steroidhormonanalysen den Nachweis von ACC verbessert, zeigte eine Studie von Bancos und Taylor *et al.* [47]. An dieser Stelle sei darauf verwiesen, dass es sich bei der vorliegenden Arbeit um eine retrospektive Studie handelt, bei der keine standardisierte Probenentnahme erfolgte. Dies kann jedoch auch als ein Vorteil angesehen werden, da dieses Vorgehen den klinischen Ablauf besser widerspiegelt und somit die Anwendbarkeit in der täglichen Routine berücksichtigt.

#### **4.2 LC-MS/MS als Methode zur Analyse von Metabolit- und Hormonprofilen**

Mit der zunehmenden Standardisierung, der Verfügbarkeit kommerzieller Kalibratoren und Kontrollmaterialien und Verbesserung der LC-MS/MS Instrumente, findet die Massenspektrometrie immer mehr Einzug in die klinische Routinediagnostik [56]. Inzwischen wurden kommerziell erhältliche Kits entwickelt, die die Analyse eines großen Spektrums verschiedener Analyte zulassen, ohne dass jeweils analytisches Spezialwissen am Ort der Analyse verfügbar sein muss [56]. Die Kombination der Massenspektrometrie mit der Flüssigchromatographie bietet die Möglichkeit, mit sehr kleinen Probenmengen [70] und geringem Zeitaufwand [54] mit hoher analytischer Selektivität und Empfindlichkeit [55] eine große Anzahl niedermolekularer Analyte zu quantifizieren [56]. Spricht man von klinischer Anwendbarkeit im Routinesetting, müssen sicherlich auch die entstehenden Kosten beachtet werden. Diese zeigen eine sinkende Tendenz und belaufen sich bei der Anschaffung der Hardware auf ca. 200 000 bis 300 000 € [56, 67]. Im Vergleich zu Immunoassays ergeben sich bei einem jährlichen Durchsatz von 10 000 Tests jedoch geringere Ausgaben für Verbrauchsmaterialien [54, 56]. Studien zum diagnostischen Einsatz der LC-MS/MS in der Endokrinologie wurden beispielsweise bereits zur frühen Diagnose des Typ 2 Diabetes Mellitus durchgeführt [100] und eignen sich besonders zur Diagnostik von Störungen der Hypothalamus-Hypophysen-Achse [56]. Durch die Möglichkeit ein großes Spektrum an Analyten in einer Probe zu messen, rückt die LC-MS/MS gerade bei komplexen endokrinen Fragestellungen immer mehr in das Blickfeld [101]. Gleichzeitig müssen jedoch auch die Fehlerquellen, die bei der Anwendung einer LC-MS/MS-basierten Methode auftreten können, berücksichtigt werden.

Hierzu zählen unter anderem Matrixeffekte, also die Summe aller Einflüsse der die LC-Säule durchlaufenden Komponenten – also Lösungsmittel und Probenmaterial – auf den Ionisationsprozess an der Quelle des Massenspektrometers [102-104]. Matrixeffekte sind abhängig von der Güte der Probenaufreinigung und ihrer chromatographischen Auftrennung [56] und werden durch das Ionisationsverfahren beeinflusst [104]. Interlaborunterschiede können durch die Anwendung verschiedener Protokolle, aber auch durch die Verwendung verschiedener Ionisationsverfahren [56] oder interner Standards entstehen, die entscheidende Auswirkung auf die Messwerte haben können [105]. Sind konjugierte Metaboliten (z.B. Glucuronid-konjugiert) eines Zielanalyten Bestandteil der Probe, kann es im Zuge der Ionisation an der Quelle zur sogenannten „insource transformation“ [104] kommen, wenn der Zielanalyt mit seinem konjugierten Metaboliten koeluiert und beide gleichzeitig quantifiziert werden, so dass

die erzeugten Moleküle fälschlicherweise als Fragmente des Zielmetaboliten detektiert werden [104]. Dem kann durch Anpassung der Ionisationsbedingungen und chromatographischen Trennung zugunsten des nichtkonjugierten Analyten begegnet werden [104]. Eine weitere Quelle für Unrichtigkeit der Messung ist die Interferenz durch isobare Analyte [104]. Bei diesen Bestandteilen handelt es sich entweder um Stoffe selber molekularer Masse oder um strukturelle Isomere des eigentlichen Analyten [104]. Hierdurch provozierte Unrichtigkeiten treten jedoch bei Verwendung eines Tandem-Massenspektrometers (LC-MS/MS) aufgrund der zweimaligen Filterung entsprechend der spezifischen Masse des Mutter- und Tochterions deutlich seltener auf als bei der einstufigen Massenspektrometrie (LC-MS) [104]. Wie bei jeder anderen Methode kann es speziell bei der wenig automatisierten LC-MS/MS zu Messfehlern aufgrund von menschlichen Bedienungsfehlern durch ungenaues Pipettieren, Beschriftungsfehler, Kontamination, falscher Positionierung im Autosampler oder ungenauer Peak-Integration kommen [104]. Zudem kann es zum Übertrag von Probenmaterial zwischen Probenläufen kommen, so dass eine falsch hohe Konzentration im Folgelauf gemessen wird [104, 106].

### **4.3 Steroidhormon-Massenspektrometrie**

#### **4.3.1 LC-MS/MS in der Steroidhormonanalyse**

Komplementär zu der in der vorliegenden Arbeit angewandten flüssigchromatographischen Massenspektrometrie, gilt auch die gaschromatographische massenspektrometrische (GC-MS) Analyse von Steroidhormonen in Urinproben als wegweisend bei der Diagnose von Störungen der Steroidhormonsynthese [46]. Sie erlaubt nicht nur die Diagnose der kongenitalen Nebennierenhyperplasie (adrenogenitales Syndrom, AGS) [107-110], sondern auch des P450-Oxidoreduktasemangels [110, 111] und wurde zur Differentialdiagnose von benignen und malignen Nebennierenraumforderungen [46, 99, 112, 113] erfolgreich angewandt. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass die Analyse von Steroidhormonen im Plasma ebenso diagnostisches Potenzial aufweist. Das Probenmaterial Plasma ist minimalinvasiv leicht zu gewinnen [57] und macht das Sammeln des Urins seitens der Patient\*innen unnötig. Zwar enthält der 24-h-Sammelurin die wertvolle Information über die hormonelle Tagesrhythmik [5], dennoch ist gerade für die Patient\*innen das Sammeln des Urins über 24 Stunden mitunter unangenehm [114] und führt somit im schlimmsten Fall zu Sammelfehlern [115], die folglich zu fehlerhaften Steroidhormonbestimmungen führen. Zur Überprüfung der

Vollständigkeit der Urinsammlung wird häufig die Messung des Kreatinins im Urin zur Normalisierung herangezogen [116, 117].

Die LC-MS/MS spielt in der endokrinologischen Labordiagnostik im Vergleich zur Gaschromatographie eine immer größere Rolle [54]. Die LC-MS/MS erlaubt eine schnellere Analyse und umgeht Einschränkungen, die mit der Gaschromatographie und Immunoassays einhergehen [54, 56]. So erübrigt sich beispielsweise der zeitintensive Schritt der Derivatisierung und anti-Reagent-Antikörper-vermittelte Interferenzen treten nicht auf [118]. Für spezifische klinische Fragestellungen wird die GC-MS jedoch weiterhin von Nutzen sein [111]. Mit der für die vorliegende Arbeit verwendeten LC-MS/MS-Methode konnten 15 Steroide mit hoher Spezifität in kurzer Zeit (22 Minuten) quantifiziert werden. Somit wird die Implementierung dieser Methode in die Routine-Patient\*innenversorgung möglich und lässt an die standardmäßige Verwendung von Steroidhormonprofilen bei der Differentialdiagnose von Nebennierentumoren denken.

#### **4.3.2 Diskussion der Steroidhormonanalyse**

Teile der Diskussion der Steroidhormonanalyse wurden von der Promovendin bereits in [80] publiziert. Durch den Einschluss von 108 Patient\*innen in die vorliegende Untersuchung, konnte eine, im Vergleich zu anderen Studien, relativ große Stichprobenzahl erreicht werden. Dass sich in der Karzinomgruppe mehr weibliche Patientinnen finden, spiegelt die geschlechtsspezifische Prävalenz der Erkrankung wieder, der zufolge Frauen ca. 1,5-fach häufiger am ACC erkranken [119]. Die auffallende Heterogenität des Sekretionsstatus der Karzinomgruppe überrascht angesichts der bekanntermaßen sehr vielfältigen klinischen Präsentation von Nebennierenkarzinomen wenig [22]. Der Vergleich der Gesamtgruppen ergab erhöhte Konzentrationen von Steroidvorläuferhormonen, Sexualhormonen (darunter auch DHEAS und Estradiol), sowie Mineralocorticoiden in der Karzinomgruppe. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Annahme einer gestörten Steroidogenese bei ACC, die sich in erhöhten Konzentrationen von Vorläuferhormonen präsentiert [46]. Gleichsam gilt eine erhöhte Östrogen-Konzentration in männlichen Patienten, sowie - unabhängig vom Geschlecht - erhöhte DHEAS-Konzentrationen in Patient\*innen mit Nebennierentumoren als hinweisend für ein ACC [22]. Die Annahme, dass auch Karzinome, die zuvor in die Gruppe der hormoninaktiven ACC eingeteilt wurden, letztendlich doch erhöhte Konzentrationen an Vorläuferhormonen aufweisen [22], konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Um geschlechtsspezifische Einflüsse aufzuzeigen, wurden die Steroidprofile zudem einzeln für beide Geschlechter

analysiert. Dass sich hierbei für den Vergleich der Männergruppen weniger signifikante Ergebnisse zeigten, kann auf die zu geringe Stichprobenanzahl (15 ACCs) zurückzuführen sein. Dennoch bestätigten sich in beiden geschlechtsspezifischen Untersuchungen signifikant erhöhte Konzentrationen von 11-Deoxycorticosteron, Progesteron und Estradiol bei ACC. Zu diesem Ergebnis führte auch die Untersuchung der Gesamtgruppe, sowie der hormoninaktiven und Cortisol-produzierenden Gruppe. Die genannten drei Steroidhormone scheinen also für die Unterscheidung von ACA und ACC eine entscheidende Rolle zu spielen. Vergleichbar mit den Ergebnissen von GC-MS-Studien in 24-Stunden-Sammelurin [46, 99, 112, 113], zeigten sich auch in der vorliegenden Arbeit erhöhte Konzentrationen von Steroidhormonvorläufern und Androgenen in ACCs im Vergleich zu ACAs sowohl bei den endokrin inaktiven, als auch bei den hormonproduzierenden Tumoren. Diese Beschreibung ist kongruent mit der anerkannten Auffassung, dass ACCs über eine dedifferenzierte, unvollständige steroidogene Enzymexpression eine ineffiziente Steroidogenese besitzen und somit ein relativ größerer Anteil an Vorläuferhormonen auf unterschiedlichen Ebenen der Steroidogenese entsteht [46, 112, 113, 120-122]. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass sich die Steroidhormonprofile zwischen den Erkrankungen überschneiden können. Dies hat sich in den Ergebnissen der Steroidhormon-Einzelanalysen der vorliegenden Arbeit gezeigt. Eine eindeutige Einteilung in die unterschiedlichen Krankheitsentitäten scheint also nicht so einfach möglich [123]. Die Betrachtung nur einzelner Steroidhormone erwies sich als von geringem diagnostischem Wert, sodass in der vorliegenden Arbeit ähnlich der Studie von Arlt *et al.* [46] die in den gewonnenen Steroidhormonprofilen enthaltenen Muster mittels bioinformatischer Modelle für die Diagnose genutzt wurden. Als Maß für die diagnostische Trennschärfe des Modells fanden sich geschlechtsspezifische AUC-Werte der sechs-Steroid-Modelle von 0,95 (m) und 0,94, die damit im Bereich der AUC von 0,96 des von Arlt *et al.* [46] vorgeschlagenen neun-Steroid-Modells im 24-Stunden-Sammelurin lagen. Eine Erweiterung des Modells mit der Erfassung aller 15 Steroide ergab keine wesentliche Verbesserung der diagnostischen Aussagekraft (Abbildung 17), denn hierbei konnten zwar die AUC-Werte verbessert werden, zugleich ergaben sich aber auch höhere Werte für AIC, was eine schlechtere Beschreibung des Datensatzes durch dieses Modell bedeutet. Möglicherweise lässt sich dies auf den größeren Anteil an fortgeschrittenen Tumoren (80%) in der Studie von Arlt *et al.* [46] zurückführen, der eine stärkere Veränderung der Steroid- und Vorläuferhormone zur Folge haben könnte. Zugleich wurde in dieser Studie eine größere Anzahl an ACA Proben analysiert,

sodass derzeit noch keine sichere Aussage über die optimale Methode getroffen werden kann.

In der Studie von Taylor *et al.* [48] wurde bereits eine LC-MS basierte Methode zur Quantifizierung von 13 Steroidhormonen im Serum von Patient\*innen mit unterschiedlichen Nebennierentumoren verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Steroide der Studie von Taylor *et al.* [48] bis auf 17-Hydroxypregnenolon ebenfalls quantifiziert. Jedoch studierten Taylor *et al.* [48] eine deutlich kleinere Kohorte (n=48) adrenaler Tumore und schlossen in ihre Studie außer zehn ACCs auch Phäochromozytome/Paragangliome in ihre Analyse mit ein. Auch sie beschrieben erhöhte Konzentrationen von Androstendion, 11-Deoxycortisol, 11-Deoxycorticosteron, DHEAS und 17-Hydroxyprogesteron in ACCs, was sich mit den Befunden der vorliegenden Arbeit deckt. Bis auf Androstendion konnten alle genannten Steroidhormone auch in der vorliegenden Analyse im geschlechtsneutralen Vergleich als signifikant höher in ACCs beobachtet werden. Dass auch Androstendion erheblichen diagnostischen Wert hat, zeigt sich in den vorliegenden bioinformatischen Modellierungen, wonach Androstendion in beiden Geschlechtsgruppen Eingang in die diagnostische Steroidsignatur gefunden hat. Taylor *et al.* [48] nutzten keine bioinformatischen Modelle zur Identifizierung von Marker-Signaturen für die Differentialdiagnose der Nebennierentumoren, sodass hier kein Vergleich erfolgen kann.

