

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. G. Ertl**

**Präklinische Evaluation von Aldosteronsynthaseinhibitoren als
PET-Tracer für die Differentialdiagnostik des
primären Hyperaldosteronismus
mit besonderem Fokus auf Cyanofluorphenylpyridinen und deren
Derivate**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Sabine Gabor
aus Zellingen**

Würzburg, Februar 2016



Referentin: Prof. Dr. med. Stefanie Hahner

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Tobias Langenhan

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2016

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	1
1.1	Nebenniere.....	1
1.1.1	Entwicklung und Anatomie der Nebenniere	1
1.1.2	Synthese der Steroidhormone der Nebenniere	2
1.1.3	Funktion und Regulation der Nebennierenrinde und ihrer Hormone.....	5
1.2	Erkrankungen der Nebenniere	9
1.2.1	Definition und klinisches Bild des primären Hyperaldosteronismus	9
1.2.2	Ursache und Prävalenz des primären Hyperaldosteronismus.....	9
1.2.3	Genexpression bei primärem Hyperaldosteronismus	10
1.2.4	Morbiditäten des primären Hyperaldosteronismus.....	11
1.2.5	Diagnostisches Vorgehen und Therapie des primären Hyperaldosteronismus	11
1.3	Bildgebende Verfahren in der Nebennierendiagnostik.....	16
1.4	Bisherige Ergebnisse von Aldosteronsynthaseinhibitoren in klinischen Studien	20
2	Zielsetzung.....	22
3	Material und Methoden	24
3.1	Geräte, Material, Reagenzien, Kits, Zellkulturen, Tiermodell	24
3.2	Neu entwickelte Aldosteronsynthaseinhibitoren	26
3.3	Zellbiologische Methoden	29
3.3.1	Y1	29
3.3.2	NCI-h295	30
3.3.3	V79	31
3.3.4	Vergleich der Proteinsequenzen CYP11B1 und CYP11B2 des Menschen, der Ratte und der Maus	33

3.4	Konzentrationsabhängige Inhibition der Aldosteronsynthese und 11β-Hydroxylase in den Zelllinien Y1B1, Y1B2, NCI-h295 und V79B1, V79B2 und Selektivität gegenüber der Aldosteronsynthese.....	34
3.4.1	Y1B1, Y1B2 und V79B1, V79B2	34
3.4.2	NCI-h295	35
3.4.3	Aldosteronmessung	35
3.4.4	Cortisolmessung	36
3.4.5	IC ₅₀ Werte und Selektivitätsfaktor	37
3.5	Zeitabhängige Traceraufnahme in die NCI-h295 Zellen.....	37
3.5.1	Messung am Gammacounter und Auswertung.....	39
3.6	Histologische Methoden	39
3.6.1	Gefrierschnitte	39
3.6.2	Bindungsstudie an humanen Gewebeschnitten (Imaging)	40
3.6.3	Hämatoxylin-Eosin Färbung	41
3.6.4	Immunhistochemische Färbung der humanen Gewebeschnitte durch Anti-CYP11B1 und Anti-CYP11B2 Antikörper.....	42
3.7	<i>Ex-vivo</i> Nebennierenversuche.....	43
4	Ergebnisse	45
4.1	Konzentrationsabhängige Inhibition der Aldosteronsynthese und 11β-Hydroxylase und Selektivität der neuen Aldosteronsynthaseinhibitoren	45
4.1.1	IC ₅₀ Werte und Selektivitätsfaktoren der neuen Aldosteronsynthaseinhibitoren in den Zelllinien Y1B1 und Y1B2	45
4.1.2	IC ₅₀ Werte und Selektivitätsfaktoren der neuen Aldosteronsynthaseinhibitoren in der Zelllinie NCI-h295	48
4.1.3	IC ₅₀ Werte und Selektivitätsfaktoren der neuen Aldosteronsynthaseinhibitoren in den Zelllinien V79B1 und V79B2	48
4.2	Ergebnisse der zeitabhängigen Traceraufnahme in die NCI-h295 Zellen	49
4.3	Ergebnisse der Bindungsstudien an humanen Gewebeschnitten.....	52

4.4	Ergebnisse der <i>ex-vivo</i> Nebennierenversuche	56
5	Diskussion.....	60
6	Zusammenfassung	67
7	Literaturverzeichnis	68

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis:

17-KSR	17-Ketosteroid-Reduktase
3β-HSD	3 β -Hydroxysteroidhydrogenase
A.d.	Aqua destillata
ACC	aldosteronproduzierendes Karzinom
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AK	Antikörper
APA	aldosteronproduzierendes Adenom
BSA	bovines Serumalbumin
CO₂	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
CPA	cortisolproduzierendes Karzinom
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CT	Computertomographie
CYP	Cytochrom P450 Enzyme
DHEA	Dihydroepiandrosteron
DMEM	<i>Dulbeccos modified essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	Deoxycorticosteron
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HRP	Meerrettichperoxidase
IC₅₀	Konzentration eines Inhibitors, die 50% einer Enzymaktivität inhibiert
Ig	Immunglobulin
IMTO	Iodmetomidat
LH	luteinisierendes Hormon
min	Minuten
MRT	Magnetresonanztomographie

MTO	Metomidat
nNN	normale Nebenniere
O₂	Sauerstoff
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PET	Positronenemissionstomographie
PFA	Paraformaldehyd
PHA	primärer Hyperaldosteronismus
RIA	Radioimmunessay
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSS	11-Deoxycortisol
SF	Selektivitätsfaktor
SPECT	Einzelphotonenemissionscomputertomographie
v/v	Verhältnis von Volumen zu Volumen
w/v	Verhältnis von Gewicht zu Volumen

1 Einleitung

1.1 Nebenniere

1.1.1 Entwicklung und Anatomie der Nebenniere

Die Nebenniere ist ein paarig angelegtes Organ, das sich anatomisch am apikalen Pol der Niere befindet. Sie ist eingelagert in die die Nieren umgebende Fettkapsel. Eine Nebenniere ist ca. 5x3x1 cm groß und wiegt ca. 5 g. Trotz der geringen Größe dieses Organs erfolgt die Blutversorgung durch drei Arterien. [1-3]

Die Arteria suprarenalis superior, abgehend aus der Arteria phrenica inferior, versorgt den cranialen Teil der Nebenniere. Die Arteria suprarenalis media entspringt etwas oberhalb der Nierenarterien aus der Aorta und erreicht die Nebenniere an ihrem anteromedialen Abschnitt. Die Arteria suprarenalis inferior tritt von caudal in die Nebenniere ein und wird von der Arteria renalis abgegeben. Der Blutfluss erfolgt größtenteils von außen nach innen über gefensterte Sinusoide und sammelt sich im Nebennierenmark, um über die Vena suprarenalis die Nebenniere zu verlassen. Das Blut der linken Nebenniere fließt über Vena renalis sinistra und das der rechten Nebenniere direkt über die Vena cava inferior ab. [1, 2]

Makroskopisch gliedert sich die Nebenniere in zwei Zonen, Nebennierenrinde und Nebennierenmark. Das Mark wird komplett von der Rinde umschlossen und zeigt sich makroskopisch im Anschnitt beige-grau, die Rinde imponiert aufgrund des hohen Lipidgehaltes leicht gelblich. Das Mark entsteht während der Embryonalzeit aus der ektodermalen Neuralleiste und gehört zum sympathischen Nervensystem. Die Rinde geht aus mesodermalem Zölomepithel hervor. [1, 4]

Im histologischen Schnitt zeigt sich neben der Aufteilung in Rinde und Mark, dass die Rinde aus drei Zonen besteht. Diese lassen sich mikroskopisch wie folgt von außen nach innen in Zona glomerulosa, Zona fasciculata und Zona reticularis aufgliedern. Der Zona glomerulosa liegt die Kapsel der Nebenniere an.

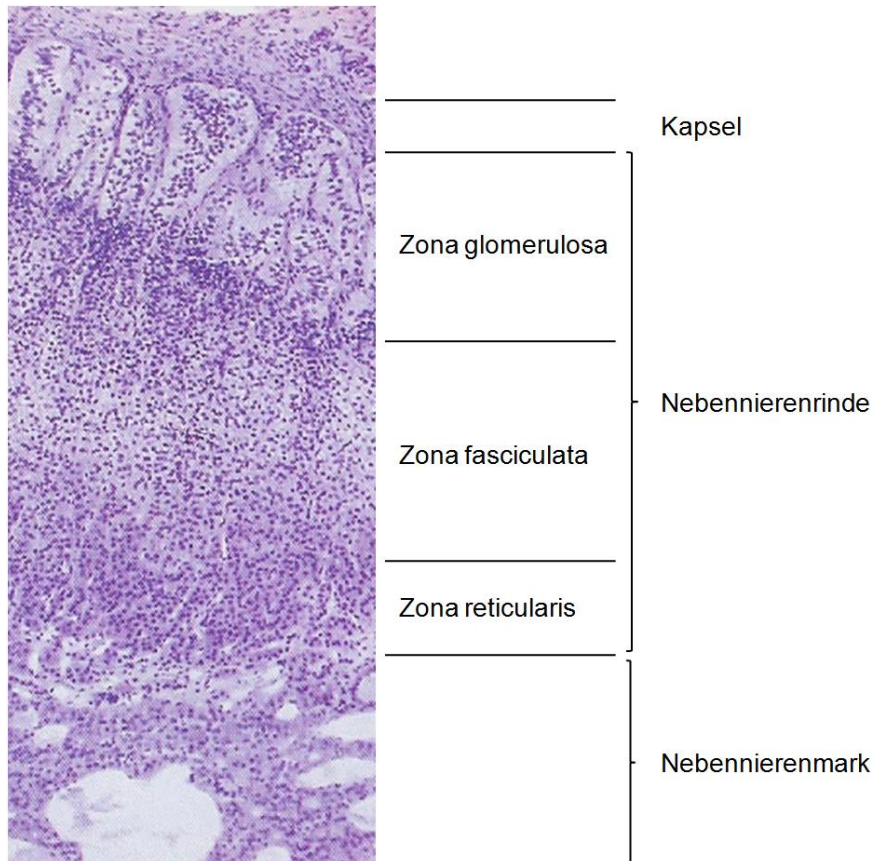


Abbildung 1: Histologie Nebenniere. (Abbildung aus der Sammlung der Endokrinologie der Universitätsklinik Würzburg)

1.1.2 Synthese der Steroidhormone der Nebenniere

Alle Steroidhormone werden aus einem einzigen Vorläufermolekül gebildet, dem Cholesterin. Cholesterin kann zum einen über die Nahrung aufgenommen werden, zum anderen aber auch aus Acetyl-CoA synthetisiert werden. Bei ausgewogener Ernährung wird ca. ein Drittel über die Nahrung aufgenommen, der Rest wird neu synthetisiert [5].