Angesichts der vorliegenden Arbeit und der Studien von Arlt *et al.* [46] und Taylor *et al.* [48] zeigt sich, dass Steroidhormonprofile – ob aus Plasma-, Serum- oder Urinproben – in Kombination mit rechnergestützter Modellberechnung diagnostisch sehr wertvoll sein können. In dieser Arbeit konnten zwei geschlechtsspezifische Steroidsignaturen berechnet werden, die sich jedoch nur in zwei Steroidhormonen überlappen (DHEA und Androstendion). Dies ist ein Hinweis auf die Limitierungen, die mit der relativ geringen Stichprobenanzahl v.a. in der Untergruppe der männlichen ACC-Patient\*innen einhergehen (siehe auch Limitierungen in Kapitel 4.1).

Um anderen Zugang zu dem Modell zu geben und es ggf. weiterzuentwickeln, wurde das hier gezeigte logistische Regressionsmodell online unter <https://doi.org/10.17605/OSF.IO/8YGNK> der Gemeinschaft zur Verfügung gestellt. Das in dieser Arbeit verwendete LC-MS/MS basierte Modell, das auf einer Kombination von Steroidhormonmessungen und rechnergestützter Signaturberechnung fußt, hat eine verlässliche diagnostische Signatur zur Diagnosestellung von ACCs hervorgebracht. Nichtsdestotrotz ist es Standard, diagnostische Methoden zunächst an externen

Kohorten oder prospektiv zu validieren. Retrospektive Studien können das Krankheitsspektrum nicht vollständig abbilden. Die geringe Inzidenz der ACCs [18] verursacht jedoch das Problem, mit angemessener Stichprobenzahl neue diagnostische Methoden zu entwickeln. Im Hinblick auf die zunehmend verbreitete Verfügbarkeit von LC-MS/MS Instrumenten [56] und dem relativ leichten Zugang zu Blutproben [57] im klinischen Setting, kann die hier entwickelte Steroidhormonsignatur bei der Diagnose von Nebennierentumoren zukünftig sehr hilfreich sein.

#### **4.4 Metabolomics in der Differentialdiagnose von Nebennierentumoren**

Ergänzend zu den Steroidpanel-Untersuchungen sollte in dieser Arbeit untersucht werden, inwiefern die massenspektrometrische Quantifizierung von Metaboliten in humanem Plasma zur Differentialdiagnose von Patient\*innen mit ACC und ACA beitragen kann. Im Rahmen der Untersuchungen fanden sich eindeutige Hinweise, dass das metabolische Profil in Proben von Patient\*innen mit ACC gestört ist, was die zirkulierenden Aminosäuren, biogenen Amine, Glycerophospholipide und Sphingolipide angeht. Für diese Metabolitklassen zeigten sich signifikant unterschiedliche Konzentrationen zwischen der ACC- und Kontrollgruppe, die auch diagnostisch prädiktiven Wert aufwies. Durch die Kombination mehrerer Metaboliten konnten die ACC- von der ACA-Kontrollgruppe mit einer Sensitivität von 0,98 und einer Spezifität von 0,96 unterschieden werden.

##### **4.4.1 LC-MS/MS und Metabolomics**

Die hier verwendete Methode ermöglicht die Quantifizierung von 188 Metaboliten per LC-MS/MS, zu denen Acylcarnitine, Aminosäuren, Hexose, Glycerophospholipide, Sphingolipide und biogene Amine gehören [87]. Gerade für die Analyse niedermolekularer Analyte stellt die LC-MS/MS im Vergleich zum Immunoassay die Methode mit deutlich höherer Spezifität dar [124] und lässt die Durchführung mehrerer Multianalyt-Testungen pro Stunde zu, wenngleich die technischen Anforderungen höher sind [54]. Gleichzeitig ermöglicht die Matrix Plasma eine relativ einfache, wenig invasive Probengewinnung [57, 125] und ist damit ein geeignetes Probenmaterial im diagnostischen Setting [58]. Die Güte der LC-MS/MS wird nicht nur an der von Immunoassays gemessen, sondern muss auch gegen andere etablierte Verfahren bestehen. Zu ihnen gehört die im Vergleich zur LC-MS aufarbeitungsintensivere GC-MS [54], die in dieser Arbeit schon an anderer Stelle diskutiert wurde, sowie die konventionelle HPLC, die bei der Bestimmung biogener Amine und ihrer Metaboliten derzeit die Standardmethode darstellt [54]. Nichtsdestotrotz ist eine Ablösung durch die



LC-MS/MS in diesem Bereich denkbar, ermöglicht sie immerhin eine einfachere Probenaufarbeitung [54, 126].

Auch die bioinformatische Modellierung der Datensätze gewinnt zunehmend an Bedeutung [127], eröffnet sie schließlich die Möglichkeit, nicht nur einzelne Biomarker zu identifizieren, sondern diagnostisch nutzbare Metabolitprofile auszumachen [54]. Angesichts dessen wird die Notwendigkeit einer Methode zur simultanen Analyse hunderter Analyte deutlich [54]. Die LC-MS/MS erfüllt die hierzu nötigen technischen Anforderungen [54] und ermöglicht weitergehend die zu einem umfassenderen Verständnis der untersuchten Erkrankung führenden Pathwayanalysen [128].

#### **4.4.2 Diskussion der Glycerophospholipid-Ergebnisse**

19 Glycerophospholipide zeigten in der Gesamtgruppe erniedrigte Konzentrationen im Plasma der ACC-Patient\*innen verglichen mit den ACA-Kontrollen. Diese schlossen acht Lysophosphatidylcholine, sowie elf Phosphatidylcholine mit ein. Bei der Untersuchung der einzelnen Untergruppen konnten die drei Lysophosphatidylcholine lyso PC a C26:0, lyso PC a C26:1 und lyso PC a C28:0 und das Phosphatidylcholin PC aa C24:0 ausgemacht werden, die in allen Gruppen-Untersuchungen, also sowohl in der Gesamt- als auch in den jeweiligen Untergruppen (hormoninaktive, Cortisol-produzierende, Männer und Frauen) signifikant niedrigere Plasmalevel in der ACC-Gruppe zeigten. Für ein weiteres Lysophosphatidylcholin (lyso PC a C18:0) konnte in vier der fünf Gruppen eine signifikant niedrigere Konzentration im Plasma der ACC-Patient\*innen verglichen mit den Kontrollen ausgemacht werden. Auffallend ist, dass es immer die Cortisol-produzierende Gruppe ist, welche kein signifikantes Ergebnis zeigt, sofern sich mindestens ein Gruppenvergleich als nicht signifikant erweist. Dies kann einerseits mit der heterogenen Cortisol-Produktion der Patient\*innen erklärt werden, da in diese Gruppe, wie in Tabelle 10 gezeigt, auch Tumore mit gemischter Sekretion von Cortisol und Mineralocorticoiden oder Geschlechtshormonen eingeschlossen wurden. Die weitere Untergruppierung hätte zu extrem kleinen Fallzahlen geführt. Dass in dieser Gruppe deutlich weniger signifikante Unterschiede zwischen der ACC- und Kontrollgruppe gezeigt werden konnten, kann also auf den inhomogenen Sekretionsstatus der Probanden zurückzuführen sein. Dementsprechend wäre davon auszugehen, dass sich diese Ergebnisse in einer Validierungsstudie mit strikteren Einschlusskriterien bezüglich der Cortisolproduktion nicht bestätigen ließen. Andererseits kann eben diese Tatsache, dass die signifikanten Veränderungen bei Fokussierung auf die Cortisol-produzierende Gruppe nicht mehr sichtbar sind bedeuten, dass die veränderten Glycerophospholipidkonzentrationen in den anderen

Gruppen-Untersuchungen auf einen durch den Tumor bedingten Einfluss auf den Stoffwechsel (z.B. Katabolismus) zurückzuführen sind [129]. Möglicherweise hat die Cortisolproduktion hierauf einen erheblichen Einfluss, der den des Phänotyps der Tumorerkrankung überlagert.

Phosphatidylcholin entsteht durch Reaktion des durch Veresterung von Glycerin-3-Phosphat und zwei aktivierten Fettsäuren (Acyl-CoA) entstehenden Phosphatids (Diacylglycerin-3-phosphat) mit Cholin [12]. Durch die Phospholipasen A1 und A2 entsteht das Lysophosphatidylcholin, welches nur einen Fettsäurerest besitzt [12]. Als Hauptbestandteil biologischer Membranen sind Glycerophospholipide für die zelluläre Integrität von Bedeutung [12]. Mehrere Studien zeigten bereits einen veränderten Cholinmetabolismus in Krebszellen [58, 130-132]. In magnetresonanzspektroskopischen Studien wird von erhöhten Konzentrationen von Stoffwechselzwischenprodukten des Cholin-Phospholipid-Stoffwechsels wie Phosphocholin und Gesamtcholin in Gewebe von Karzinompatient\*innen berichtet [130, 131]. Andere beschreiben erniedrigte Konzentrationen von Lysophosphatidylcholin im Plasma von Patient\*innen mit kolorektalem Karzinom [132] und Patienten mit Prostatakarzinom [58]. Zum Prostatakarzinom liegt vom selben Autorenteam eine Studie vor, bei der im Prostatagewebe mittels Magnetresonanzspektroskopie (MRS) wiederum erhöhte Konzentrationen von freiem Cholin, Phosphocholin und Glycerophosphocholin gefunden wurden [133]. In Zusammenschau dieser Daten, kann eine mögliche Erklärung der divergierenden Konzentrationen in Plasma- und Gewebeproben durchaus in den unterschiedlichen Untersuchungsmodalitäten (MRS vs. LC-MS) und –materialien (Gewebe vs. Plasma) gesehen werden. Ob es einen Zusammenhang zwischen diesen kontroversen Erkenntnissen bezüglich des Cholin-Phospholipidstoffwechsels und der jeweiligen Methode gibt, muss jedoch weiter untersucht werden. Allgemein werden veränderte Level an Lysophospholipiden mit der Tumor-spezifischen Eigenschaft zur Metastasierung in Verbindung gebracht [132, 134]. Möglicherweise könnten die in der vorliegenden Studie beschriebenen erniedrigten Plasmakonzentrationen von Lysophosphatidylcholinen und Phosphatidylcholinen im Plasma von ACC-Patient\*innen auf einen entgleisten Cholinstoffwechsel in ACC-Gewebe hinweisen. Um dieser Hypothese gerecht zu werden, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

Da alle verwendeten Proben vor einer therapeutischen Medikamentengabe gewonnen wurden, kann ein Einfluss von z.B. Mitotane auf diese Stoffwechselveränderungen ausgeschlossen werden.

#### 4.4.3 Diskussion der Aminosäuren-Ergebnisse

Bei Analyse der Aminosäuren in den unterschiedlichen Gruppierungen konnten die vier Aminosäuren Arginin, Leucin, Tyrosin und Valin ausgemacht werden, die jeweils in vier der fünf Gruppenvergleichen signifikante Unterschiede zwischen den ACC- und ACA-Patient\*innen aufweisen. Für weitere zwei Aminosäuren (Methionin und Tryptophan) konnte ebenfalls diagnostisches Potenzial abgeleitet werden, da diese immerhin in drei Gruppenanalysen signifikant niedrigere Konzentrationen in der ACC-Gruppe verglichen mit den Kontrollen zeigten. Die Plasmakonzentrationen der genannten Aminosäuren zeigten in der ACC-Gruppe ausnahmslos niedrigere Werte als in der Kontrollgruppe. In einer Studie von Miyagi *et al.* [125] wurden Aminosäureprofile im Plasma von Patient\*innen mit fünf unterschiedlichen Krebsentitäten per LC-MS bestimmt. Unter diesen fünf Krebsentitäten fanden sich Lungen-, Magen-, Brust-, Prostata- und kolorektale Karzinome, deren Aminosäuren-Profile jeweils mit Kontrollen, untereinander und als Gesamtgruppe verglichen wurden [125]. Zwar fand sich unter den Tumorentitäten keine Gruppe adrenocorticaler Karzinome, dennoch konnten die von Miyagi *et al.* [125] gefundenen Tumor-assoziiert signifikant erniedrigten Konzentrationen von Valin, Methionin, Leucin, Tyrosin, Tryptophan und Arginin in der hier vorliegenden Untersuchung der Gesamtgruppe bestätigt werden. Ebenso wurde auch für die signifikante Erhöhung der Serinkonzentration in der Karzinom-Gruppe eine parallele Beobachtung in der Studie von Miyagi *et al.* [125] beschrieben. Für vier der genannten Aminosäuren konnten die signifikanten Änderungen der Plasmakonzentration sogar in vier der fünf hier untersuchten Gruppen gezeigt werden. Dass Aminosäuren-Profile im Plasma von Krebspatient\*innen Potenzial als diagnostische Biomarker haben, wurde bereits in früheren Studien beschrieben [125, 135, 136]. Die verminderten Konzentrationen der Aminosäuren im Plasma werden mit der tumorassoziierten gesteigerten Proteinbiosynthese und dem damit verbundenen gesteigerten Aminosäuren-Bedarf erklärt [136]. In Studien zur Frühdiagnose des Brustkrebs [137] und gastrointestinalen Tumoren konnte bereits ein spezifisches Aminosäuren-Profil im Blut der betroffenen Patient\*innen beobachtet werden, wobei davon ausgegangen wird, dass diese Profile tumorspezifisch differieren [136]. Die Argininkonzentrationen waren in der vorliegenden Studie signifikant niedriger in der ACC-Gruppe im Vergleich zu den Konzentrationen der Kontrollen. Arginin scheint Einfluss auf Prozesse des Tumorwachstums zu nehmen, so konnte in früheren Studien mit Arginin-depletierenden Substanzen entscheidend Einfluss auf das Tumorwachstum genommen werden [138]. Für einige Tumore ist eine Herunterregulation der

intrazellulären Argininosuccinat-Synthetase, einem an der Arginin-Synthese entscheidend beteiligten Enzym, bekannt [139]. In diesen Fällen ist die Tumorzelle auf den transmembranären Transport von extrazellulärem Arginin angewiesen [139]. Die gefundenen erniedrigten Plasmaarginin-Konzentrationen ließen sich folglich durch den gesteigerten intrazellulären Bedarf und den damit einhergehenden vermehrten transmembranären Transport nach intrazellulär erklären, sofern von einer mangelhaften Funktion der Argininosuccinat-Synthetase in den ACC-Zellen ausgegangen würde. Studien zu diesem Enzymdefekt bei ACC-Zellen liegen bis dato jedoch nicht vor.

#### **4.4.4 Diskussion der Sphingomyelin-Ergebnisse**

Bei der Untersuchung der Sphingomyelinkonzentrationen konnten für SM C20:2 und SM C26:0 im Gesamtgruppenvergleich signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen den beiden Diagnosen ausgemacht werden. Während für SM C20:2 signifikant höhere Konzentrationen in der ACC-Gruppe zu beobachten waren, waren die SM C26:0-Konzentrationen in dieser Gruppe signifikant niedriger. Diese Ergebnisse konnten auch in einer Studie zur Diagnose von Brustkrebs von Qiu *et al.* [140] gezeigt werden. Als Hauptbestandteil biologischer Membranen [141] nehmen Sphingomyeline über den Sphingomyelin-Zyklus Einfluss auf Zellwachstum und –differenzierung [142]. Im Rahmen dieses Sphingomyelin-Zyklus entsteht, vermittelt durch die Sphingomyelinase, das Glykolipid Ceramid, welches Einfluss auf die zelluläre Apoptose, Differenzierung und Proliferation nimmt [142] und als Tumorsuppressor-Lipid gilt [143]. Tatsächlich ist das Auftreten von veränderten Enzymaktivitäten der Sphingolipidenzyme in Tumorzellen bekannt [143]. Durch eine herunterregulierte Sphingomyelinase [144, 145] entsteht weniger Ceramid, das unter anderem über die Aktivierung von Proteinphosphatase 2A (PP2A) und p53 proapoptotische Prozesse und einen Zellzyklusarrest initiieren kann [142]. Die beobachteten erhöhten Plasmalevel von SM C20:2 könnten einen Hinweis auf eine gestörte Sphingomyelinase-Aktivität im Zytoplasma von ACC-Zellen liefern.

Eine wie in der vorliegenden Arbeit erniedrigte Plasmakonzentration von SM C26:0 in der Karzinomgruppe ist konsistent mit der Arbeit von Qiu *et al.* [140]. Dort konnte eine Tumorstadium-abhängige Dynamik der SM C26:0-Konzentration gezeigt werden, wobei die Konzentrationen mit zunehmender Tumorlast sanken [140]. Bezogen auf die hier vorliegenden Ergebnisse, könnten die niedrigen Konzentrationen in der ACC-Gruppe durch den relativ großen Anteil an fortgeschrittenen Tumorstadien in der

Patient\*innenkohorte erklärt werden. Ein Vergleich der einzelnen Tumorstadien erfolgte aufgrund der zu kleinen Fallzahlen in dieser Untersuchung jedoch nicht.

#### **4.4.5 Diskussion der diagnostischen Aussagekraft**

Um den diagnostischen Wert der Metabolitbestimmungen zu evaluieren, wurde die AUC der ROC Kurven der einzelnen im Mann-Whitney U-Test signifikanten Metaboliten bestimmt. Für lyso PC a C26:0 wurde der höchste AUC-Wert von 0,86 in der Gesamtgruppe berechnet. In der weiterführenden Untersuchung der Untergruppenvergleiche wurden für den Vergleich der inaktiven Karzinome und Adenome der höchste AUC-Wert von 0,98 ebenfalls für lyso PC a C26:0 erreicht. Mit einem maximalen AUC-Wert von 0,73 für lyso PC a C28:0 konnte im Gruppenvergleich der Cortisol-produzierenden Karzinome und Adenome eine deutlich schlechtere Trennschärfe erreicht werden. Im Gruppenvergleich der Männer zeigte sich ein AUC-Wert von 0,9 für lyso PC a C28:0, sowie ein maximaler AUC-Wert von 0,86 für lyso PC a C26:0 im Gruppenvergleich der Frauen. Zusammenfassend konnten also schon einzelne Metaboliten recht gut zwischen der Karzinom- und der Adenomdiagnose diskriminieren. Auffallend ist hierbei, dass es sich in allen Gruppenvergleichen immer entweder um lyso PC a C26:0 oder lyso PC a C28:0 handelt, für welche die besten AUC-Werte beobachtet werden konnten. Gleichzeitig gehören diese beiden zu den vier Metaboliten, die im Mann-Whitney U-Test in allen fünf Gruppenvergleichen statistisch signifikant waren (siehe Tabelle 17), sodass hier eine Validierung gerechtfertigt erscheint. Die ebenfalls diagnostisch trennscharfen Aminosäuren Arginin, Leucin, Tyrosin und Valin, die in vier der fünf Gruppenuntersuchungen signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen der jeweiligen ACC- und ACA-Untergruppe aufwiesen, können relativ leicht in der Routine bestimmt werden und als richtungsweisend für kommende Validierungsstudien angesehen werden.

Mit der Anwendung spezifischerer bioinformatischer Analysen konnte eine Kombination mehrerer Metaboliten (Metabolit-Signatur) berechnet werden, durch welche sich eine hervorragende Diskrimination der ACC-Patient\*innen und Kontrollen erreichen ließ. Die Anwendung einer 26-Metabolit-Signatur in der Gesamtgruppe erbrachte einen AUC-Wert von 0,989 und somit sehr gute Trennschärfe zwischen den Diagnosen. Im Abgleich mit den im Mann-Whitney-U-Test erhobenen signifikanten Metaboliten der Gesamtgruppe zeigte sich eine Überlappung von insgesamt neun der 26 Metaboliten: Arginin, Serin, Valin, lyso PC a C28:0, PC aa C36:5, PC ae C38:1, PC ae C42:2, SM C20:2 und SM C26:0. Zwar konnten einzelne Metaboliten schon zwischen der ACC-Gruppe und den Kontrollen diskriminieren, jedoch lag dabei der maximale AUC-Wert

bei 0,86. Die Kombination der Metaboliten lieferte folglich bessere Ergebnisse für die Trennschärfe zwischen den beiden Diagnosen. Allerdings erscheint eine Methode mit solch zahlreichen Metaboliten kaum der Routine-Patient\*innenversorgung zugänglich. Zuvor bedarf diese Methode einer ausgiebigen Validierung. Nichtsdestotrotz konnte eine Überschneidung der diskriminierenden Metaboliten zwischen der bioinformatisch generierten Signatur und den per deskriptiver Statistik ermittelten Metaboliten gezeigt werden, was Anlass für weiterführende Analysen im bioinformatischen Zusammenhang geben sollte. Im Zuge dessen können dann auch Untergruppen-spezifische Signaturen ermittelt werden.

Der menschliche Stoffwechsel ist bekanntermaßen sehr komplex, denn sowohl körpereigene als auch externe Faktoren nehmen Einfluss auf die metabolischen Vorgänge des Körpers [58]. Dabei muss an genetische Einflüsse genauso gedacht werden [146], wie an den Einfluss tageszeitlicher Schwankungen [5] und der Nahrungsaufnahme, dem die Metabolitprofile unterliegen [147]. Folglich ist nicht davon auszugehen, dass die Messung einzelner Metaboliten im Plasma eine definitive Diagnosenzuweisung zulässt [58]. Vielmehr ergibt sich durch eine Zusammenschau mehrerer interagierender Metaboliten eine verlässlichere Auskunft [58]. Dennoch bringt der Mangel einer standardisierten Datenanalyse, sowie die Messung unterschiedlicher Probenmaterialien (Serum und Plasma) weiterhin Schwierigkeiten in der Vergleichbarkeit der per Metabolomics generierten Daten mit sich [137].

Die LC-MS/MS hat also das Potenzial, zwar unter höheren technischen Anforderungen als beim Immunoassay, aber dafür mit höherer Spezifität, auch in der Routine-Patient\*innenversorgung Einsatz zu finden [54].

Nichtsdestotrotz muss diese Studie unter dem Aspekt eines Pilotprojektes gesehen werden, das prospektiver Validierungsstudien mit größerer Studienpopulation bedarf. Eine größere Stichprobenzahl würde dann eine bioinformatische Modellierung mit spezifischerer Aufteilung und der Anwendung eines Trainings- und Testdatensatzes ermöglichen, der in der vorliegenden Untersuchung aufgrund der zu kleinen Untergruppen nur eingeschränkt möglich war.

## 4.5 Ausblick

Es ist davon auszugehen, dass sogenannte Machine-Learning (ML)-Anwendungen weiter vorangetrieben und in Zukunft vermehrt Anwendung finden werden [148]. Studien zeigten bereits den Einsatz von ML in der Vorhersage von Krebsprognose [149] und bestmöglicher Krebstherapie [150]. Beim ML werden vereinfacht gesagt zwei Herangehensweisen unterschieden: das überwachte Lernen mit bekannten Ein- und Ausgabedaten und das unüberwachte Lernen, bei dem ausschließlich die Eingabedaten bekannt sind [151]. Bei ersterem können Modelle (bzw. Algorithmen) mit bekannten Ein- und Ausgabedaten an einem Trainingsdatensatz trainiert und an einem Testdatensatz angewandt werden, wodurch prädiktive Modelle entstehen sollen [151, 152].

Die Stichprobenzahl der vorliegenden Arbeit ermöglichte eine solche Aufteilung nicht, sodass der Modell-Algorithmus, der die Steroidhormonsignatur hervorgebracht hat, nicht „trainiert“ werden konnte und daher ein sogenanntes „overfitting“ [94] möglich ist. Dies würde bedeuten, dass die Anwendung des Modells an einem neuen Datensatz weniger gute Ergebnisse erzielt [94]. Daher erscheint es sinnvoll, schon jetzt an Routineproben, die Steroidhormonmessungen unterzogen werden, kontinuierlich ML-Techniken anzuwenden. Konkret soll hierfür von Mitarbeitern des Bioinformatischen Instituts der Universität Würzburg eine solche Anwendung für den Forschungsgebrauch des Schwerpunkts Endokrinologie am Universitätsklinikum Würzburg erstellt werden. Somit kann prospektiv eine kontinuierliche Anpassung der Signatur im Sinne eines überwachten ML-Prozesses stattfinden.

Um eine Validierung der gewonnenen Daten durchzuführen, sollen im Rahmen einer Validierungsstudie Steroidhormon- und Metabolitdaten einer anderen Kohorte analysiert und bioinformatisch modelliert werden. Im Zuge dessen ist auch eine Pathwayanalyse zur besseren Einschätzung der veränderten Abläufe in betroffenen Stoffwechselwegen denkbar.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Nebennierenrindenzinom ist eine sehr seltene maligne Erkrankung [18], die mit einer infausten Prognose vergesellschaftet ist [22]. In Zeiten der apparativ geprägten Medizin treten suspekta Befunde der Nebenniere gehäuft auf als je zuvor [15]. Diese Nebennierenraumforderungen, die zumeist bei Bildgebungen auffallen, die aus anderen Gründen indiziert waren, werden Nebenniereninzidentalome genannt und sind meist benigne Befunde [14, 17]. Dennoch wird es angesichts dieser steigenden Zahl an Inzidentalomen [15] immer wichtiger, die Entität der gefundenen Raumforderung schnell zu sichern, um die entsprechende Therapie einleiten zu können [14]. Somit sollen das Zeitfenster bis zur Krebstherapie verkleinert und gleichsam unnötige chirurgische Eingriffe bei Patient\*innen mit benignen Nebennierentumoren vermieden werden [14]. Um die diagnostischen Schritte weiter zu verbessern, wurde in der vorliegenden Arbeit eine bioinformatische Regressionsanalyse an Steroidhormonkonzentrationen von ACC-Patient\*innen und Kontrollen (ACA) durchgeführt und der diagnostische Wert der berechneten Steroidsignaturen untersucht. Dabei zeigte sich im geschlechtsspezifischen Modell jeweils eine 6-Steroid-Signatur mit bester Trennschärfe zwischen benignen und malignen NN-Befunden. So konnte mit der 6-Steroid-Signatur in der männlichen Patientengruppe mit einer Sensitivität von 80% und Spezifität von 97%, in der weiblichen Patientinnengruppe mit einer Sensitivität von 78% und Spezifität von 97% die Diagnose richtig zugewiesen werden.

Bezüglich der Metabolomics-Studie erbrachte die vorliegende Arbeit eindeutige Hinweise, dass einige Metaboliten diagnostisch relevante Erkenntnisse liefern können und prospektive Validierungsstudien lohnenswert sind. Zugleich konnten Tumor-assoziierte Stoffwechselalterationen aufgezeigt werden. Angesichts der Komplexität des menschlichen Stoffwechsels erscheint eine Diagnosenzuweisung anhand einzelner Metabolitbestimmungen jedoch nicht möglich [58]. Die Aussagekraft kann durch die Analyse mehrerer Metaboliten gesteigert werden [58]. Eine Plasma-Metabolit-Signatur zur Differenzierung von ACCs und Nebennierenadenomen, welche die gängige Diagnostik bei der Abklärung von unklaren Nebennierentumoren erleichtern könnte, erscheint jedoch angesichts der großen Anzahl an zu bestimmenden Metaboliten - auch unter ökonomischen Gesichtspunkten - zu diesem Zeitpunkt noch nicht mit der Routine-Patient\*innenversorgung vereinbar. Zukünftig wird das sogenannte ML auch im medizinischen Bereich immer mehr Anwendung finden und den Umgang mit immensen Datenmengen erheblich erleichtern [148].