Über die Cholesterindesmolase und Cytochrom-P450-Monooxygenasen werden mittels O_2 und $NADPH/H^+$ am Cholesterinmolekül Reaktionen katalysiert, die vor allem aus Seitenkettenverkürzungen und Hydroxylierungen bestehen [6].

Aus Cholesterin wird über CYP11A (P-450 scc: 20, 22-Hydroxylase/20, 22-Desmolase) Pregnenolon. Pregnenolon wird entweder über die 3β -Hydroxysteroidhydrogenase (3β -HSD) Progesteron oder über CYP17 (P-450 c17: 17-Hydroxylase) 17-

Hydroxypregnenolon. CYP17 katalysiert außerdem die Reaktion Progesteron zu 17-Hydroxyprogesteron. Aus 17-Hydroxypregnenolon wird über die 3 β -HSD 17-Hydroxyprogesteron. Progesteron ist die Vorläufersubstanz für die Aldosteronsynthese und dient nach Hydroxylierung zu 17-Hydroxyprogesteron als Vorläufersubstanz für die Cortisolsynthese sowie Androstendionsynthese, genau wie Hydroxypregnenolon ebenfalls als Vorläufersubstanz dient [7]. (Abbildung 2)

Steroidhormone sind lipophile Hormone, sie können die Zellmembranen überwinden und binden an intrazellulär bzw. intranukleär gelegenen Rezeptoren. Alle Steroidhormone sind Aktivatoren ligandengesteuerter Transkriptionsfaktoren [6].

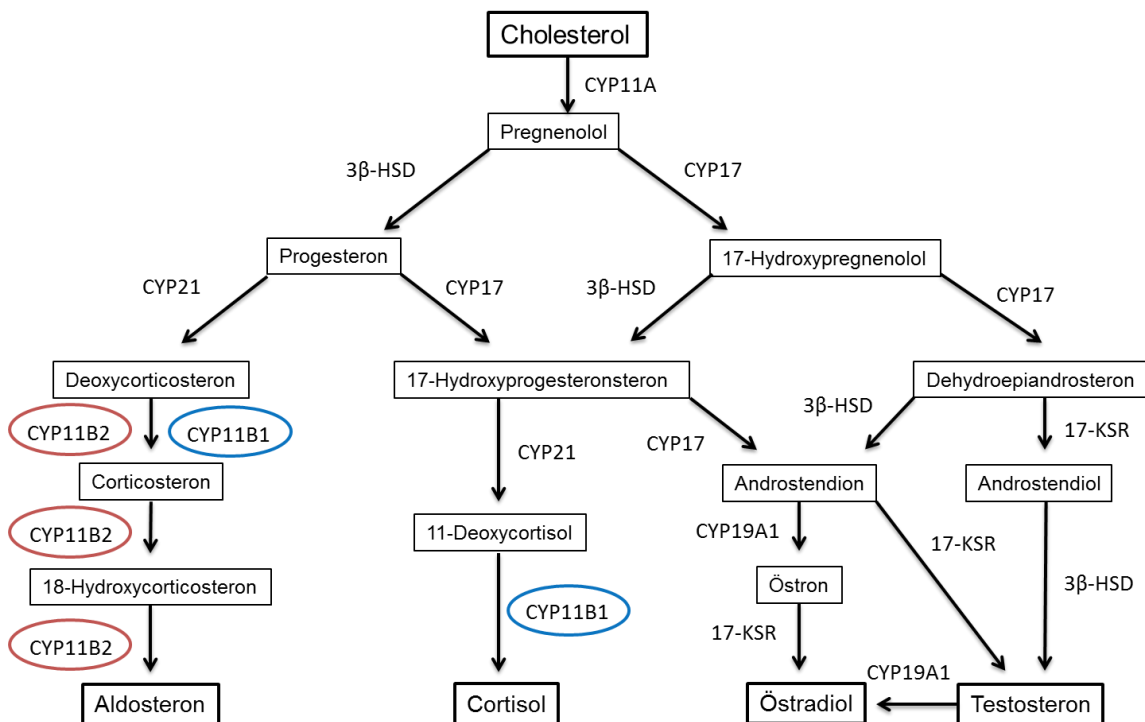


Abbildung 2: Überblick über die einzelnen Schritte der Steroidbiosynthese ausgehend vom Cholesterin. Farblich markiert sind die Aldosteronsynthese (CYP11B2) und die 11 β -Hydroxylase (CYP11B1). (Die Graphik wurde orientiert an Abbildungen aus [6, 7] erstellt)

1.1.2.1 Synthese der Glucocorticoide

Aus der Vorstufe 17-Hydroxyprogesteron entsteht über CYP21 (P-450 c21: 21-Hydroxylase) 11-Deoxycortisol (RSS) und daraus über CYP11B1 (P-450 c11: 11 β -Hydroxylase) Cortisol. Diese Reaktionen verlaufen an der Mitochondrienmembran bzw. im Mitochondrium [7]. (Abbildung 2)

1.1.2.2 Synthese der Mineralkortikoide

Wie bei der Glucocorticoidsynthese verläuft die Mineralkortikoidsynthese ab der, durch CYP21 (P-450 c21: 21-Hydroxylase) katalysierten Reaktion an der Mitochondrienmembran bzw. im Mitochondrium ab. Progesteron wird über CYP21 zu Deoxycorticosteron (DOC). Entweder CYP11B1 oder CYP11B2 katalysieren die Reaktion DOC zu Corticosteron, daraus entsteht über CYP11B2 (P-450 c11: 18-Hydroxylase) 18-Hydroxycorticosteron und weiter über CYP11B2 (P-450 c11: 18-Aldehyd-Synthetase, Aldosteronsynthase) Aldosteron [7]. (Abbildung 2)

1.1.2.3 Synthese der Androgene

Die Androgensynthese verläuft vollständig im endoplasmatischen Retikulum. Aus den Vorläufersubstanzen 17-Hydroxypregnenolon bzw. 17-Hydroxyprogesteron werden über die CYP17 (P-450 c17; 17,20 Desmolase) Dehydroepiandrosteron (DHEA) bzw. Androstendion gebildet. Aus DHEA kann über die 3 β -HSD Androstendion werden. Aus Androstendion entsteht über die Aromatase (P-450) Östron. Die 17-Ketosteroid-Reduktase (17-KSR) katalysiert die folgenden drei Reaktionen, DHEA zu Androstendiol, Adrostendion zu Testosteron und Östron zu Östradiol. Außerdem kann aus Androstendiol über die 3 β -HSD Testosteron und daraus weiter mittels Aromatase Östradiol werden [7]. In der Nebennierenrinde läuft nur der Syntheseweg bis zu DHEA bzw. seinem Sulfat ab. Die weiteren Schritte bis zu Testosteron und Östradiol laufen in der Peripherie ab. (Abbildung 2)

1.1.3 Funktion und Regulation der Nebennierenrinde und ihrer Hormone

Die Nebennieren sind lebenswichtige Organe, wie bereits Elliott 1914 im Tierexperiment zeigte. Nach der Entfernung beider Nebennieren bei Katzen überlebten die Tiere maximal bis zum dritten Tag nach beidseitiger Adrenalektomie. Eine einseitige Adrenalektomie hingegen zeigte keine Beeinflussung des Gesamtüberlebens [8].