## 6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Schulte, E., *Nebenniere (Glandula suprarenalis)*, in *Duale Reihe Anatomie*, Aumüller, G., et al., (Hrsg.). 2007, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. p. 786-790.
2. Tank, A.W. und Lee Wong, D., *Peripheral and central effects of circulating catecholamines*. *Compr Physiol*, 2015. 5(1): p. 1-15.
3. Benninghoff, A., Drenckhahn, D., und Waschke, J., *Taschenbuch Anatomie*. 2. Auflage. 2014: Elsevier, Urban & Fischer, München.
4. Lüllmann, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. 5. Auflage. 2015: Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
5. Klöcker, N., *Endokrines System*, in *Taschenlehrbuch Physiologie*, Gekle, M., et al., (Hrsg.). 2010, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 510-545.
6. Spinass, G.A., et al., *Endokrinologie und Stoffwechsel*. 2. Auflage. 2011: Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
7. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. 4. vollst. überarb. Auflage. 2012: Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
8. Herold, G., *Innere Medizin 2013*. 2013: Herold, Gerd, Köln.
9. Löffler, G., *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. 7. Auflage. 2008: Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
10. Horn, F., *Hormone*, in *Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium*, Horn, F., (Hrsg.). 2009, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. p. 330-346.
11. Mense, S., *ZNS - funktionelle Systeme*, in *Duale Reihe Anatomie*, Aumüller, G., et al., (Hrsg.). 2007, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. p. 1192-1285.
12. Müller-Esterl, W., *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 3. Auflage. 2017: Springer-Verlag, Berlin.
13. Häggström M., R.D. "Diagram of the pathways of human steroidogenesis". 2014 Stand 28.05.2021; Abrufbar unter: [https://en.wikiversity.org/wiki/WikiJournal\\_of\\_Medicine/Diagram\\_of\\_the\\_pathways\\_of\\_human\\_steroidogenesis#/media/File:Steroidogenesis.svg](https://en.wikiversity.org/wiki/WikiJournal_of_Medicine/Diagram_of_the_pathways_of_human_steroidogenesis#/media/File:Steroidogenesis.svg).
14. Fassnacht, M., et al., *Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors*. *Eur J Endocrinol*, 2016. 175(2): p. G1-g34.
15. Kloos, R.T., et al., *Incidentally Discovered Adrenal Masses\**. *Endocrine Reviews*, 1995. 16(4): p. 460-484.
16. Grumbach, M.M., et al., *Management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma")*. *Ann Intern Med*, 2003. 138(5): p. 424-429.
17. Willenberg, H.S., Zschucke, D., und Bornstein, S.R., *Nebennierentumoren*. *Der Internist*, 2007. 48(9): p. 971-986.
18. Fassnacht, M., et al., *Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma*. *Cancer*, 2009. 115(2): p. 243-250.
19. Bilimoria, K.Y., et al., *Adrenocortical carcinoma in the United States*. *Cancer*, 2008. 113(11): p. 3130-3136.
20. Johanssen, S., et al., *Defizite in der klinischen Betreuung von Patienten mit Nebennierenkarzinom*. *Dtsch Arztebl International*, 2010. 107(50): p. 885-91.
21. Fassnacht, M., et al., *Adrenocortical carcinoma: a clinician's update*. *Nat Rev Endocrinol*, 2011. 7(6): p. 323-35.
22. Fassnacht, M. und Allolio, B., *Adrenocortical Carcinoma: Clinical Update*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006. 91(6): p. 2027-2037.

23. Assié, G., et al., *Prognostic Parameters of Metastatic Adrenocortical Carcinoma*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2007. 92(1): p. 148-154.
24. Allolio, B., Fassnacht, M., und Arlt, W., *Maligne Tumoren der Nebennierenrinde*. Der Internist, 2002. 43(2): p. 186-195.
25. Eller-Vainicher, C., et al., *Accuracy of several parameters of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in predicting before surgery the metabolic effects of the removal of an adrenal incidentaloma*. Eur J Endocrinol, 2010. 163(6): p. 925-35.
26. Fassnacht, M., et al., *European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the management of adrenocortical carcinoma in adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors*. European Journal of Endocrinology, 2018. 179(4): p. G1-G46.
27. Fassnacht, M., Kroiss, M., und Allolio, B., *Update in Adrenocortical Carcinoma*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2013. 98(12): p. 4551-4564.
28. Luton, J.P., et al., *Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy*. N Engl J Med, 1990. 322(17): p. 1195-201.
29. Terzolo, M., et al., *Adjuvant Mitotane Treatment for Adrenocortical Carcinoma*. New England Journal of Medicine, 2007. 356(23): p. 2372-2380.
30. Megerle, F., et al., *Mitotane monotherapy in patients with advanced adrenocortical carcinoma*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2018. 103(4): p. 1686-1695.
31. Berruti, A., et al., *Long-Term Outcomes of Adjuvant Mitotane Therapy in Patients With Radically Resected Adrenocortical Carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2017. 102(4): p. 1358-1365.
32. Sbiera, S., et al., *Mitotane Inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 Triggering Lipid-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Adrenocortical Carcinoma Cells*. Endocrinology, 2015. 156(11): p. 3895-3908.
33. Haak, H.R., et al., *Optimal treatment of adrenocortical carcinoma with mitotane: results in a consecutive series of 96 patients*. British journal of cancer, 1994. 69(5): p. 947-951.
34. van Slooten, H., et al., *The treatment of adrenocortical carcinoma with o,p'-DDD: prognostic implications of serum level monitoring*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1984. 20(1): p. 47-53.
35. Terzolo, M., et al., *Practical treatment using mitotane for adrenocortical carcinoma*. Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity, 2014. 21(3): p. 159-165.
36. Kroiss, M., et al., *Drug Synergism of Proteasome Inhibitors and Mitotane by Complementary Activation of ER Stress in Adrenocortical Carcinoma Cells*. Horm Cancer, 2016. 7(5-6): p. 345-355.
37. Terzolo, M., et al., *Mitotane levels predict the outcome of patients with adrenocortical carcinoma treated adjuvantly following radical resection*. Eur J Endocrinol, 2013. 169(3): p. 263-70.
38. Baudin, E., et al., *Impact of monitoring plasma 1,1-dichlorodiphenildichloroethane (o,p'DDD) levels on the treatment of patients with adrenocortical carcinoma*. Cancer, 2001. 92(6): p. 1385-92.
39. Kerkhofs, T.M., et al., *Comparison of two mitotane starting dose regimens in patients with advanced adrenocortical carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. 98(12): p. 4759-67.

40. Daffara, F., et al., *Prospective evaluation of mitotane toxicity in adrenocortical cancer patients treated adjuvantly*. *Endocr Relat Cancer*, 2008. 15(4): p. 1043-53.
41. Heilmann, P., et al., *Therapy of the adrenocortical carcinoma with Lysodren (o,p'-DDD). Therapeutic management by monitoring o,p'-DDD blood levels*. *Med Klin (Munich)*, 2001. 96(7): p. 371-377.
42. Hogan, T.F., et al., *o,p'-DDD (mitotane) therapy of adrenal cortical carcinoma. Observations on drug dosage, toxicity, and steroid replacement*. *Cancer*, 1978. 42(5): p. 2177-2181.
43. Kroiss, M., et al., *Drug interactions with mitotane by induction of CYP3A4 metabolism in the clinical management of adrenocortical carcinoma*. *Clinical Endocrinology*, 2011. 75(5): p. 585-591.
44. Gower, D., et al., *Steroid excretion and biosynthesis with special reference to C19- $\Delta$ 16-steroids in an infant with a virilizing adrenocortical carcinoma*. *Acta endocrinologica*, 1970. 63(3): p. 562-576.
45. Gower, D. und Stern, M.I., *Steroid excretion and biosynthesis, with special reference to androst-16-enes, in a woman with a virilising adrenocortical carcinoma*. *Acta endocrinologica*, 1969. 60(2): p. 265-275.
46. Arlt, W., et al., *Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. 96(12): p. 3775-84.
47. Bancos, I., et al., *Urine steroid metabolomics for the differential diagnosis of adrenal incidentalomas in the EURINE-ACT study: a prospective test validation study*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2020. 8(9): p. 773-781.
48. Taylor, D.R., et al., *A 13-Steroid Serum Panel Based on LC-MS/MS: Use in Detection of Adrenocortical Carcinoma*. *Clin Chem*, 2017. 63(12): p. 1836-1846.
49. Cairns, R.A., Harris, I.S., und Mak, T.W., *Regulation of cancer cell metabolism*. *Nature Reviews Cancer*, 2011. 11(2): p. 85.
50. Hanahan, D. und Weinberg, R.A., *Hallmarks of cancer: the next generation*. *cell*, 2011. 144(5): p. 646-674.
51. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. *Science*, 1956. 123(3191): p. 309-314.
52. Madeddu, C., Maccio, A., und Mantovani, G., *Metabolic Changes in Cancer Patients*. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 2011. 10(4): p. 281-285.
53. Tisdale, M., *Mechanisms of cancer cachexia*. *Physiological reviews*, 2009. 89: p. 381-410.
54. Vogeser, M. und Parhofer, K.G., *Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)--technique and applications in endocrinology*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2007. 115(9): p. 559-70.
55. Matissek, R., Fischer, M., und Steiner, G., *Massenspektrometrie*, in *Lebensmittelanalytik*. 2018, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. p. 103-110.
56. Monaghan, P.J., Keevil, B.G., und Trainer, P.J., *The use of mass spectrometry to improve the diagnosis and the management of the HPA axis*. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2013. 14(2): p. 143-157.
57. Zhang, A., Sun, H., und Wang, X., *Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for disease: a systematic review*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2012. 404(4): p. 1239-1245.
58. Giskeødegård, G.F., et al., *Metabolic markers in blood can separate prostate cancer from benign prostatic hyperplasia*. *British journal of cancer*, 2015. 113(12): p. 1712.
59. Nishiumi, S., et al., *A novel serum metabolomics-based diagnostic approach for colorectal cancer*. *PloS one*, 2012. 7(7): p. e40459.

60. Kobayashi, T., et al., *A novel serum metabolomics-based diagnostic approach to pancreatic cancer*. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 2013. 22(4): p. 571-579.
61. Tiziani, S., Lopes, V., und Günther, U.L., *Early stage diagnosis of oral cancer using 1H NMR-based metabolomics*. *Neoplasia*, 2009. 11(3): p. 269-276.
62. Lau, S.K. und Weiss, L.M., *The Weiss system for evaluating adrenocortical neoplasms: 25 years later*. *Human pathology*, 2009. 40(6): p. 757-768.
63. Bancos, I., et al., *Diagnosis of endocrine disease: the diagnostic performance of adrenal biopsy: a systematic review and meta-analysis*. *European journal of endocrinology*, 2016: p. EJE-16-0297.
64. Mansmann, G., et al., *The Clinically Inapparent Adrenal Mass: Update in Diagnosis and Management*. *Endocrine Reviews*, 2004. 25(2): p. 309-340.
65. Dwamena, B.A., et al., *Diagnostic evaluation of the adrenal incidentaloma: decision and cost-effectiveness analyses*. *J Nucl Med*, 1998. 39(4): p. 707-12.
66. Diederich, S., et al., *Diagnostik des primären Hyperaldosteronismus\**. *Medizinische Klinik*, 2007. 102(1): p. 16-21.
67. Güssregen, B., *LC-MS*, in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, Gressner, A.M. und Arndt, T., (Hrsg.). 2019, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. p. 1439-1440.
68. aprentas, *Flüssigchromatographie, HPLC*, in *Laborpraxis Band 3: Trennungsmethoden*, aprentas, (Hrsg.). 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 259-291.
69. Schmid, T. *Analytische Chemie, Flüssigchromatographie (LC)*. 2011 Stand 17.05.2021; Abrufbar unter: [http://www.analytik.ethz.ch/vorlesungen/biopharm/Trennmethoden/Analytische\\_Chemie\\_Skript\\_3\\_LC.pdf](http://www.analytik.ethz.ch/vorlesungen/biopharm/Trennmethoden/Analytische_Chemie_Skript_3_LC.pdf).
70. Gross, J.H., *Einleitung*, in *Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch*. 2013, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. p. 1-22.
71. Gross, J.H., *Prinzipien der Ionisation und Ionendissoziation*, in *Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch*. 2013, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. p. 23-74.
72. Gross, J.H., *Elektrospray-Ionisation*, in *Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch*. 2013, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. p. 601-662.
73. Dörner, K., *Klinische Chemie und Hämatologie*. 7. Auflage. 2009: Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
74. Gross, J.H., *Tandem-Massenspektrometrie*, in *Massenspektrometrie: Spektroskopiekurs kompakt*. 2019, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. p. 105-111.
75. Kraj, A., Desiderio, D.M., und Nibbering, N.M., *Mass spectrometry: instrumentation, interpretation, and applications*. Vol. 20. 2008: John Wiley & Sons.
76. Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, G., *Arbeitsvorschrift für die LC-MS/MS-Bestimmung MassChrom Steroide im Serum/Plasma*. 2016: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Gräfelfing.
77. Hallbach, J., *Klinische Chemie und Hämatologie: Biomedizinische Analytik für MTLA und Studium*. 3. Auflage. 2011: Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
78. Gerhards, P. und Szigan, J., *Probenvorbereitungsverfahren für die Drogenanalytik*, in *GC/MS in der klinischen Chemie*. 1997. p. 55-64.
79. Macherey-Nagel GmbH & Co KG, D. *Grundprinzip des SPE-Verfahrens*. 2010 Stand 28.05.2021; Abrufbar unter: <https://www.mn-net.com/de/chromatographie/festphasenextraktion-spe-information/>.
80. Schweitzer, S., et al., *Plasma steroid metabolome profiling for the diagnosis of adrenocortical carcinoma*. *European Journal of Endocrinology*, 2019. 180(2): p.