Die Nebennierenrinde hat entsprechend der Zonenaufteilung verschiedene Funktionen, wobei sich die Funktionen von Zona fasciculata und Zona reticularis überschneiden [9]. In der Zona glomerulosa läuft die Synthese der Mineralkortikoide ab. Die Zona fasciculata enthält vor allem die Zellen, die für die Glucocorticoidproduktion verantwortlich sind. In der Zona reticularis werden hauptsächlich die Sexualhormone, die Androgene DHEA und DHEA-sulfat synthetisiert. [5]

Im Nebennierenmark erfolgt die Produktion von Noradrenalin und Adrenalin, zwei Überträgerstoffe des sympathischen Nervensystems. Im Mark befinden sich zu 4/5 Adrenalin produzierende Epinephrozyten und zu 1/5 Noradrenalin produzierende Norepinephrozyten. Die Ausschüttung der beiden Hormone ist über direkte Innervation präganglionärer Fasern des sympathischen Nervensystems geregelt. Außerdem lässt die Blutversorgung u.a. über die Sinusoide aus der Rindenregion darauf schließen, dass Steroide aus der Nebennierenrinde auf direktem Weg Einfluss auf die Zellen des Nebennierenmarks nehmen. Die Katecholamine werden direkt ins Blut abgegeben und nehmen im gesamten Körper Einfluss auf die verschiedenen adrenergen Rezeptoren. Über die Erregung des sympathischen Nervensystems wird der Blutdruck erhöht, die Herzfrequenz beschleunigt, die Bronchien erweitert, die Glukosefreisetzung erhöht, der Antrieb und die Aufmerksamkeit gesteigert und somit wird der Körper darauf vorbereitet im Sinne eines „fight or flight“ („kämpfen oder fliehen“) Mechanismus, höchst leistungsfähig zu sein. [1, 10]

1.1.3.1 Androgene

In der Nebenniere ist die Androgenproduktion ACTH gesteuert und unterliegt nicht dem Regelkreis über LH und FSH aus der Hypophyse [11]. Die Funktion der adrenalen

Androgene ist noch nicht vollständig geklärt. Studien haben gezeigt, dass die Substitution von DHEA bei Frauen mit Nebennierenrindeninsuffizienz sinnvoll sein kann und in den Bereichen Wohlbefinden und Sexualität ein positiver Einfluss zu sehen ist [12-14]. Dies ist auf einen direkten Einfluss auf das Nervensystem und/oder die periphere Androgenproduktion zurückzuführen [12-14]. In der Peripherie entstandenes Testosteron bewirkt u.a. eine Ausbildung der sekundären Geschlechtsbehaarung und führt in der Pubertät zum Schluss der Epiphysenfugen [5].

1.1.3.2 Glucocorticoide

Pro Tag werden insgesamt ca. 20-30 mg Glucocorticoide produziert und die Plasmakonzentration schwankt tageszeitabhängig sehr stark und liegt zwischen ca. 6-25 µg/dl [11]. Die Produktion der Glucocorticoide wird über den Hypothalamus-Hypophysen-Regelkreis gesteuert und unterliegt dem Prinzip der negativen Rückkopplung (Abbildung 3). Dies bedeutet, dass bei ausreichender im peripheren Kreislauf vorhandener Hormonkonzentration die Ausschüttung der stimulierenden übergeordneten Regelstoffe aus dem Hypothalamus und der Hypophyse gehemmt werden und vice versa. Im Hypothalamus kommt es zur Ausschüttung des Releasinghormons Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH), sowohl nach einem zirkadianen Rhythmus, als auch stressinduziert. Das CRH wirkt auf die Hypophyse und induziert dort die Freisetzung von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH). ACTH gelangt über den Blutkreislauf zur Zona fasciculata der Nebennierenrinde und steigert dort die Synthese der Glucocorticoide.

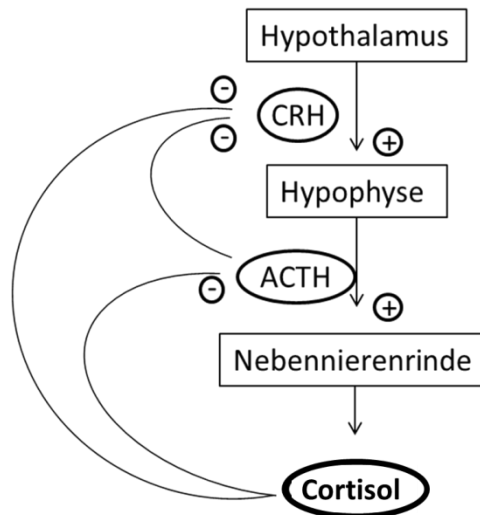


Abbildung 3: Regelkreis der Cortisolsekretion. Stimulation der Cortisolsekretion über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse und Prinzip der negativen Rückkopplung. (Die Darstellung wurde orientiert an [7, 15] erstellt)

Cortisol ist lipophil und bindet an den intrazellulär gelegenen Glucocorticoidrezeptor. Über die Bindung werden verschiedenste Wirkungen vermittelt. Neben einer immunsuppressiven und entzündungshemmenden Wirkung wird auch eine katabole Stoffwechsellage gefördert. Es kommt zur Hemmung der extrahepatischen Glukoseaufnahme und zur Steigerung der Glukoneogenese in der Leber. Unter anderem wird auch die Lipolyse und Proteolyse angeregt. Insgesamt ist Cortisol ein Stresshormon, das dem Körper genügend Energie für unterschiedlichste Stressreaktionen zur Verfügung stellt. [2, 3, 10]

1.1.3.3 Mineralkortikoide

Aldosteron wird in den Zellen der Zona glomerulosa produziert. Innerhalb von 24 Stunden werden 50-250 µg produziert und die Plasmakonzentration liegt bei 2-15µg/dl [11]. Das entscheidende Enzym, die Aldosteronsynthase (CYP11B2), das die Umwandlung von Corticosteron zu Aldosteron katalysiert, ist nur in der äußersten Schicht der Nebennierenrinde vorhanden. Die Ausschüttung unterliegt unter physiologischen Bedingungen jedoch hauptsächlich dem Regelkreis des Renin-Angiotensin-Systems. Bei Abfall des Blutdrucks, bei geringerer Durchblutung im Glomerulus in der Niere oder Abfall der Natriumkonzentration im distalen Tubulus

kommt es zur Freisetzung von Renin. Renin wird von den juxtaglomerulären Zellen der Niere abgegeben. Renin spaltet das in der Leber gebildete Angiotensinogen zu Angiotensin I. Über ein ubiquitär vorhandenes Angiotensin-Converting-Enzym wird aus Angiotensin I Angiotensin II. Neben dem Effekt der Vasokonstriktion führt Angiotensin II vor allem zu einer Aldosteronfreisetzung in den Glomerulosazellen [5]. Neueste Untersuchungen führen zu der Hypothese, dass in der Zona glomerulosa außerdem Zellcluster vorhanden sind, die Aldosteron unabhängig von einer Regulation über das Renin-Angiotensin-System konstitutiv produzieren [9]. Die Wirkung von Aldosteron entfaltet sich unter anderem in der Niere, im Colon und an Speicheldrüsen [16].

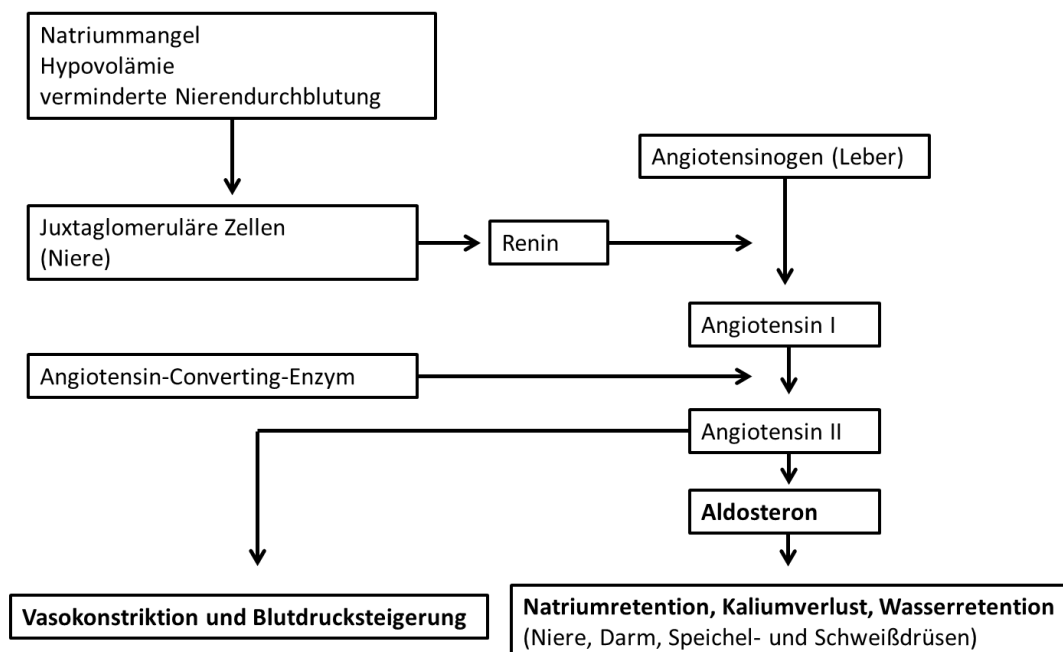


Abbildung 4: Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem (stark vereinfacht). (Abbildung modifiziert nach [7, 11])

In der Niere kommt es durch den Einfluss von Aldosteron am distalen Tubulus und Sammelrohr zur vermehrten Expression von epithelialen Natriumkanälen (ENaC) und zum vermehrten Einbau der Na^+/K^+ -ATPase in die basolaterale Membran der Tubuluszellen. Dies führt zu einer vermehrten Natrium- und Wasserrückresorption und zu einer Kaliumausscheidung. Insgesamt kommt es zu einer Erhöhung des

Plasmavolumens und damit zur Steigerung des Blutdrucks [17, 18]. Aber es gibt auch Effekte durch erhöhte Aldosteronkonzentrationen an verschiedensten Organen und Geweben, wie z.B. am Herzen. So spielen erhöhte Aldosteronkonzentrationen bei der Entwicklung der chronischen Herzinsuffizienz eine wichtige Rolle und chronisch erhöhte Aldosteronspiegel im Blut tragen zur kardialen Fibrosierung, Hypertrophie und damit folglich u.a. zu ventrikulären Arrhythmien bei [16, 19].

1.2 Erkrankungen der Nebenniere

Entsprechend der vielfältigen Funktionen der Nebenniere gibt es unterschiedlichste Pathologien mit Ursprung in diesem Organ. Ein wichtiges Krankheitsbild stellt der primäre Hyperaldosteronismus dar, der zu den Überfunktionssyndromen der Nebennierenrinde zählt.

1.2.1 Definition und klinisches Bild des primären Hyperaldosteronismus

Der primäre Hyperaldosteronismus (PHA) wurde im Jahre 1955 von Jerome Conn erstmals beschrieben und ist seither unter dem Begriff Conn Syndrom bekannt [20]. Der PHA beruht auf einer gesteigerten Bildung von Aldosteron, unabhängig von der Regulation durch das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem. Es kommt zu einer autonomen Aldosteronsekretion. Die klassische Conn Trias besteht aus arterieller Hypertonie, Hypokaliämie und metabolischer Alkalose [21]. Die Beschwerden der Patienten können sehr unspezifisch sein und reichen von Müdigkeit, Kopfschmerzen, Polyurie, Polydipsie, Muskelschwäche, Muskelkrämpfen bis hin zu Parästhesien und Lähmungserscheinungen [18, 21]. Es werden zwei Formen unterschieden, die normokaliämische und die hypokaliämische Variante. Erstere geht mit einem meist mildereren Krankheitsbild, oft lediglich mit arterieller Hypertonie, einher [17, 18]. Die primär von Conn beschriebene Form, die hypokaliämische Variante des Conn Syndroms ist die seltenere Form des PHA [22].

1.2.2 Ursache und Prävalenz des primären Hyperaldosteronismus

Dem PHA liegen in 99% zwei Ursachen zugrunde, das aldosteronproduzierende Adenom (APA) und die idiopathische bilaterale Nebennierenhyperplasie [21].

Unterschieden werden muss auch hier die normokaliämische von der hypokaliämischen Variante. Ursächlich liegt der normokaliämischen Verlaufsform in ca. 70% eine idiopathische bilaterale Nebennierenhyperplasie zugrunde. Die klassische hypokaliämische Variante zeigt in ca. 70% der Fälle als zugrundeliegende Ursache ein APA. Weitaus seltenere Ursachen sind die unilaterale Hyperplasie, die monogenetischen Formen des Hyperaldosteronismus Typ I-III und das aldosteronproduzierende Karzinom [17, 18, 23].

Unterformen des PHA	Häufigkeit
Idiopathische bilaterale Nebennierenhyperplasie	Ca. 70%
Aldosteronproduzierendes Adenom	Ca. 30%
Familiärer Hyperaldosteronismus Typ I-III	< 1%
Unilaterale Hyperplasie	<<1%
Aldosteronproduzierendes Karzinom	<<1%

Tabelle 1: Häufigkeit der Unterformen des primären Hyperaldosteronismus. (Tabelle erstellt nach [17])

Die Prävalenz des PHA wurde abhängig vom Grad der Hypertonie mit bis zu 13% bei Grad III Hypertonikern nach WHO (RR >180/110mmHg) und 20% bei therapierefraktärer Hypertonie angegeben [17, 18, 23-26]. Neuere Screeninguntersuchungen bei Hypertonikern deuten jedoch darauf hin, dass die Prävalenz mit bis zu 7% deutlich geringer ist als bisher angenommen [18, 27]. Dennoch stellt der PHA die häufigste Ursache einer sekundären und potentiell heilbaren Hypertonie dar [17, 28, 29].

1.2.3 Genexpression bei primärem Hyperaldosteronismus

Das für die Aldosteronproduktion entscheidende Enzym, die Aldosteronsynthase, wird ausschließlich in Aldosteron produzierendem Nebennierenrindengewebe exprimiert [9, 30]. Bei aldosteronproduzierenden Adenomen und der idiopathischen bilateralen Hyperplasie kommt es zu einer gesteigerten Expression der Aldosteronsynthase, die bei

einem APA bis auf ein Zehnfaches des Wertes in normalem Nebennierengewebe ansteigen kann und nicht mehr dem normalen Regelkreis unterworfen ist [20, 30-32]. Trotz niedriger Reninspiegel kommt es zu einer kontinuierlichen und gesteigerten Expression des CYP11B2 Gens, das für die Aldosteronsynthese codiert und nachfolgend zu einer autonomen Aldosteronproduktion [31, 33].

Bei einem einseitigen Adenom mit gesteigerter Expression der Aldosteronsynthese ist anzunehmen, dass es in der kontralateralen Nebenniere zur Suppression der Aldosteronsyntheseexpression kommt, da hier der physiologische Regelkreis zu einer Suppression der Enzymexpression führt [30].

1.2.4 Morbiditäten des primären Hyperaldosteronismus

Patienten mit PHA zeigen im Vergleich zu Patienten mit essentieller Hypertonie bei gleichen Blutdruckwerten erhöhte kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Morbiditäten [34]. So ist z.B. die Prävalenz für einen Schlaganfall 12,9% vs. 3,4% und für einen Myokardinfarkt bei 4% vs. 0,6% bei Patienten mit PHA vs. Patienten mit essentieller Hypertonie [35, 36]. Die beiden Unterformen des PHA, die hypo- bzw. normokaliämische Variante, zeigen im Vergleich gleich hohe zerebrovaskuläre Komorbiditäten. Die hypokaliämische Variante zeigt ein höheres Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse [37]. Insgesamt entwickeln Patienten mit PHA deutlich häufiger eine Niereninsuffizienz als Patienten mit essentieller Hypertonie. Die Prävalenz für eine chronische Niereninsuffizienz liegt bei 10,7% [17]. Deshalb ist sowohl die Diagnostik des PHA, als auch die Subtyppendifferenzierung von entscheidender Bedeutung für die Patienten und die anschließende Therapie.

1.2.5 Diagnostisches Vorgehen und Therapie des primären Hyperaldosteronismus

Unabhängig von der hypo- oder normokaliämischen Variante ist es von entscheidender Bedeutung für die Therapie, die Ursache für den PHA zu finden und zwischen unilateralem und bilateralem Ursprung zu unterscheiden. Bei unilateralem APA oder unilateraler adrener Hyperplasie ist die Therapie der Wahl eine laparoskopisch durchgeführte Adrenalektomie. Bei Patienten mit bilateraler Hyperplasie stellt die

lebenslange medikamentöse Therapie mit den Mineralokortikoidrezeptor-Antagonisten Spironolacton bzw. Eplerenon die Therapie der Wahl dar. [18, 23, 25, 38-41]

Erhöhtes Risiko für das Vorliegen eines PHA

Hypertoniker Grad II (RR > 160/179/100-109 mmHg)

Hypertoniker Grad III (RR > 180/110 mmHg)

Therapierefraktäre Hypertonie (RR >140/90 mmHg bei \geq drei antihypertensiv wirksamen Mediamenten)

Hypertonie mit spontaner oder diuretika-induzierter Hypokaliämie

Hypertonie und Vorliegen eines Inzidentaloms

Hypertonie und zerebrovaskuläres Ereignis in jungem Alter (<30 Jahre)

Hypertonie und Organschäden, die nicht mit der Schwere der Hypertonie korrelierbar sind

Tabelle 2: Überblick über Risikofaktoren für das Vorliegen eines primären Hyperaldosteronismus. (Tabelle erstellt nach [17, 25])

Deshalb sollten Patienten mit einem erhöhten Risiko für das Vorliegen eines PHA (Tabelle 2) daraufhin getestet werden [17, 42, 43]. Als Screeningtest hat sich die Bestimmung des Aldosteron-Renin-Quotienten bewährt [38, 42]. Hierfür werden die Plasma- oder Serumaldosteronkonzentration und die Plasmenreninkonzentration bestimmt und der Quotient daraus berechnet. Ist dieser Quotient erhöht (>25) besteht die Möglichkeit des Vorliegens eines PHA [42]. Die Aldosteronkonzentration sollte hierbei in die Interpretation des Befundes mit einbezogen werden, da alleinige stark erniedrigte Reninkonzentrationen, wie sie bei älteren Menschen vorkommen können, trotz normal niedriger Aldosteronkonzentrationen zu erhöhten Quotienten führen könnten und gezeigt werden konnte, dass Patienten mit einer Aldosteronkonzentration von ≤ 9 ng/dl stets negative Ergebnisse im Fluodrocortisonbestätigungstest zeigten [42]. Um mögliche Schwierigkeiten bei der Interpretation der Befunde zu vermeiden, sollte die Blutentnahme und Bestimmung der Renin- und Aldosteronkonzentrationen unter standardisierten Bedingungen erfolgen [42, 44]. Zu beachten ist insbesondere, dass einige Antihypertensiva einen Einfluss auf die Renin- und/oder

Aldosteronblutkonzentration aufweisen und somit den Quotienten beeinflussen können. Auch unter standardisierten Bedingungen und bei vermeintlich eindeutigen Ergebnissen muss sich daher an diesen Screeningtest ein Bestätigungstest anschließen [18, 25, 38, 42].

Hierfür stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, wie der orale oder intravenöse Kochsalzbelastungstest, der Fludrocortison-suppressionstest oder der Captopriltest [25, 42].