- 117-125. Wiederveröffentlicht mit der Genehmigung von Bioscientifica Limited aus Plasma steroid metabolome profiling for the diagnosis of adrenocortical carcinoma, Schweitzer, S., et al., 180 (2), 2019; Genehmigung erteilt durch Copyright Clearance Center, Inc.
81. Max Rubner-Institut Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, K. *Metabolomics*. Stand 28.05.2021; Abrufbar unter: <https://www.mri.bund.de/de/themen/metabolomics/>.
  82. Kuhara, T., *Metabolome profiling of human urine with capillary gas chromatography/mass spectrometry*, in *Metabolomics: the frontier of systems biology*, Tomita, M.N., Takaaki, (Hrsg.). 2006, Springer-Verlag, Tokyo. p. 53-74.
  83. Roberts, L.D., et al., *Targeted metabolomics*. Current protocols in molecular biology, 2012. 98(1): p. 30.2. 1-30.2. 24.
  84. Lu, W., Bennett, B.D., und Rabinowitz, J.D., *Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics*. Journal of Chromatography B, 2008. 871(2): p. 236-242.
  85. Griffiths, W., et al., *Metabolomics and metabolite profiling: past heroes and future developments*. European journal of mass spectrometry, 2007. 13(1): p. 45-50.
  86. Siskos, A.P., et al., *Interlaboratory reproducibility of a targeted metabolomics platform for analysis of human serum and plasma*. Analytical chemistry, 2016. 89(1): p. 656-665.
  87. BIOCRATES Life Sciences AG, I., *AbsoluteIDQ Kit User Manual p180*. 2010: BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck.
  88. BIOCRATES Life Sciences AG, I., *Metabolite Portfolio*. 2018: BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck.
  89. Schöneshöfer, M., *Anwendung der HPLC in der Klinisch-chemischen Analytik*, in *Analytiker Taschenbuch Band 8*, Borsdorf, R., Fresenius, W., Günzler, H., Huber, W., Kelker, H., Lüderwald, I., Tölg, G., Wisser, H., (Hrsg.). 1989, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. p. 219-242.
  90. Richter, G., *Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken; 19 Tabellen*. 2003: Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
  91. Sing, T., et al., *ROCR: visualizing classifier performance in R*. Bioinformatics, 2005. 21(20): p. 3940-3941.
  92. VanDerWal, J., et al., *SDMTools: Species Distribution Modelling Tools: Tools for processing data associated with species distribution modelling exercises*. R package version, 2014. 1(1-221): p. 1.
  93. Ripley, B.D. und Venables, W.N., *Statistics Complements to Modern Applied Statistics with S*. 4. Auflage. 2002: Springer-Verlag.
  94. Bruce, P., Bruce, A., und Gedeck, P., *Practical Statistics for Data Scientists: 50+ Essential Concepts Using R and Python*. 2. Auflage. 2020: O'Reilly Media, Sebastopol.
  95. James, G., et al., *An Introduction to Statistical Learning with Applications in R*. Vol. 112. 2013: Springer-Verlag, New-York.
  96. Bender, R., *Interpretation von Effizienzmaßen der Vierfeldertafel für Diagnostik und Behandlung*. Medizinische Klinik, 2001. 96(2): p. 116-121.
  97. Werlein, A., *Untersuchungen zur Toxizität liposomaler Phosphatidylcholine auf Krebszellen in vitro*. 2010.
  98. Johanssen, S., et al., *Das Nebennierenkarzinom*. Der Urologe, 2008. 47(2): p. 172-181.
  99. Kerkhofs, T.M.A., et al., *Diagnostic Value of Urinary Steroid Profiling in the Evaluation of Adrenal Tumors*. Hormones and Cancer, 2015. 6(4): p. 168-175.

100. Xu, F., et al., *Metabolic signature shift in type 2 diabetes mellitus revealed by mass spectrometry-based metabolomics*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2013. 98(6): p. E1060-E1065.
101. Kushnir, M.M., et al., *Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories*. Clinical Biochemistry, 2011. 44(1): p. 77-88.
102. Annesley, T.M., *Ion suppression in mass spectrometry*. Clinical chemistry, 2003. 49(7): p. 1041-1044.
103. Taylor, P.J., *Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry*. Clinical biochemistry, 2005. 38(4): p. 328-334.
104. Vogeser, M. und Seger, C., *Pitfalls associated with the use of liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the clinical laboratory*. Clinical chemistry, 2010. 56(8): p. 1234-1244.
105. Owen, L. und Keevil, B., *Testosterone measurement by liquid chromatography tandem mass spectrometry: the importance of internal standard choice*. Ann Clin Biochem, 2012. 49(Pt 6): p. 600-602.
106. Vogeser, M. und Seger, C., *A decade of HPLC–MS/MS in the routine clinical laboratory—Goals for further developments*. Clinical biochemistry, 2008. 41(9): p. 649-662.
107. Shackleton, C., *Congenital adrenal hyperplasia caused by defect in steroid 21-hydroxylase. Establishment of definitive urinary steroid excretion pattern during first weeks of life*. Clinica Chimica Acta, 1976. 67(3): p. 287-298.
108. Caulfield, M.P., et al., *The diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in the newborn by gas chromatography/mass spectrometry analysis of random urine specimens*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2002. 87(8): p. 3682-3690.
109. Kamrath, C., et al., *Diagnosis of 21-hydroxylase deficiency by urinary metabolite ratios using gas chromatography–mass spectrometry analysis: reference values for neonates and infants*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2016. 156: p. 10-16.
110. Hughes, B.A., et al., *Genotype-Phenotype Analysis in Congenital Adrenal Hyperplasia due to P450 Oxidoreductase Deficiency*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2012. 97(2): p. E257-E267.
111. Arlt, W., et al., *Congenital adrenal hyperplasia caused by mutant P450 oxidoreductase and human androgen synthesis: analytical study*. The Lancet, 2004. 363(9427): p. 2128-2135.
112. Gröndal, S., et al., *Steroid profile in urine: a useful tool in the diagnosis and follow up of adrenocortical carcinoma*. 1990. 122(5): p. 656.
113. Minowada, S., et al., *Measurement of urinary steroid profile in patients with adrenal tumor as a screening method for carcinoma*. Endocrinol Jpn, 1985. 32(1): p. 29-37.
114. Tschautscher, M., et al., *Serum free light chain measurements to reduce 24-h urine monitoring in patients with multiple myeloma with measurable urine monoclonal protein*. American Journal of Hematology, 2018. 93(10): p. 1207-1210.
115. Chatzikyrkou, C., Haller, H., und Menne, J., *Albuminurie*. Der Internist, 2012. 53(1): p. 38-44.
116. Bingham, S. und Cummings, J., *The use of 4-aminobenzoic acid as a marker to validate the completeness of 24 h urine collections in man*. Clinical Science, 1983. 64(6): p. 629-635.
117. Remer, T., Neubert, A., und Maser-Gluth, C., *Anthropometry-based reference values for 24-h urinary creatinine excretion during growth and their use in*



- endocrine and nutritional research*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2002. 75(3): p. 561-569.
118. Sturgeon, C.M. und Viljoen, A., *Analytical error and interference in immunoassay: minimizing risk*. Annals of Clinical Biochemistry, 2011. 48(5): p. 418-432.
  119. Fassnacht, M. und Allolio, B., *Clinical management of adrenocortical carcinoma*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2009. 23(2): p. 273-89.
  120. Doerr, H.G., et al., *Evidence of 11 beta-hydroxylase deficiency in childhood adrenocortical tumors. The plasma corticosterone/11-deoxycorticosterone ratio as a possible marker for malignancy*. Cancer, 1987. 60(7): p. 1625-1629.
  121. Małunowicz, E.M., et al., *Heterogeneity of urinary steroid profiles in children with adrenocortical tumors*. Hormones, 1995. 44(4): p. 182-188.
  122. Lipsett, M.B., Hertz, R., und Ross, G.T., *Clinical and pathophysiologic aspects of adrenocortical carcinoma*. The American journal of medicine, 1963. 35(3): p. 374-383.
  123. Arlt, W., et al., *Steroid metabolome analysis reveals prevalent glucocorticoid excess in primary aldosteronism*. JCI insight, 2017. 2(8): p. e93136.
  124. Kushnir, M.M., Rockwood, A.L., und Bergquist, J., *Liquid chromatography–tandem mass spectrometry applications in endocrinology*. Mass Spectrometry Reviews, 2010. 29(3): p. 480-502.
  125. Miyagi, Y., et al., *Plasma free amino acid profiling of five types of cancer patients and its application for early detection*. PloS one, 2011. 6(9): p. e24143.
  126. Manini, P., et al., *Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of acidic monoamine metabolites*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2000. 744(2): p. 423-31.
  127. Sabatine, M.S., et al., *Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia*. Circulation, 2005. 112(25): p. 3868-3875.
  128. Dettmer, K., Aronov, P.A., und Hammock, B.D., *Mass spectrometry-based metabolomics*. Mass Spectrometry Reviews, 2007. 26(1): p. 51-78.
  129. Baracos, V.E., et al., *Cancer-associated cachexia*. Nat Rev Dis Primers, 2018. 4: p. 17105.
  130. Ackerstaff, E., Glunde, K., und Bhujwala, Z.M., *Choline phospholipid metabolism: A target in cancer cells?* Journal of Cellular Biochemistry, 2003. 90(3): p. 525-533.
  131. Glunde, K., Bhujwala, Z.M., und Ronen, S.M., *Choline metabolism in malignant transformation*. Nature Reviews Cancer, 2011. 11(12): p. 835-848.
  132. Zhao, Z., et al., *Plasma lysophosphatidylcholine levels: potential biomarkers for colorectal cancer*. Journal of clinical oncology, 2007. 25(19): p. 2696-2701.
  133. Giskeødegård, G.F., et al., *Spermine and Citrate as Metabolic Biomarkers for Assessing Prostate Cancer Aggressiveness*. PLOS ONE, 2013. 8(4): p. e62375.
  134. Mills, G.B. und Moolenaar, W.H., *The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer*. Nature Reviews Cancer, 2003. 3(8): p. 582-591.
  135. Shingyoji, M., et al., *The significance and robustness of a plasma free amino acid (PFAA) profile-based multiplex function for detecting lung cancer*. BMC Cancer, 2013. 13: p. 77.
  136. Lai, H.S., et al., *Plasma free amino acid profile in cancer patients*. Semin Cancer Biol, 2005. 15(4): p. 267-76.
  137. Yuan, B., et al., *A plasma metabolite panel as biomarkers for early primary breast cancer detection*. International Journal of Cancer, 2019. 144(11): p. 2833-2842.

138. Kim, R.H., et al., *Arginine deiminase as a novel therapy for prostate cancer induces autophagy and caspase-independent apoptosis*. *Cancer research*, 2009. 69(2): p. 700-708.
139. Delage, B., et al., *Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer*. *International journal of cancer*, 2010. 126(12): p. 2762-2772.
140. Qiu, Y., et al., *Mass spectrometry-based quantitative metabolomics revealed a distinct lipid profile in breast cancer patients*. *International journal of molecular sciences*, 2013. 14(4): p. 8047-8061.
141. Ullman, M.D. und Radin, N.S., *The enzymatic formation of sphingomyelin from ceramide and lecithin in mouse liver*. *Journal of Biological Chemistry*, 1974. 249(5): p. 1506-1512.
142. Hannun, Y.A., *The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide*. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. 269(5): p. 3125-3128.
143. Morad, S.A. und Cabot, M.C., *Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells*. *Nature Reviews Cancer*, 2013. 13(1): p. 51-65.
144. Duan, R.-D., *Anticancer compounds and sphingolipid metabolism in the colon*. *In vivo*, 2005. 19(1): p. 293-300.
145. Cheng, Y., et al., *Identification of aberrant forms of alkaline sphingomyelinase (NPP7) associated with human liver tumorigenesis*. *British journal of cancer*, 2007. 97(10): p. 1441-1448.
146. Shin, S.Y., et al., *An atlas of genetic influences on human blood metabolites*. *Nat Genet*, 2014. 46(6): p. 543-550.
147. Panda, S., *Circadian physiology of metabolism*. *Science*, 2016. 354(6315): p. 1008-1015.
148. Zippel, C. und Bohnet-Joschko, S., *Rise of Clinical Studies in the Field of Machine Learning: A Review of Data Registered in ClinicalTrials.gov*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021. 18(10): p. 5072.
149. Beck, A.H., et al., *Systematic analysis of breast cancer morphology uncovers stromal features associated with survival*. *Sci Transl Med*, 2011. 3(108): p. 108ra113.
150. Huang, C., et al., *Open source machine-learning algorithms for the prediction of optimal cancer drug therapies*. *PLoS One*, 2017. 12(10): p. e0186906.
151. Deo, R.C., *Machine Learning in Medicine*. *Circulation*, 2015. 132(20): p. 1920-1930.
152. Alpaydin, E., *Introduction to machine learning*. 4. Auflage. 2020: Massachusetts Institute of Technology Press, Cambridge, Massachusetts.



## APPENDIX

**Tabelle 18 MRMs [m/z] der Steroide (Qualifier/Quantifier) und Isotopenstandards**

Abk.: DHEA - Dehydroepiandrosteron, DHEAs - Dehydroepiandrosteronsulfat, qual - Qualifier. Publiziert in [80].