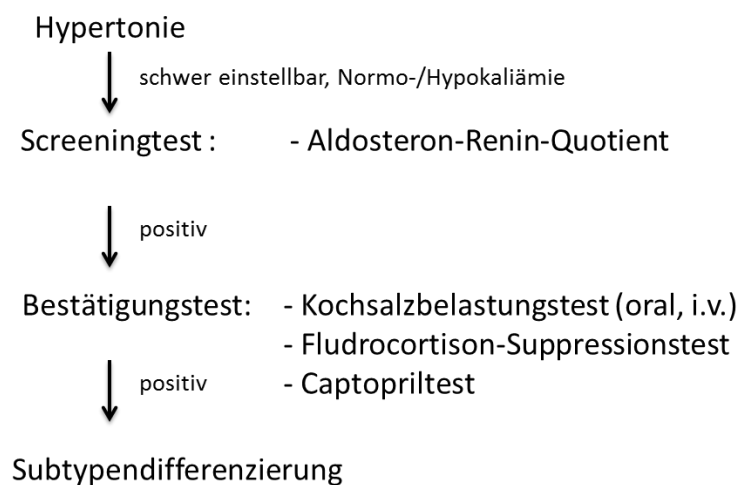


Abbildung 5: Flussschema zum diagnostischen Vorgehen bei Verdacht auf das Vorliegen eines primären Hyperaldosteronismus. (Abbildung modifiziert nach [17, 18, 25])

Bestätigt einer dieser Tests das Vorliegen eines PHA, sollte eine Subtyppendifferenzierung stattfinden, um die richtige Therapieentscheidung treffen zu können [18, 25, 38]. Als Goldstandard wird hierbei die seitengetrennte Nebennierenvenenkatheterisierung mit Bestimmung der Aldosteron- und Cortisolkonzentration im jeweiligen Nebennierenvenenblut und in der Peripherie angesehen [25, 38, 42, 45]. Eine Nebennierenbildgebung erfolgt in aller Regel zur Frage des Vorliegens eines Nebennierenrindenadenoms, aufgrund der mit zunehmendem Alter jedoch signifikant zunehmenden Inzidenz endokrin inaktiver Nebennierenrindenadenome und aufgrund der oftmals geringen Größe von Conn Adenomen weist die konventionelle Bildgebungsdiagnostik nur eine geringe Sensitivität und Spezifität auf. Die bildgebenden Verfahren Dünnschicht-CT und MRT der

Nebennieren haben eine geringe Spezifität und Sensitivität der Differenzierung des PHA. Die Angaben variieren in der Literatur mit ca. 53-80% [18, 23, 25, 46-48]. Beide Verfahren stoßen an ihre Grenzen in der Subtypendifferenzierung, können jedoch bei der Planung der seitengetrenten Nebennierenvenenblutentnahme hilfreich sein [18].

Der Orthostase-Test mit Bestimmung des Serumaldosterons und des Serumcortisols in Ruhe und nach vierstündiger Orthostase kann ergänzend zur Interpretation herangezogen werden. Bei bilateraler Hyperplasie ist meist eine gewisse Angiotensinsensitivität infolge einer Orthostase zu beobachten, die bei aldosteronproduzierenden Adenomen nicht erkennbar ist. Somit steigen die Aldosteronwerte bei Hyperplasie oftmals an, während sie bei vielen aldosteronproduzierenden Adenomen im Tagesverlauf korrespondierend zum Serumcortisol abfallen. Ein abfallender Serumaldosteronwert deutet mit hoher Spezifität auf das Vorliegen eines Conn Adenoms hin, während ansteigende Werte jedoch ein Conn Adenom nicht sicher ausschließen. [17]

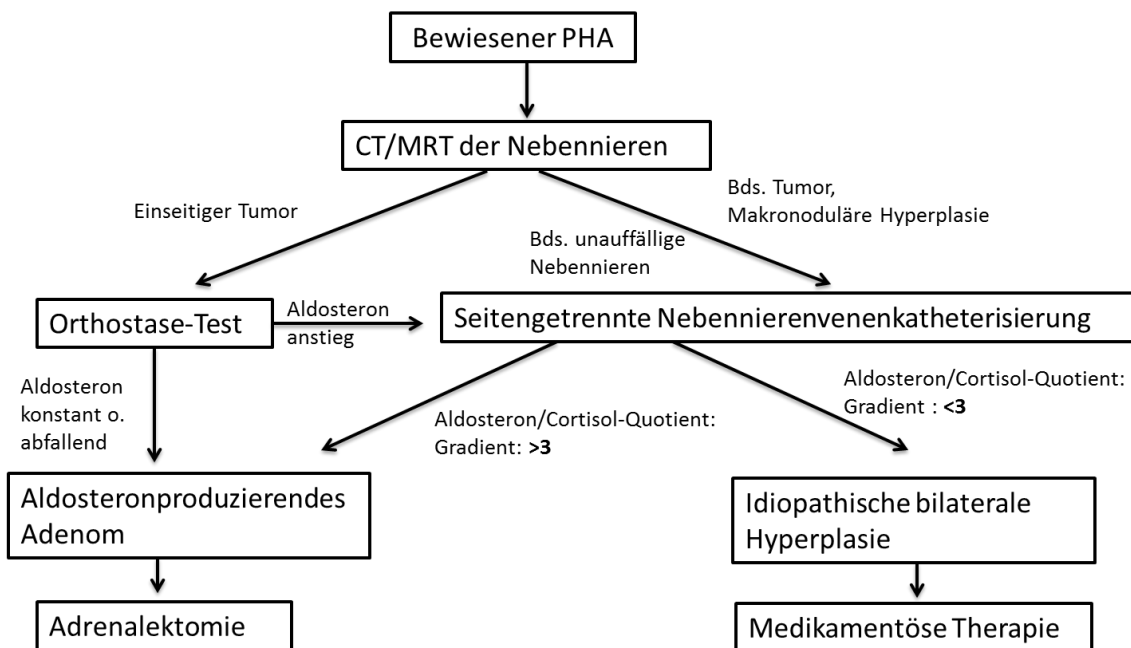


Abbildung 6: Vorgehensweise in der Differentialdiagnostik des bestätigten primären Hyperaldosteronismus. (Abbildung modifiziert nach [17, 45])

1.2.5.1 Nebennierenvenenkatheteruntersuchung

Somit stellt im Moment der seitengetrennte Nebennierenvenenkatheter den „Goldstandard“ in der Subtypendifferenzierung dar [25, 38, 41, 46]. Hierfür wird aus beiden Nebennierenvenen und einer peripheren Vene Blut entnommen und sowohl die Cortisol- als auch Aldosteronkonzentration bestimmt, um zum einen die selektive Katheterisierung zu verifizieren und zum anderen eine Aussage über die Lateralisation der Aldosteronproduktion treffen zu können [18, 25].

Experten stellen diese Bezeichnung als „Goldstandard“ in Frage [23]. Die Untersuchung ist technisch eine Herausforderung und die erfolgreiche bilaterale Katheterisierung gelingt in Zentren in 30,5-97% der Fälle [48-52]. Ergebnisse des Deutschen Conn Registers zeigen, dass bei 200 retrospektiv ausgewerteten Untersuchungen nur 30,5% bilateral selektive Ergebnisse lieferten. In 53% der Fälle konnte unilateral eine selektive Katheterisierung erfolgen und bei 16,5% gelang keine selektive Katheterisierung der Nebennierenvenen [51]. Die Durchführung der Untersuchung sollte durch einen in dieser Untersuchungstechnik erfahrenen Radiologen stattfinden [52]. Bisher gibt es auch noch keine Standardisierung der Untersuchungstechnik und die Interpretation der Befunde ist von Zentrum zu Zentrum unterschiedlich [23, 50, 52, 53]. Es gibt keinen einheitlichen Konsens, ab welchem gemessenen Cortisolkonzentrationsverhältnis von einer erfolgreichen Katheterisierung der Nebennierenvene auszugehen ist. Das Verhältnis variiert von 1,1:1 bis 5:1. Auch besteht keine einheitliche Meinung darüber, ob und in welchem Maße eine ACTH Stimulation erfolgen sollte [23].

Des Weiteren ist die Untersuchung für die Patienten invasiv, mit einer Strahlenbelastung verbunden und es werden Komplikationsraten von bis zu 13% beschrieben [23]. Diese beinhalten eine Dissektion der Nebennierenvene, den Nebenniereninfarkt und Blutungen [52]. Sollte es hierdurch zu Verwachsungen und Narbenbildung des Gewebes kommen, wäre eine ggf. zu einem späteren Zeitpunkt durchzuführende laparoskopische Adrenalektomie erschwert und mit einer größeren Komplikationsrate behaftet.

1.2.5.2 Therapie des primären Hyperaldosteronismus

Dennoch ist es von entscheidender Bedeutung für den Patienten, zwischen einem unilateralen Adenom und einer bilateralen Hyperplasie der Nebennierenrinde sicher zu unterscheiden, um die richtige Therapiestrategie zu wählen. Die Therapie der Wahl ist bei einem unilateralen aldosteronproduzierenden Adenom die unilaterale Adrenalectomie, die zur Heilung des Patienten führen kann [29, 45]. Hingegen werden Patienten mit einer bilateralen Hyperplasie der Nebennierenrinde lebenslang medikamentös behandelt [18, 38, 45]. Es stehen sich zwei völlig unterschiedliche therapeutische Vorgehensweisen mit nicht unerheblichen Konsequenzen für den Patienten gegenüber. Die Indikationsstellung zu einem operativen Vorgehen oder einer lebenslangen medikamentösen Therapie muss deshalb auf eine fundierte Diagnose zurückgehen.