Q1	Q3	Analyte
369.0	99.0	DHEAS
369.0	82.0	DHEAS_qual
375.0	100.0	DHEAS-d6
255.2	159.1	Estradiole
255.2	133.1	Estradiole_qual
260.2	161.1	Estradiole-d5
289.2	97.1	Testosterone
289.2	109.1	Testosterone_qual
292.2	97.1	Testosterone-d3
287.2	97.1	Androstenedione
287.2	109.1	Androstenedione_qual
290.2	112.1	Androstenedione-13C3
289.2	213.2	DHEA
271.2	213.2	DHEA_qual
294.2	218.2	DHEA-d5
291.2	255.1	Dihydrotestosterone
291.2	159.1	Dihydrotestosterone_qual
294.2	258.1	Dihydrotestosterone-d3
331.2	109.1	17-OH-Progesterone
331.2	97.1	17-OH-Progesterone
334.2	112.1	17-OH-Progesterone-13C3
331.2	109.1	11-Deoxycorticosterone
331.2	97.1	11-Deoxycorticosterone_qual
339.3	113.1	11-Deoxycorticosterone-d8
315.2	97.1	Progesterone
315.2	109.1	Progesterone_qual
324.2	100.1	Progesterone-d9
318.2	100.1	Progesterone-13C3
359.1	331.1	Aldosterone
359.1	189.0	Aldosterone_qual
363.1	335.1	Aldosterone-d4
363.2	97.1	Cortisol
363.2	121.1	Cortisol_qual
367.2	97.1	Cortisol-d4
361.2	163.1	Cortisone
361.2	121.1	Cortisone_qual
369.2	168.1	Cortisone-d8
347.2	121.1	Corticosterone
355.2	125.1	Corticosterone-d8
347.2	121.1	21-Deoxycortisol
355.2	125.1	21-Deoxycortisol-d8
347.3	97.1	11-Deoxycortisol
352.3	100.1	11-Deoxycortisol-d5

**Tabelle 19 MRM [m/z] der Metaboliten (LC-Teil) und Isotopenstandards**

Q1	Q3	Retentionszeit	Analyte
114.1	44.1	0.28	Creatinine
117.1	47.1	0.28	d3-Creatinine
211.2	75.9	3.27	Glycine
214.2	78.9	3.27	13C2-15N-Glycine
225	90.1	3.57	Sarcosine
228.1	93.1	3.57	d3-Sarcosine
225.2	44.2	4.02	Alanine
229.2	48.2	4.02	d4-Alanine
241.2	60	3.28	Serine
244.2	63	3.28	d3-Serine
247	154	2.46	Histamine
251.2	70.3	3.98	Proline
253.2	72.2	4.67	Valine
255.2	74.1	3.89	Threonine
257.2	105.2	5.33	PEA (Phenylethylamine)
258.2	77.3	3.98	d7-Proline
259.2	77.1	3.89	13C4-15N-Threonine
261	126.1	2.42	Taurine
261.2	80.2	4.67	d8-Valine
263	128	2.42	13C2-Taurine
266.1	113.9	4.98	Putrescine
267.1	68	3.42	c4-OH-Proline
267.15	68	2.78	t4-OH-Proline
267.3	43	4.91	Leucine
267.3	69	4.92	Isoleucine
268.2	87	3.06	Asparagine
269.2	116.2	3.72	Aspartate
270.2	89.2	2.94	15N2-Asparagine
272.2	119.2	3.72	d3-Aspartate
273.2	91.2	4.92	13C6-Isoleucine
282.2	130	3.06	Glutiamine
283.2	130.2	3.7	Glutamate
285.1	104.2	4.6	Methionine
286.2	133.2	3.7	d3-Glutamate
287.2	135	3.06	d5-Glutamine
288.1	107.2	4.6	d3-Methionine
289.2	137.2	4.41	Dopamine
291.1	110.2	2.42	Histidine
293.1	141.1	4.41	d4-Dopamine
297.1	115.2	2.42	13C6-Histidine
297.1	144.2	4	alpha-AAA (alpha-Aminoadipic-acid)

Q1	Q3	Retentionszeit	Analyte
301.2	120.2	4.97	Phenylalanine
301.2	88.1	3.42	Met-SO (Methionine sulfoxide)
306.2	125.2	4.97	d5-Phenylalanine
310	217	2.77	Arginine
310.2	217.3	3.84	Ac-Orn (Acetylnornithine)
311.2	113.1	3.44	Citrulline
312	219	2.77	15N2-Arginine
312.3	160.2	4.52	Serotonin
316.1	118.2	3.44	13C-d4-Citrulline
316.3	164.2	4.52	d4-Serotonin
317.2	136.1	4.41	Tyrosine
321.2	140.1	4.41	d4-Tyrosine
333.1	198.1	4.17	DOPA (Dihydrophenylalanine)
336.1	201.1	4.17	d3-DOPA
338.2	46	3.3	ADMA (asymmetric Dimethylarginine)
338.2	70.1	3.41	SDMA (symmetric Dimethylarginine)
340.2	188.2	4.9	Tryptophan
342.2	189.2	4.9	15N2-Tryptophan
344.2	146.2	4.86	Kynurenine
345.2	77.2	3.3	d7-ADMA
362.2	110.1	2.46	Carnosine
362.2	136.1	4.86	Nitro-Tyrosine
363.2	270.1	4.98	d4-Putrescine
403.2	310.2	4.79	Ornithine
409.2	316.2	4.79	d6-Ornithine
417.2	324.2	4.88	Lysine
551.2	193.2	5.45	Spermidine
743.3	193.2	5.66	Spermine
559.2	193.2	5.45	d8-Spermidine
751.3	193.2	5.66	d8-Spermine

**Tabelle 20 Schritt-für-Schritt Probenaufarbeitung entsprechend des Biocrates AbsoluteIDQ® Kit User Manual p180. Modifiziert nach [87].**

Schritt	Anweisungen
1	Plastikkappe von der Kit-Platte abnehmen. 10 µl des ISTD in alle Positionen außer in Position A (blank) geben. Bitte nicht an die Wände pipettieren und keine 8-Kanal-Pipette verwenden.
2	Mit einer Ein-Kanal-Pipette 10 µl der Proben in das Zentrum jeder Position pipettieren (PBS für zero samples, Biocrates Calibration Standards, QCs und eigene Proben). Dabei den Filter mit der Pipettenspitze leicht berühren.
3	Die Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Stickstoff bei 3,5 bar trocknen lassen. Die Nadeln des Verdampfers müssen min. 5 mm über dem Filter schweben.
4	Vorbereitung des Pre-Mix und der Derivatization Solution.
5	Die Derivatization Solution muss sofort verwendet werden. 50 µl auf jede Position pipettieren. Empfohlen wird eine Eppendorf Multipipette.
6	Abdecken der Platte mit der Plastikkappe. Während der Reaktion für 20 Minuten bei

	Raumtemperatur stehen lassen.
7	Plastikkappe wieder abnehmen und die Platte unter Stickstoff für 70 Minuten trocknen lassen.
8	300 µl der Extraction Solvent zu jeder Position zugeben. Empfohlen wird eine Eppendorf Multipipette oder eine 8-Kanal-Pipette.
9	Plastikkappe erneut aufsetzen und die Platte für 30 Minuten bei 450 rpm und Raumtemperatur schütteln.
10	Die Kit-Platte für 2 Minuten bei 500 xg (Zentrifuge ausbalancieren) zentrifugieren. Visuell kontrollieren, ob in allen Positionen die Füll-Level gleich sind. Falls nicht, bei höherem Druck oder höherer g wiederholen.
11	Vorsichtig das Klebeband von den Seiten der Kit-Platte entfernen. Die untere Platte (enthält die Proben-Extrakte, beschriftet mit „Use for FIA“) von der oberen Filter-Platte trennen.
12	Es werden benötigt: - die Platte aus Schritt 11 („Use for FIA“) - leere 96-deep-well Platte mit Beschriftung „Use for LC“ - leere 96-deep-well Platte mit Beschriftung „Use for FIA dilution – If required“ - 2 Silikonmatten
12	1. 50 µl jeder Position der ursprünglichen Platte werden auf die leere Platte „Use for LC“ gegeben. 2. 20 µl jeder Position der ursprünglichen Platte werden auf die leere Platte „Use for FIA dilution – If required“ gegeben.
13	<b>Dilute extracts for LC:</b> Platte „Use for LC“ verwenden. 250 µl 40% Methanol zu jeder Position dieser Platte zugeben und mit einer Silikonmatte abdecken. Für 2 Minuten bei 600 rpm schütteln.
14	<b>Dilute extracts for FIA:</b> Platte „Use for FIA dilution- If required“ verwenden. 380 µl der FIA Mobile Phase zu jeder Position dieser Platte zugeben und mit einer Silikonmatte abdecken. Für 2 Minuten bei 600 rpm schütteln.
15	Beide Platten sind nun bereit für die Analyse.

**Tabelle 21 Vorbereitung der Reagenzien entsprechend des Biocrates AbsoluteIDQ® Kit User Manual p180. Modifiziert nach [87].**

Standard	Prozess
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Entsprechend der Herstelleranleitung zubereiten. Wird als Zero Sample verwendet.
Internal Standard Mix (ISTD)	- bis zum Gebrauch nicht lösen - vor dem Öffnen für 2 Minuten bei 10,000 xg zentrifugieren - ISTD muss vor den Proben auf die Kit-Platte pipettiert werden 1. 1200 µl HPLC grade water zu dem ISTD zugeben 2. für 15 Minuten bei 1200 rpm schütteln und einige Male vortexen
Calibration Standards (Cal1-Cal7)	- bis zum Gebrauch nicht lösen - vor dem Öffnen für 2 Minuten bei 10,000 xg zentrifugieren 1. 100 µl HPLC grade water zu jedem der sieben Calibration Standards zugeben. 2. für 15 Minuten bei 1200 rpm schütteln und einige Male vortexen 3. kurz anzentrifugieren
Quality Control Samples (QC1-QC3)	- bis zum Gebrauch nicht lösen - vor dem Öffnen für 2 Minuten bei 10,000 xg zentrifugieren 1. 100 µl HPLC grade water zugeben und für 15 Minuten bei 1200 rpm schütteln 2. Vortexen und bei 4°C für 5 Minuten bei 2750 xg zentrifugieren
Plasma Samples	Vortexen und bei 4°C für 5 Minuten bei 2750 xg zentrifugieren.
Pre-Mix for Derivatization	1900 µl Ethanol 1900 µl H <sub>2</sub> O 1900 µl Pyridin Alle Mengen in das mitgelieferte Plastikröhrchen pipettieren und 10 Sekunden vortexen.
Phenylisothiocyanate (PITC) Derivatization	Erst kurz vor der Derivatisierung vorbereiten!

Solution	300 µl PITC zu dem Pre-Mix geben und so lange vortexen, bis die Lösung klar wird.
Extraction Solvent	19 mg Ammoniumacetat in 50 ml HPLC grade Methanol lösen.
Mobile Phase LC Part	<b>Solvent A:</b> 2 ml Ameisensäure zu 1000 ml Wasser geben. <b>Solvent B:</b> 1 ml Ameisensäure zu 500 ml Acetonitril geben.
Mobile Phase FIA Part	Inhalt einer Ampulle (Biocrates Solvent I) in 290 ml HPLC grade Methanol geben.

**Tabelle 22**

**Plasmakonzentration der Steroidhormone in Patient\*innen mit ACA und ACC in der Gesamtgruppe**

Konzentrationen [nmol/l] als Median und IQR dargestellt. Für Werte unter LLOQ wurde 0,5xLLOQ angenommen und in kursiv gedruckt. Eigene Darstellung.

Steroid Bezeichnung	Plasmakonzentrationen der 15 Steroide, Median (IQR, nmol/l) der Gesamtgruppe	
	ACA (n=66)	ACC (n=42)
11-Deoxycorticosteron	0,08 (0,03-0,15)	0,29 (0,06-2,89)
Corticosteron	4,03 (2,62-7,54)	4,02 (2,39-9,14)
Aldosteron	0,09 (0,04-0,19)	0,04 (0,01-0,13)
Progesteron	0,08 (0,08-0,18)	0,55 (0,08-1,35)
17-OHP	1,13 (0,56-2,27)	2,10 (1,06-7,38)
21-Deoxycortisol	<i>0,10</i> ( <i>0,10-0,10</i> )	<i>0,10</i> ( <i>0,10-0,17</i> )
11-Deoxycortisol	1,99 (1,32-3,10)	3,03 (1,21-20,24)
Cortisol	269,10 (191,82-397,44)	378,12 (223,15-596,85)
Cortison	52,77 (46,88-64,47)	54,71 (43,14-65,30)
DHEA	2,67 (1,10-4,62)	5,43 (2,48-11,19)
DHEAS	1468,82 (766,25-2730,33)	3279,10 (1498,63-8089,35)
Androstendion	3,10 (1,94-4,83)	4,03 (1,85-6,81)
Testosteron	1,73 (0,41-12,11)	1,86 (0,72-7,17)
Dihydrotestosteron	<i>0,28</i> ( <i>0,28-0,81</i> )	<i>0,28</i> ( <i>0,28-0,65</i> )
Estradiol	<i>0,06</i> ( <i>0,06-0,06</i> )	0,22 (0,06-0,46)

Tabelle 23

**Plasmakonzentration der Steroidhormone in Patient\*innen mit ACA und ACC in der Gruppe der hormonell Inaktiven**

Konzentrationen [nmol/l] als Median und IQR dargestellt. Für Werte unter LLOQ wurde 0,5xLLOQ angenommen und in kursiv gedruckt. Eigene Darstellung.

Steroid Bezeichnung	Plasmakonzentrationen der 15 Steroide, Median (IQR, nmol/l) der hormonell inaktiven Gruppen	
	ACA (n=42)	ACC (n=16)
11-Deoxycorticosteron	0,05 (0,03-0,13)	0,10 (0,04-1,30)
Corticosteron	3,96 (2,45-6,96)	4,42 (2,89-7,53)
Aldosteron	0,11 (0,06-0,20)	0,06 (0,02-0,13)
Progesteron	0,08 (0,08-0,11)	0,17 (0,08-0,66)
17-OHP	1,27 (0,58-2,70)	1,09 (0,39-1,80)
21-Deoxycortisol	<i>0,10</i> ( <i>0,10-0,10</i> )	<i>0,10</i> ( <i>0,10-0,10</i> )
11-Deoxycortisol	1,81 (1,28-3,07)	1,61 (0,95-3,40)
Cortisol	231,84 (188,51-372,60)	245,64 (194,65-324,99)
Cortison	54,85 (44,25-64,06)	48,47 (32,13-59,90)
DHEA	3,41 (1,98-7,51)	4,89 (2,02-11,49)
DHEAS	1838,74 (1379,39-3245,23)	2552,82 (1398,36-5176,10)
Androstendion	3,19 (2,29-4,37)	2,23 (1,36-4,12)
Testosteron	5,48 (0,60-13,57)	1,07 (0,40-8,94)
Dihydrotestosteron	<i>0,28</i> ( <i>0,28-1,18</i> )	<i>0,28</i> ( <i>0,28-1,01</i> )
Estradiol	<i>0,06</i> ( <i>0,06-0,06</i> )	<i>0,06</i> ( <i>0,06-0,42</i> )

Tabelle 24

**Plasmakonzentration der Steroidhormone in Patient\*innen mit ACA und ACC in der Gruppe der Cortisol-Produzierenden**

Konzentrationen [nmol/l] als Median und IQR dargestellt. Für Werte unter LLOQ wurde 0,5xLLOQ angenommen und in kursiv gedruckt. Eigene Darstellung.

	<b>Plasmakonzentrationen der 15 Steroide, Median (IQR, nmol/l) der Cortisol-produzierenden Gruppen</b>	
	<b>ACA (n=24)</b>	<b>ACC (n=21)</b>
<b>Steroid Bezeichnung</b>		
11-Deoxycorticosteron	0,11 (0,07-0,24)	0,52 (0,10-3,38)
Corticosteron	5,70 (2,94-10,87)	3,84 (2,21-12,09)
Aldosteron	0,06 (0,03-0,15)	0,01 (0,01-0,12)
Progesteron	0,08 (0,08-0,19)	0,70 (0,37-2,65)
17-OHP	0,88 (0,46-1,56)	4,64 (1,82-9,76)
21-Deoxycortisol	<i>0,10</i> ( <i>0,10-0,10</i> )	<i>0,10</i> ( <i>0,10-0,86</i> )
11-Deoxycortisol	2,10 (1,56-3,81)	8,12 (2,96-30,01)
Cortisol	379,50 (203,00-546,48)	593,40 (386,40-731,40)
Cortison	52,21 (48,27-65,51)	60,39 (51,52-78,25)
DHEA	1,61 (0,60-3,24)	5,90 (1,76-21,53)
DHEAS	775,06 (207,32-1690,36)	5257,40 (1516,25-13780,30)
Androstendion	2,75 (1,49-5,60)	5,83 (2,62-8,88)
Testosteron	0,81 (0,32-6,20)	1,88 (1,08-7,89)
Dihydrotestosteron	<i>0,28</i> ( <i>0,28-0,28</i> )	<i>0,28</i> ( <i>0,28-0,44</i> )
Estradiol	<i>0,06</i> ( <i>0,06-0,06</i> )	0,23 (0,17-0,59)

**Tabelle 25 Liste der per p180 Kit bestimmten Metaboliten**

(X) Zeigen die von der statistischen Analyse ausgeschlossenen Metaboliten an.  
Modifiziert nach [88].

Metabolitklasse	Abkürzungen	Analyte (X)= von der statistischen Analyse ausgeschlossen
Aminosäuren	Ala	Alanine
	Arg	Arginine
	Asn	Asparagine
	Asp	Aspartate
	Cit	Citrulline
	Gln	Glutamine
	Glu	Glutamate
	Gly	Glycine
	His	Histidine
	Ile	Isoleucine
	Leu	Leucine
	Lys	Lysine
	Met	Methionine
	Orn	Ornithine
	Phe	Phenylalanine
	Pro	Proline
	Ser	Serine
	Thr	Threonine
	Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosine	
Val	Valine	
biogene Amine	Ac-Orn	Acetylornithine (X)
	ADMA	Asymmetric dimethylarginine (X)
	SDMA	Symmetric dimethylarginine
	alpha-AAA	alpha-Amino adipic acid (X)
	Histamine	Histamine (X)
	Met-SO	Methionine sulfoxide (X)
	Kyn	Kynurenine
	Putrescine	Putrescine (X)
	Sarcosine	Sarcosine
	Spermidine	Spermidine
	Spermine	Spermine (X)
	Serotonin	Serotonin
	PEA	Phenylethylamine (X)
	Nitro-Tyr	Nitrotyrosine (X)
	cis-OH-Pro	cis-4-Hydroxyproline (X)
	trans-OH-Pro	trans-4-Hydroxyproline (X)
	Creatinine	Creatinine
Carnosine	Carnosine (X)	



Metabolitklasse	Abkürzungen	Analyte (X)= von der statistischen Analyse ausgeschlossen
	Taurine	Taurine (X)
	DOPA	Dihydrophenylalanine (X)
	Dopamin	Dopamin (X)
Acylcarnitine	C0	Carnitine
	C2	Acetylcarnitine
	C3	Propionylcarnitine
	C3:1	Propenoylcarnitine (X)
	C3-OH	Hydroxypropionylcarnitine (X)
	C4	Butyrylcarnitine / Isobutyrylcarnitine (X)
	C4:1	Butenoylcarnitine (X)
	C4-OH (C3-DC)	Hydroxybutyrylcarnitine (X)
	C5	Valerylcarnitine (X)
	C5:1	Triglylcarnitine (X)
	C5:1-DC	Glutaconylcarnitine (X)
	C5-DC (C6-OH)	Glutarylarnitine (Hydroxyhexanoylcarnitine) (X)
	C5-M-DC	Methylglutarylarnitine (X)
	C5-OH (C3-DC-M)	Hydroxyisovalerylcarnitine (Methylmalonylcarnitine) (X)
	C6 (C4:1-DC)	Hexanoylcarnitine (Fumarylarnitine) (X)
	C6:1	Hexenoylcarnitine (X)
	C7-DC	Pimelylcarnitine (X)
	C8	Octanoylcarnitine (X)
	C9	Nonanoylcarnitine (X)
	C10	Decanoylcarnitine (X)
	C10:1	Decenoylcarnitine (X)
	C10:2	Decadienoylcarnitine (X)
	C12	Dodecanoylcarnitine (X)
	C12:1	Dodecenoylcarnitine (X)
	C12-DC	Dodecanedioylarnitine (X)
	C14	Tetradecanoylcarnitine (X)
	C14:1	Tetradecenoylcarnitine
	C14:1-OH	Hydroxytetradecenoylcarnitine (X)
	C14:2	Tetradecadienoylcarnitine (X)
	C14:2-OH	Hydroxytetradecadienoylcarnitine (X)
	C16	Hexadecanoylcarnitine (X)
	C16:1	Hexadecenoylcarnitine (X)
	C16:1-OH	Hydroxyhexadecenoylcarnitine (X)
C16:2	Hexadecadienoylcarnitine (X)	
C16:2-OH	Hydroxyhexadecadienoylcarnitine (X)	
C16-OH	Hydroxyhexadecanoylcarnitine (X)	
C18	Octadecanoylcarnitine (X)	
C18:1	Octadecenoylcarnitine	

Metabolitklasse	Abkürzungen	Analyte (X)= von der statistischen Analyse ausgeschlossen
	C18:1-OH	Hydroxyoctadecenoylcarnitine (X)
	C18:2	Octadecadienoylcarnitine
Lysophosphatidylcholine	lysoPC a C14:0	(X)
	lysoPC a C16:0	
	lysoPC a C16:1	
	lysoPC a C17:0	
	lysoPC a C18:0	
	lysoPC a C18:1	
	lysoPC a C18:2	
	lysoPC a C20:3	
	lysoPC a C20:4	
	lysoPC a C24:0	
	lysoPC a C26:0	
	lysoPC a C26:1	
	lysoPC a C28:0	
	lysoPC a C28:1	
		C[x:y] x=Anzahl C-Atome in Acylkette y=Anzahl Doppelbindungen a=Acylrest
Phosphatidylcholine	PC aa C24:0	
	PC aa C26:0	(X)
	PC aa C28:1	
	PC aa C30:0	
	PC aa C30:2	
	PC aa C32:0	
	PC aa C32:1	
	PC aa C32:2	
	PC aa C32:3	
	PC aa C34:1	
	PC aa C34:2	
	PC aa C34:3	
	PC aa C34:4	
	PC aa C36:0	
	PC aa C36:1	
	PC aa C36:2	
	PC aa C36:3	
	PC aa C36:4	
	PC aa C36:5	
	PC aa C36:6	
	PC aa C38:0	
	PC aa C38:1	
PC aa C38:3		
PC aa C38:4		
PC aa C38:5		
		C[x:y] x=Anzahl C-Atome in Acylkette y=Anzahl Doppelbindungen aa=Diacylrest ae=Acylalkylrest

Metabolitklasse	Abkürzungen	Analyte (X)= von der statistischen Analyse ausgeschlossen
	PC aa C38:6	
	PC aa C40:1	(X)
	PC aa C40:2	
	PC aa C40:3	
	PC aa C40:4	
	PC aa C40:5	
	PC aa C40:6	
	PC aa C42:0	
	PC aa C42:1	
	PC aa C42:2	
	PC aa C42:4	
	PC aa C42:5	
	PC aa C42:6	
	PC ae C30:0	
	PC ae C30:1	
	PC ae C30:2	
	PC ae C32:1	
	PC ae C32:2	
	PC ae C34:0	
	PC ae C34:1	
	PC ae C34:2	
	PC ae C34:3	
	PC ae C36:0	
	PC ae C36:1	
	PC ae C36:2	
	PC ae C36:3	
	PC ae C36:4	
	PC ae C36:5	
	PC ae C38:0	
	PC ae C38:1	
	PC ae C38:2	
	PC ae C38:3	
	PC ae C38:4	
	PC ae C38:5	
	PC ae C38:6	
	PC ae C40:1	
	PC ae C40:2	
	PC ae C40:3	
	PC ae C40:4	
	PC ae C40:5	

Metabolitklasse	Abkürzungen	Analyte (X)= von der statistischen Analyse ausgeschlossen
	PC ae C40:6	
	PC ae C42:0	(X)
	PC ae C42:1	
	PC ae C42:2	
	PC ae C42:3	
	PC ae C42:4	
	PC ae C42:5	
	PC ae C44:3	(X)
	PC ae C44:4	
	PC ae C44:5	
	PC ae C44:6	
	Sphingolipide	SM (OH) C14:1
SM (OH) C16:1		
SM (OH) C22:1		
SM (OH) C22:2		
SM (OH) C24:1		
SM C16:0		
SM C16:1		
SM C18:0		
SM C18:1		
SM C20:2		
SM C22:3		(X)
SM C24:0		
SM C24:1		
SM C26:0		
SM C26:1		
		(Hydroxy-) Sphingomyelin C[x:y] x=Anzahl C-Atome in Acylkette y=Anzahl Doppelbindungen
Monosaccharide	H1	Hexose (einschließlich Glucose)

**Tabelle 26 AUC-Werte der ROC-Analysen gelistet nach Gesamtgruppe und Hormonsekretionsstatus.**

<b>Gesamtgruppe</b>	<b>Inaktive</b>	<b>Cortisol- produzierende</b>
<b>Area Under the Curve</b>	<b>Area Under the Curve</b>	<b>Area Under the Curve</b>
Test Result Variable(s)    Area	Test Result Variable(s)    Area	Test Result Variable(s)    Area
Arg                                    ,749	Ala                                    ,698	Tyr                                    ,696
Ile                                    ,669	Arg                                    ,775	lysoPC a C26:0                 ,725
Leu                                   ,701	Asn                                   ,260	lysoPC a C26:1                 ,714
Lys                                   ,633	Ile                                    ,696	lysoPC a C28:0                 ,734
Met                                   ,638	Leu                                   ,707	PC aa C24:0                    ,721
Orn                                   ,652	Met                                   ,707	PC aa C32:0                    ,303
Ser                                   ,371	Trp                                   ,773	PC ae C36:4                    ,310
Trp                                   ,696	Tyr                                   ,689	
Tyr                                   ,681	Val                                   ,727	
Val                                   ,731	lysoPC a C16:0                 ,698	
lysoPC a C16:0                   ,626	lysoPC a C18:0                 ,702	
lysoPC a C18:0                   ,712	lysoPC a C18:1                 ,684	
lysoPC a C20:4                   ,659	lysoPC a C24:0                 ,817	
lysoPC a C24:0                   ,703	lysoPC a C26:0                 ,981	
lysoPC a C26:0                   ,862	lysoPC a C26:1                 ,965	
lysoPC a C26:1                   ,850	lysoPC a C28:0                 ,964	
lysoPC a C28:0                   ,860	lysoPC a C28:1                 ,683	
lysoPC a C28:1                   ,651	PC aa C24:0                    ,951	
PC aa C24:0                    ,852	PC aa C30:2                    ,805	
PC aa C30:2                    ,711	PC aa C32:1                    ,696	
PC aa C36:5                    ,640	PC aa C36:1                    ,746	
PC aa C40:3                    ,629	PC aa C38:1                    ,284	
PC aa C42:5                    ,645	PC aa C40:3                    ,721	
PC aa C42:6                    ,627	PC aa C42:2                    ,694	
PC ae C30:1                    ,699	PC aa C42:5                    ,751	
PC ae C38:1                    ,635	PC ae C30:1                    ,817	
PC ae C40:1                    ,654	PC ae C38:1                    ,706	
PC ae C42:1                    ,627	PC ae C40:1                    ,725	
PC ae C42:2                    ,623	PC ae C42:1                    ,698	
Serotonin                        ,624	C14:1                            ,710	
SM C20:2                        ,341	SDMA                            ,692	
SM C26:0                        ,653	SM C20:2                        ,314	
	SM C26:0                        ,817	