In Anbetracht der hohen Prävalenz und der Bedeutung der Subtyppendifferenzierung für die Therapie stellt sich die Frage nach einer Untersuchungsmethode, die unabhängig vom Untersucher, nicht bzw. möglichst wenig invasiv für den Patienten und ubiquitär verfügbar ist und Ergebnisse mit möglichst hoher Sensitivität und Spezifität liefert.

1.3 Bildgebende Verfahren in der Nebennierendiagnostik

Die Zahl der oft nur zufällig neu entdeckten Nebennierenraumforderungen, als Inzidentalome bezeichnet, steigt stetig mit der Anzahl der durchgeführten abdominalen Bildgebungen wie CT und MRT [54, 55]. Die Ursache einer solchen Raumforderung ist mannigfaltig und zieht demnach unterschiedlichste Therapiestrategien mit sich [55, 56]. Deshalb besteht höchstes Interesse daran, die Raumforderungen bestmöglich zu charakterisieren.

In den letzten Jahren rückt immer häufiger eine Bildgebung auf molekularer Ebene in den Vordergrund. Im Bereich der Nebennierendiagnostik sind hier bereits große Schritte in Richtung des Nachweises der Enzyme der Steroidbiosynthese gegangen worden.

Etomidat und seine Analoga sind als potente Inhibitoren der CYP11B Enzyme CYP11B1 und CYP11B2 bekannt [57, 58]. Bislang wurden [^{11}C]Metomidat im PET

und PET-CT und [¹²³I]Iodmetomidat im SPECT/CT auf ihre Spezifität und Sensibilität im Nachweis adrenocorticalen Gewebes untersucht [59-61].

Ein Analogon des Etomidat, [¹²³I]Iodmetomidat, ist für die Nebennierenbildung zur Differenzierung von adrenocorticalen von nichtadrenocorticalen Gewebe in präklinischen und klinischen Untersuchungen zum Einsatz gekommen [57, 60, 62]. Für die Detektion von Gewebe adrenocorticalen Ursprungs konnten bereits vielversprechende Ergebnisse erzielt werden. Die Sensitivität und Spezifität für den Nachweis adrenocorticalen Gewebes ab einer Größe von 2 cm mittels [¹²³I]IMTO SPECT/CT ist mit 89% bzw. 85% beschrieben [60].

[¹³¹I]Iodmetomidat erwies sich zudem in einer kleinen Serie von Patienten mit fortgeschrittenem Nebennierenkarzinom als geeignet für eine gezielte Radionuklidtherapie [63].

Ein weiteres Analogon des Etomidat, das Metomidat wurde ebenfalls für die Differentialdiagnostik bei Patienten mit Raumforderungen der Nebenniere untersucht. In Studien konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von [¹¹C]Metomidat im PET ebenfalls eine sensitive und spezifische Untersuchungsmöglichkeit darstellt, um adrenocorticale Tumoren, wie aldosteronproduzierende Adenome, cortisolproduzierende Adenome und adrenocorticale Karzinome von anderen Tumoren nicht adrenocorticalen Ursprungs, wie Phäochromozytome oder Metastasen zu differenzieren [58, 59, 61]. Die Raumforderungen konnten ab einer Größe von 1-1,5 cm von normalem Nebennierenrindengewebe differenziert werden [61]. Außerdem ergaben sich Hinweise darauf, dass diese Untersuchung Einsatz in der Differentialdiagnostik des PHA finden könnte, da die Traceraufnahme der APAs höher lag als bei den restlichen untersuchten adrenocorticalen Tumoren [61]. Eine Suppression mit Dexamethason sollte es ermöglichen, noch kleinere Adenome bei PHA mittels [¹¹C]Metomidat PET zu differenzieren und eine Alternative zur Nebennierenvenenkatheteruntersuchung darzustellen [64]. Dies ist in dieser Studie nicht gelungen [64]. Jedoch konnte eine weitere Studie Hinweise darauf geben, dass der Einsatz von [¹¹C]Metomidat im PET-CT, statt PET alleine, eine spezifische, nicht invasive Alternative zur seitengetrenten Nebennierenvenenblutentnahme in der Differentialdiagnostik des PHA darstellen könnte [65]. Die Sensitivität wurde mit 76% und die Spezifität mit 87% bzw. 100% für

den Einsatz des [¹¹C]Metomidat PET-CT beschrieben [65]. Die Sensitivität und Spezifität der Nebennierenvenenkatheteruntersuchung liegt zwar bei 95% bzw. 100% [25], dies setzt jedoch die erfolgreiche bilaterale Katheterisierung voraus, die in manchen Zentren nur in ca. 30% der Fälle gelingt [51].

Es existieren einige limitierende Faktoren für den Einsatz der [¹¹C]Metomidat PET-CT Untersuchungsmethode. Um [¹¹C]Metomidat für die Bildgebung einzusetzen ist ein lokal vorhandenes Zyklotron für die Herstellung von [¹¹C] notwendig, da die Halbwertszeit lediglich 20 min beträgt [57, 65]. In Zellkulturversuchen wurde außerdem gezeigt, dass die Analoga des Etomidat sowohl an die Aldosteronsynthase, als auch an die 11β-Hydroxylase binden und beide Enzyme inhibieren [57]. Somit kann in der Bildgebung nicht unterschieden werden, um welches der CYP11B Enzyme es sich handelt, das dargestellt wird. Dies ist eben ein entscheidender Limitationsfaktor für den Einsatz von MTO oder auch IMTO in der Subtypendifferenzierung des PHA, da mit zunehmendem Alter die Koinzidenz endokrin inaktiver Adenome steigt und somit falsch positive Ergebnisse bei Untersuchungen auftreten können. Endokrin inaktive Nebennierenadenome weisen überwiegend eine CYP11B Expression auf und zeigten damit ebenfalls einen Uptake von [¹²³I]IMTO und [¹¹C]MTO [57, 59, 61, 65]. Somit könnten diese endokrin inaktiven Adenome fälschlicherweise als Conn Adenome interpretiert werden.

Die Schwierigkeit bei der Entwicklung eines geeigneten Radiotracers liegt darin, dass die beiden CYP11B-Enzyme auf Genebene zu 95% und auf Proteinebene zu 93% identisch sind [66, 67].

```

CYP11B1  MALRAKAEVC MAVPWLSLQR AQAIGTRAAR VPRTVLPFEA MPRRPGNRWL RLLQIWREQG YEDLHLEVHQ TFQELGPIFR
CYP11B2  ..... V.A..... .R..... A..... ..QH..... ..H...M... ..
Identity ***** :*:* ***** *:* ***** .***** **:* ***** ***** **,* ** *****

CYP11B1  YDLGGAGMVC VMLPEDVEKL QQVDSLHPR MSLEPWVAYR QHRGHKCGVF LLNGPEWRFN RLRLNPEVLS PNAVQRFLPM
CYP11B2  .N...PR... ..C..I..... ..D...K.....
Identity *:* **,* ***** ***** * * ***** ***** ***** *****:* ** *:* *****

CYP11B1  VDAVARDFSQ ALKKKVLQNA RGSLLTDVQP SIFHYTIEAS NLALFGERLG LVGHSPSSAS LNFLHALEVM FKSTVQLMFM
CYP11B2  .....
Identity ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

CYP11B1  PRSLSRWTSP KVKKEHFEAW DCIFQYDNC IQKIYQELAF SRPQQYTSIV AELLNAELS PDAIKANSME LTAGSVDTTV
CYP11B2  .....I... ..N...H..G... ..K...LE.....A
Identity ***** ** ***** ***** ***** .**,***,* *****:* ***** :***** *****

CYP11B1  FPLMLTLFEL ARNPNVQQAL RQESLAAAAS ISEHPQKATT ELPLLRAALK ETLRLYPVGL FLERVASSDL VLQNYHIPAG
CYP11B2  .....D...I..... ..V.....
Identity ***** *****:* ** ***** ***** ***** ***** ***** *****:* ***** *****

CYP11B1  TLRVRFLYSL GRNPALFPRP ERYNPQRWLD IRGSGRNFYH VPFQFGMRQC LGRRLAEAEEM LLLLHHVLKH LQVETLTQED
CYP11B2  ..Q..... ..A..... ..H..... ..FL.....
Identity **,* ***** **,* ***** ***** *****:* ***** ***** ***** ***** : *****

CYP11B1  IKMVYSFILR PSMFPLLTR AIN
CYP11B2  .....GTS.....
Identity ***** * . ***** **

```

Abbildung 7: Vergleich der Proteinsequenz der humanen 11 β -Hydroxylase (CYP11B1) und Aldosteronsynthase (CYP11B2). (Quelle für die Proteinsequenzen aus http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein, NP_000488.3 bzw. NP_000489.3)

Für den Einsatz einer Bildgebung in der Differentialdiagnostik des PHA ist es von Bedeutung, einen Tracer zu finden, der mit hoher Selektivität und Affinität an die Aldosteronsynthase bindet. Ein mit [¹⁸F] markierbarer Radiotracer, der hochspezifisch und hochaffin an die Aldosteronsynthase bindet, stellt eine Möglichkeit dar, in der PET Bildgebung zwischen unilateraler und bilateraler Tracerbindung zu unterscheiden und damit Rückschlüsse zu ziehen, welche Ursache dem primären Hyperaldosteronismus zugrunde liegt. Dies ist von entscheidender Bedeutung für die Einleitung der Therapie [18, 29, 38, 45].