Tabelle 27 AUC-Werte der ROC-Analysen geschlechtsspezifisch gelistet

Männer		Frauen	
Area Under the Curve		Area Under the Curve	
Test Result Variable(s)	Area	Test Result Variable(s)	Area
Arg	,806	Arg	,715
Gln	,295	Leu	,670
Leu	,700	Val	,671
Met	,717	lysoPC a C17:0	,665
Trp	,749	lysoPC a C18:0	,688
Tyr	,776	lysoPC a C26:0	,863
Val	,771	lysoPC a C26:1	,853
lysoPC a C18:0	,732	lysoPC a C28:0	,822
lysoPC a C20:4	,729	PC aa C24:0	,839
lysoPC a C24:0	,746	PC aa C30:2	,742
lysoPC a C26:0	,860	PC aa C34:4	,663
lysoPC a C26:1	,851	PC aa C36:2	,667
lysoPC a C28:0	,898	PC aa C36:5	,682
lysoPC a C28:1	,783	PC aa C38:5	,679
PC aa C24:0	,873	SM C20:2	,325
PC ae C30:1	,824		
PC ae C38:1	,705		
PC ae C40:3	,711		
PC ae C42:2	,708		
SM C26:0	,754		

## I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

17OHP	17-Hydroxyprogesteron
21-DF	21-Deoxycortisol
5-JÜR	5-Jahres-Überlebensrate
A	Aldosteron
A.	Arteria
A4	Androstendion
ACA	Adrenocorticales Adenom
ACC	Adrenocorticales Karzinom
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
AGS	adrenogenitales Syndrom
AIC	Akaike Information Criteria
ANP	natriuretisches Atriumpeptid
AUC	Area Under The Curve
B	Corticosteron
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
Cal	Kalibratoren
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBG	corticosteroid binding globulin
CRH	Corticotropin-Releasing Hormon
CT	Computertomographie
CYP	Cytochrom P450
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	11-Deoxycorticosteron
DST	Dexamethasonhemmttest
E	Cortison
E2	Estradiol
EDP	Etoposid, Doxorubicin und Cisplatin
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ENaC	epithelialer Natriumkanal
ENSAT	European Network for the Study of Adrenal Tumors
ESE	European Society of Endocrinology
ESI	Elektrosprayionisation
F	Cortisol
FDG-PET	Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie
FIA	Flow Injection Analysis
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
HU	Hounsfield Units
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IQR	Interquartilsabstand
ISTD	Interner Standard
Ki67	Proliferationsmarker: Wachstumsfraktion der Zellen
LASSO	Least Absolute Shrinkage and Selection Operator
LC	Flüssigchromatographie
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie

LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie
LLOQ	lower limit of quantification
LOD	Limit of Detection
ML	Machine-Learning
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MRT	Magnetresonanztomographie
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NN	Nebenniere
NPV	Negativ Prädiktiver Wert
P4	Progesteron
PBS	Phosphate Buffered Saline
Phäo	Phäochromozytom
PITC	Phenylisothiocyanat
PKA	Proteinkinase A
PPV	Positiv Prädiktiver Wert
POMC	Proopiomelanocortin
QC	Qualitätskontrollen
R	Resektionsstatus: R0 – kein Residualtumor; R1 – mikroskopischer Residualtumor; R2 – makroskopischer Residualtumor; RX – Vorhandensein eines Residualtumors ungewiss
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROC	Receiver Operating Characteristics
S	11-Deoxycortisol
SRM	Selected Reaction Monitoring
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory Protein
T	Testosteron
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TNM	Tumor, Node (Lymphknoten), Metastasis: zur Klassifikation maligner Tumoren
UICC	International Union Against Cancer
V	Vena



## II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Histologie der Nebenniere .....	2
Abbildung 2	Steroidhormonbiosynthese .....	5
Abbildung 3	Diagnostischer Pfad bei Nebenniereninzidentalomen .....	9
Abbildung 4	Schematische Darstellung des Probendurchlaufs durch LC-Säule, Ionisation und Triplequadrupol (Tandem-MS).....	18
Abbildung 5	Exemplarisches Chromatogramm von 13 Steroidhormonen nach einem typischen MS-Lauf.....	18
Abbildung 6	Pipettierschema Steroid Kit.....	21
Abbildung 7	Schematische Darstellung der Festphasenextraktion.....	22
Abbildung 8	Pipettierschema p180 Kit .....	24
Abbildung 9	Derivatisierungsreaktion.....	27
Abbildung 10	Steroidhormonprofil bei ACA und ACC Patient*innen [nmol/l] .....	33
Abbildung 11	Profil ausgewählter Steroide bei hormoninaktiven und Cortisol- produzierenden NNR-Tumoren [nmol/l] .....	34
Abbildung 12	Geschlechtsspezifisches Steroidhormonprofil bei ACA und ACC Patient*innen .....	36
Abbildung 13	Diagnostische Aussagekraft einzelner Steroidhormone.....	38
Abbildung 14	Alternativ-Modelle für die Diagnose von ACC in männlichen Patienten ...	39
Abbildung 15	Modelle mit 6-Steroid-Signatur für die Diagnose von ACC .....	40
Abbildung 16	Alternativ-Modelle für die Diagnose von ACC in weiblichen Patientinnen	41
Abbildung 17	15-Steroid-Modell zur Diagnose von ACC.....	42
Abbildung 18	Signifikant unterschiedliche Metabolitkonzentrationen bei ACA und ACC .....	47
Abbildung 19	Diagnostische Aussagekraft einzelner Metaboliten .....	48
Abbildung 20	Signifikant unterschiedliche Metabolitkonzentrationen bei hormoninaktiven ACAs und ACCs. ....	51
Abbildung 21	Signifikant unterschiedliche Metabolitkonzentrationen bei Cortisol- produzierenden ACAs und ACCs. ....	52
Abbildung 22	Diagnostische Aussagekraft einzelner Metaboliten .....	53
Abbildung 23	Signifikant unterschiedliche Metabolitkonzentrationen im Vergleich der Männergruppen von ACA und ACC .....	55
Abbildung 24	Signifikant unterschiedliche Metabolitkonzentrationen im Vergleich der Frauengruppen von ACA und ACC .....	57
Abbildung 25	Diagnostische Aussagekraft einzelner Metaboliten .....	58
Abbildung 26	26-Metabolit Signatur der Gesamtgruppe .....	60

## III TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Stadieneinteilung des Nebennierenrindenzinoms nach der ENSAT- Klassifikation .....	7
Tabelle 2	LC-MS/MS Reagenzienkit MassChrom® Steroide im Serum/Plasma.....	19
Tabelle 3	Auflistung zusätzlich verwendeter Geräte und Materialien .....	20
Tabelle 4	Einheiten/ Messbereiche/ LLOQ.....	23
Tabelle 5	Verwendete Bestandteile des AbsoluteIDQ® p180 Kit .....	24
Tabelle 6	Nicht im Kit beinhaltete Ausrüstung .....	25
Tabelle 7	Übersicht über die verwendeten Regressionsmethoden .....	29

<b>Tabelle 8</b>	<b>Demographische und klinische Charakteristika der NNR-Tumor Patient*innen</b> .....	<b>32</b>
<b>Tabelle 9</b>	<b>Plasmakonzentration der Steroidhormone in Patient*innen mit ACA und ACC</b> .....	<b>37</b>
<b>Tabelle 10</b>	<b>Demographische und klinische Charakteristika der NNR-Tumor-Patient*innen der Metabolomics-Messung</b> .....	<b>43</b>
<b>Tabelle 11</b>	<b>Nomenklatur der Glycerophospholipide und Sphingolipide.</b> .....	<b>44</b>
<b>Tabelle 12</b>	<b>Metaboliten mit signifikant unterschiedlichen Plasmakonzentrationen des Gesamtgruppen-Vergleichs. Konzentrationen [<math>\mu</math>M] als Median und IQR dargestellt. Eigene Darstellung.</b> .....	<b>45</b>
<b>Tabelle 13</b>	<b>Metaboliten mit signifikant unterschiedlichen Plasmakonzentrationen des Vergleichs der hormoninaktiven Gruppen. Konzentrationen [<math>\mu</math>M] als Median und IQR dargestellt. Eigene Darstellung.</b> .....	<b>49</b>
<b>Tabelle 14</b>	<b>Metaboliten mit signifikant unterschiedlichen Plasmakonzentrationen des Vergleichs der Cortisol-produzierenden Gruppen. Konzentrationen [<math>\mu</math>M] als Median und IQR dargestellt. Eigene Darstellung</b> .....	<b>52</b>
<b>Tabelle 15</b>	<b>Metaboliten mit signifikant unterschiedlichen Plasmakonzentrationen des Vergleichs der Männergruppen. Konzentrationen [<math>\mu</math>M] als Median und IQR dargestellt. Eigene Darstellung</b> .....	<b>54</b>
<b>Tabelle 16</b>	<b>Metaboliten mit signifikant unterschiedlichen Plasmakonzentrationen des Vergleichs der Frauengruppen. Konzentrationen [<math>\mu</math>M] als Median und IQR dargestellt. Eigene Darstellung</b> .....	<b>56</b>
<b>Tabelle 17</b>	<b>In mindestens zwei Gruppenvergleichen statistisch signifikant diskriminierende Metaboliten</b> .....	<b>59</b>
<b>Tabelle 18</b>	<b>MRMs [m/z] der Steroide (Qualifier/Quantifier) und Isotopenstandards</b> ...	<b>84</b>
<b>Tabelle 19</b>	<b>MRMs [m/z] der Metaboliten (LC-Teil) und Isotopenstandards</b> .....	<b>85</b>
<b>Tabelle 20</b>	<b>Schritt-für-Schritt Probenaufarbeitung entsprechend des Biocrates AbsoluteIDQ<sup>®</sup> Kit User Manual p180. Modifiziert nach [87]</b> .....	<b>86</b>
<b>Tabelle 21</b>	<b>Vorbereitung der Reagenzien entsprechend des Biocrates AbsoluteIDQ<sup>®</sup> Kit User Manual p180. Modifiziert nach [87].</b> .....	<b>87</b>
<b>Tabelle 22</b>	<b>Plasmakonzentration der Steroidhormone in Patient*innen mit ACA und ACC in der Gesamtgruppe</b> .....	<b>88</b>
<b>Tabelle 23</b>	<b>Plasmakonzentration der Steroidhormone in Patient*innen mit ACA und ACC in der Gruppe der hormonell Inaktiven</b> .....	<b>89</b>
<b>Tabelle 24</b>	<b>Plasmakonzentration der Steroidhormone in Patient*innen mit ACA und ACC in der Gruppe der Cortisol-Produzierenden</b> .....	<b>90</b>
<b>Tabelle 25</b>	<b>Liste der per p180 Kit bestimmten Metaboliten</b> .....	<b>91</b>
<b>Tabelle 26</b>	<b>AUC-Werte der ROC-Analysen gelistet nach Gesamtgruppe und Hormonsekretionsstatus.</b> .....	<b>96</b>
<b>Tabelle 27</b>	<b>AUC-Werte der ROC-Analysen geschlechtsspezifisch gelistet</b> .....	<b>97</b>

#### **IV DANKSAGUNG**

An dieser Stelle sei allen Personen gedankt, die mich sowohl während der Entstehung der Dissertation als auch während meines gesamten Studiums begleitet haben. Zunächst gilt mein Dank meinen Eltern, die mir diese Ausbildung überhaupt erst ermöglicht haben. Eure Unterstützung und euer Vertrauen in mich tragen mich schon mein Leben lang. Ohne euch wäre ich heute nicht dort, wo ich bin – Danke.

Durch die Betreuung meines Promotionsvorhabens durch Matthias Kroiß, kam mir die Ehre zuteil, Mitglied eines beeindruckenden Teams zu werden. Vielen Dank an Matthias, der immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte – und ich hatte deren viele. Zwischen all den zahlreichen inhaltlichen Punkten, über die wir uns den Kopf zerbrachen, schaffte er es immer wieder, mich zum Lachen zu bringen. Mit seinem unerschöpflichen Tatendrang zog er mich in den Bann der Endokrinologie und begleitete mich auf einem entscheidenden Abschnitt meines Lebens. Ein großes Dankeschön gebührt auch Herrn Martin Fassnacht, der uns Doktoranden stets das Gefühl gab, ein wichtiger Teil der Abteilung zu sein.

Vielen Dank an Michaela Haaf, ohne sie wäre eine so große Studienkohorte nie zustande gekommen. Dank Martina Zink wurde ich in die Biobank eingearbeitet und konnte meine benötigten Proben finden. Ein großes Dankeschön geht auch an Meik Kunz und Johannes Vey vom Bioinformatischen Institut der Universität Würzburg für die produktive Zusammenarbeit.

Das Team der Klinischen Massenspektrometrie um Max Kurlbaum und Sabine Kendl unterstützte mich tatkräftig bei den Analysen im Labor. Vielen Dank dafür und für die Einführung in die Funktionsweise der Massenspektrometrie.

Meine Schwester Annabel und meine Großeltern gaben mir immer das Gefühl, an mich zu glauben und bestärkten mich in meinen Entscheidungen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund Carsten für seine langjährige Unterstützung und unvergleichlich optimistische Art bedanken, mit der er mich immer wieder motivierte weiterzumachen und mir half, das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

## V EIGENE VERÖFFENTLICHUNG UND KONGRESSTEILNAHME

### **Publikation:**

Schweitzer, S., et al., *Plasma steroid metabolome profiling for the diagnosis of adrenocortical carcinoma*. European Journal of Endocrinology, 2019. 180(2): p. 117-125.

### **Kongressteilnahme:**

61. Deutscher Kongress für Endokrinologie (Bonn):

Oral Symposium: „Steroid hormone panel analysis with LC-MS/MS in benign and malignant tumors - a retrospective study“.