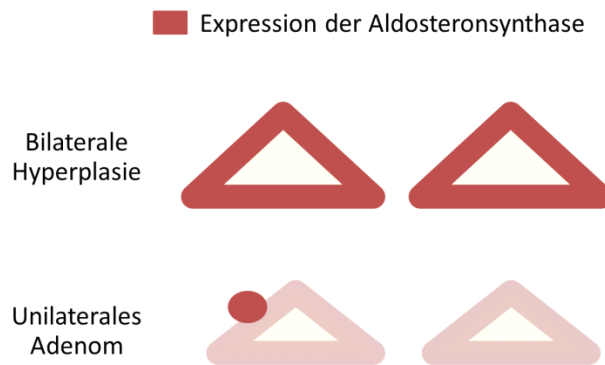


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Expression der Aldosteronsynthese bei bilateraler Hyperplasie und unilateralem Adenom.

1.4 Bisherige Ergebnisse von Aldosteronsynthaseinhibitoren in klinischen Studien

Die Rolle des Hormons Aldosteron bei der Entwicklung kardiovaskulärer und renaler Erkrankungen ist seit langem bekannt [68-70]. Mineralkortikoidrezeptorantagonisten gehören seit langem zur Therapie der Herzinsuffizienz, vor allem nach Myokardinfarkt und Nephropathien mit Proteinurie. Mineralkortikoidrezeptorantagonisten unterdrücken nur die rezeptorvermittelte Wirkung des Aldosterons und führen u.a. zu einem Anstieg der zirkulierenden Aldosteronkonzentration. LCI699 ist das erste oral einsetzbare und in klinischen Studien an gesunden Männern und Patienten getestete Medikament, das die Synthese des Aldosterons hemmt, indem es die Aldosteronsynthese inhibiert [71]. Somit würden auch die rezeptorunabhängigen Eigenschaften des Aldosterons reduziert [67].

Der Aldosteronsynthaseinhibitor LCI699 wurde in klinischen Studien bei Patienten mit Hypertonie und bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus auf die Effekte der Blutdruckreduktion, Plasmaaldosteronkonzentration und Hypokaliämie untersucht. Außerdem wurde der Einfluss der Inhibition der Cortisolsynthese untersucht. Es zeigte sich bei den getesteten Konzentrationen neben der Inhibition der Aldosteronproduktion zwar kein signifikanter Abfall der morgendlichen Cortisolkonzentration, jedoch erhöhte ACTH Spiegel und auch ein abgeschwächter Anstieg der Cortisolkonzentration nach ACTH Stimulation. Dieser Effekt ist auf eine zusätzliche Inhibition der 11β -

Hydroxylase zurückzuführen. Inwieweit eine regelmäßige Substitution zur Reduktion der Cortisol synthese führen würde, kann nicht beurteilt werden. Die Selektivität für die Aldosteronsynthase ist *in vivo* eingeschränkt, wie schon in *in vitro* Studien gezeigt werden konnte. [66, 71, 72]

Die geringe Selektivität von LCI699 hat mittlerweile dazu geführt, dass es im Rahmen klinischer Studien in höheren Konzentrationen zum Einsatz bei der medikamentösen Therapie des Cushing Syndroms kommt [73].

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation und präklinische Evaluation eines PET-Tracers für die spezifische Visualisierung aldosteronproduzierenden Gewebes.

Durch eine solche Bildgebungsmethode soll die belastende und mit einer hohen Misserfolgsrate behaftete Differentialdiagnostik des primären Hyperaldosteronismus in Form einer bilateralen Entnahme von Nebennierenvenenblut durch ein nicht-invasives, wenig belastendes und Untersucher-unabhängiges Bildgebungsverfahren ersetzt werden. Voraussetzung für eine Eignung als Tracersubstanz ist die hochspezifische und gleichzeitig hochaffine Bindung an das Zielenzym Aldosteronsynthase (CYP11B2).

Im Rahmen der Arbeit lagen in Würzburg durch die Radiochemie der Klinik für Nuklearmedizin neu entwickelte Aldosteronsynthaseinhibitoren aus verschiedenen Stoffgruppen vor: Imidazopyridine, Naphthylpyridine, Cyanofluorphenylpyridine und Cyanofluorphenylpyrazine.

Konkrete Fragestellungen der Arbeit hinsichtlich der neu entwickelten Substanzen waren:

- *In vitro* Inhibition der Aldosteron- und Cortisol synthese als indirekter Nachweis von Selektivität und Potenz der Inhibition des humanen Zielenzym Aldosteronsynthase (CYP11B2) im Vergleich zu dem Enzym 11 β -Hydroxylase (CYP11B1), das eine 93% Homologie in der Proteinsequenz aufweist. Vergleich zweier unterschiedlicher Zellkulturmodelle.
- *In vitro* Inhibition der Aldosteron- und Corticosteronsynthese als indirekter Nachweis von Selektivität und Potenz der Inhibition von CYP11B2 im Vergleich zu CYP11B1 am Rattenenzym in einem Zellkulturmodell.
- Inhibition der Aldosteronproduktion in *ex vivo* Analysen an murinen Nebennieren mit humanisierter Aldosteronsynthase.
- Membranpenetranz und zelluläre Aufnahme der radioflourierten Inhibitoren im Zeitverlauf in humane NCI-h295 Zellen.
- Bindung der radioflourierten Inhibitoren an adrenale und andere humane Gewebe. Verifizierung der Selektivität der Bindung an die Aldosteronsynthase

mittels immunhistochemischer Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen CYP11B1 und CYP11B2.

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Dissertation sollen die hochselektiven und hochaffinen Aldosteronsynthaseinhibitoren in *in vivo* Studien im Tiermodell getestet und ferner in klinischen Studien eingesetzt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte, Material, Reagenzien, Kits, Zellkulturen, Tiermodell

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Advance Sterilarbeitsbank	Sterilguard
Brutschrank FormaScientific	ThermoFischer
Cryo Biological Storage System Stickstofftank	Thermolyne
Deckgläschen	Marienfeld
Entellan	Merck
Falcons 15 ml und 50 ml	Greiner
Feinwaage	Denver Instrument
Gammacounter CB2111	Berthold
Gammacounter Wizard ² 2480	Perkin Elmer
Gefrierschrank	Genheimer
Gefrierschrank	Thermoscientific
Heizblock 3401	Thermostat
Heizschrank	Heraeus
Imageplate Reader CR35	Dürr Medical
Immulite® 2000	Siemens
Kryostat CM 1850	Leica
Kühlschrank PKM	Liebherr
Mikroskop Axioskop 2	Zeiss
Mikroskop Primovert	Zeiss
Mikrotiterplatten-Lesegerät 1420 Victor3	Perkin Elmer
Mikrowelle	Deawoo
Objektträger Superfrost Plus	Thermoscientific
Pipetboy	Brand
Pipetten	Cellstar Greiner Bio One
Pipetten Pipetman	Gilson
Reaktiongefäße 1,5 und 2ml	Sarstedt
sterile Spitzen/ sterile Filterspitzen	Sarstedt
Waage S72	Kern
Wasserbad	Memmert
Zählkammer	HBG Germany
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich
Zentrifuge Rotanta RPC	Hettich

Medien, Reagenzien, Puffer, Chemikalien, Lösungen	Hersteller	Konzentration
Aceton	Sigma	
ACTH	Novartis Pharma	1 µg/ml
Aqua destillata (A.d.)	Braun	
21-Hydroxyprogesteron (RSS)	Sigma	5 mM in EtOH
3,3`-Diaminobenzidintetrahydrochlorid	Dako	
5-Brom-4-chlor-3-inoxylphosphat	Sigma	
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma	2% (w/v) in 50 mM TRIS
Deoxycorticosteronacetat (DOC)	Sigma	5 mM in EtOH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma	
DMEM AQ Media	Sigma	
Eosin, Eosin G Lösung	Roth	1% wässrige Lösung
Ethanol (EtOH)	Sigma	
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma	
Geneticin	Gibco	50 mg/ml
Hämatoxylin, Hämalaun Lösung sauer nach Mayer	Roth	
Insulin	Sigma	10 mg/ml
Methanol	Sigma	
Natriumselenit	Sigma	4 µg/ml
Nitroblautetrazoliumchlorid	Sigma	
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	Sigma	0,8% (w/v) NaCl; 0,02% (w/v) KCl; 0,114% (w/v) Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O; 0,2% (w/v) KH ₂ PO ₄ ;
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	Sigma	10 mM Phosphat Puffer; 2,7 mM Kaliumchlorid; 137 mM Natriumchlorid
Penstrep	Sigma	10000 U/ml Penicillin; 10 mg/ml Streptomycin
PFA (Paraformaldehyd)	Roth	4% (w/v) in PBS
Puffer für die F[18] Inhibitoren		1% Tween 80 in PBS
RPMI-1640 (NCI)	Sigma	
Transferrin	Sigma	10 mg/ml
TRIS (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol) Puffer	Roth	50 mM, pH 7,4
Trypsin-EDTA	Sigma	0,25-0,5% (w/v) Trypsin; 0,2% (w/v) EDTA x 4 Na
Tween	BioChemica	0,05% (v/v) in 50 mM TRIS
Wasserstoffperoxid	Merck	
Zeocin	Invitrogen	100 mg/ml

Kits	Hersteller
Aldosterone ELISA	DRG
Coat-A-Count Aldosterone	Siemens
Corticosterone ELISA	DRG

Primär- und Sekundärantikörper	Hersteller
Anti-CYP11B1	zur Verfügung gestellt von Prof. Kuniaki Mukai, Keio Universität Tokyo
Anti-CYP11B2	zur Verfügung gestellt von Prof. Kuniaki Mukai, Keio Universität Tokyo
Anti-Kaninchen IgG - Alkalische-Phosphatase konjugiert	Sigma-Aldrich
AK-HRP (Horseradish-Peroxidase) konjugiert	Dako

Zellkulturen
Y1-hsCYP11B1
Y1-hsCYP11B2
NCI-h295
V79-CYP11B1
V79-CYP11B2

Humanisierte Mäuse	Hersteller
MRK0301	TaconicArtemis

3.2 Neu entwickelte Aldosteronsynthaseinhibitoren

Die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen wurden von Dr. Andreas Schirbel, Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universität Würzburg, im Rahmen eines Kooperationsprojektes synthetisiert, ebenso Iodmetomidat, das in dieser Arbeit als Referenzsubstanz in den einzelnen Versuchen zum Einsatz kam. Es handelt sich hierbei um 15 Substanzen aus verschiedenen Stoffgruppen. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden die Substanzen als Aldosteronsynthaseinhibitoren oder Inhibitoren bezeichnet, die mit [¹⁸F] radioaktiv markierten Substanzen werden als Tracer bezeichnet. Die Aldosteronsynthaseinhibitoren erhalten die Nummern 1-15. Hiervon gehören die Nummern 5 und 9 der Stoffgruppe der Imidazopyridine, die Nummern 3, 4 und 8 der Gruppe der Naphthylpyridine an und zur Gruppe der Cyanofluorphenylpyridine gehören

die Nummern 1, 2, 10-15 und die Nummer 6 der Stoffgruppe der Cyanofluorphenylpyrazine und die Nummer 7 zur Stoffgruppe der Naphthylpyrazine. Die [¹⁸F] Markierung der zu untersuchenden Aldosteronsynthaseinhibitoren erfolgte unmittelbar vor dem jeweiligen Einsatz der Substanz im Versuch durch Dr. Andreas Schirbel. Das Radionuklid [¹⁸F] hat eine Halbwertszeit von 110 min und wurde im Zyklotron der Universität Würzburg hergestellt. Das als Referenzsubstanz eingesetzte Iodmetomidat wurde für die Versuche mit [¹²⁵I] markiert und besitzt eine Halbwertszeit von 59,4 Tagen. Die nicht radioaktiv markierten Inhibitoren sind stabil und wurden bei einer Temperatur von 6-8°C gelagert und vor dem Einsatz in den verschiedenen Versuchsreihen auf Raumtemperatur gebracht.

Nr.	Strukturformel	Nr.	Strukturformel
1		9	
2		10	
3		11	
4		12	
5		13	
6		14	
7		15	
8			

Tabelle 3: Übersicht über die neuen zu testenden Aldosteronsyntheseinhibitoren mit Strukturformeln.

3.3 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit Zelllinien wurden, wenn nicht anders beschrieben, unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Die verwendeten Zelllinien wurden in 25, 75 bzw. 175 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle Waschschrte erfolgten mit sterilem PBS ohne Magnesium und Calcium bei Raumtemperatur. Y1 und V79 Zellen wurden mit Trypsin-EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Zur Passage wurden die Zellen in entsprechenden Verdünnungen in neue Kulturflaschen überführt.

Die Zellzahlbestimmung und Vitalitätsbeurteilung wurde nach Anfärben mit Trypanblau vorgenommen. In abgestorbene Zellen kann der Farbstoff eindringen und färbt diese kräftig blau an.

Zur Konservierung wurden die Zellen in entsprechendem Einfriermedium in Kryoröhrchen überführt und in einer Einfrierbox (Temperaturänderung: -1 °C pro min) bei -80 °C eingefroren. Nach 24 h wurden die Aliquots in flüssigen Stickstoff überführt und dort bis auf weiteres gelagert.

3.3.1 Y1

Yasumura etablierte im Jahre 1966 eine murine Zelllinie, die aus adhärent wachsenden und hormonproduzierenden Nebennierenrindenkarzinomzellen besteht, die Y1 Zelllinie [74].

Diese Zelllinie exprimierte nach Transfektion stabil das humane Enzym 11 β -Hydroxylase (CYP11B1) in der Y1-hsCYP11B1 (Y1B1) und das humane Enzym Aldosteronsynthase (CYP11B2) in der Y1-hsCYP11B2 (Y1B2) Zelllinie [57]. Die beiden adhärent wachsenden Zelllinien wurden für die Testung der verschiedenen Inhibitoren bezüglich der Inhibition von CYP11B1 und CYP11B2 eingesetzt. Vor den jeweiligen Versuchen wurde die entsprechende Hormonproduktion im Überstand der Zellen kontrolliert, sowie die Zellen auf Wachstum und Vitalität hin beurteilt.

Kultivierung der Y1 Zelllinie

Kulturmedium für Y1 Zellen	
Reagenz	Konzentration im Medium
DMEM AQmedia	
FCS	10%
Zeocin	1000 µg/ml (Y1B1) bzw. 2000 µg/ml (Y1B2)

Einfriermedium für Y1 Zellen	
Reagenz	Konzentration im Medium
DMEM AQmedia	
FCS	20%
DMSO	10%

Tabelle 4: Zusammensetzung des Kultur- und Einfriermediums der Y1 Zelllinie

Die Y1 Zellen haben eine Verdopplungszeit von 24-36 h und wurden in 175 cm² Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Passagiert wurden die Zellen alle 48-72 h.

3.3.2 NCI-h295

Im Jahre 1990 wurde von Gazdar et al. eine humane Zelllinie etabliert, die ursprünglich aus einem primären, invasiv wachsenden Nebennierenrindenzellkarzinom abstammte. Die Zelllinie exprimiert mit wenigen Ausnahmen alle relevanten humanen Enzyme der Steroidbiosynthese und entsprechende Hormone werden produziert [16, 75].

Für die Experimente wurden nur Suspensionszellen der NCI-h295 Zelllinie verwendet.

Kultivierung der NCI-h295 Zelllinie

Kulturmedium für NCI-h295 Zellen	
Reagenz	Konzentration im Medium
RPMI-1640	
FCS	10%
Insulin	5 µg/ml
Transferrin	100 µg/ml
Natriumselenit	5,2 ng/ml

Einfriermedium für NCI-h295 Zellen	
Reagenz	Konzentration im Medium
RPMI-1640	
FCS	20%
Insulin	5 µg/ml
Transferrin	100 µg/ml
Natriumselenit	5,2 ng/ml
DMSO	10%

Tabelle 5: Zusammensetzung des Kultur- und Einfriermediums der NCI-h295 Zelllinie

Ein Mediumwechsel erfolgte alle 48-72 h, wobei ungefähr 30% des alten Mediums wiederverwendet wurden, da damit von den Zellen produzierte Wachstumsfaktoren übertragen wurden. Die Passagierung erfolgte alle 96-120 h im Wechsel zum Mediumwechsel.

Die Suspensionszelllinien wurden für die Testung der verschiedenen Aldosteronsynthaseinhibitoren bezüglich der Inhibition von CYP11B1 und CYP11B2 eingesetzt, im Vergleich zur Y1 Zelllinie werden beide Enzyme simultan exprimiert. Diese Versuche wurden mit oben beschriebenem Kulturmedium durchgeführt.

Außerdem wurde mit dieser Zelllinie die zeitabhängige Aufnahme der Tracer in die Zelle überprüft. Für diese Versuche wurde dem Kulturmedium kein FCS hinzugefügt, da sich dies bei Vorversuchen als günstiger erwies.

3.3.3 V79

Die V79 Zelllinie ist eine adhärent wachsende Zelllinie aus Lungenfibroblastzellen des chinesischen Hamsters. Die freundlicherweise von Prof. Hartmann (Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Universität des Saarlandes) zur Verfügung gestellten

Zelllinien V79-CYP11B1 und V79-CYP11B2 exprimieren die Enzyme der Ratte stabil. Ziel war, die konzentrationsabhängige Inhibition der CYP11B1 und CYP11B2 Enzyme am Rattenenzym zu testen, um eine Vergleichbarkeit zwischen humanen und murinen Enzymen zu untersuchen. Dies geschah in Überlegung zu nachfolgenden *in vivo* Studien, die am murinen Tiermodell erfolgen sollen.

Kultivierung der V79 Zelllinie

Kulturmedium für V79 Zellen	
Reagenz	Konzentration im Medium
DMEM AQmedia	
FCS	10%
Geneticin	0,1 mg/ml
Penstrep	1%
Einfriermedium für V79 Zellen	
Reagenz	Konzentration im Medium
DMEM AQmedia	
FCS	20%
DMSO	10%

Tabelle 6: Zusammensetzung des Kultur- und Einfriermediums der V79 Zelllinie

Die V79 Zellen wurden genau wie für die Y1 Zellen zuvor beschrieben kultiviert und passagiert (siehe 3.3.1).

3.3.4 Vergleich der Proteinsequenzen CYP11B1 und CYP11B2 des Menschen, der Ratte und der Maus

CYP11B1	--MALRAKAE	VCMVAVPWSL	QRAQALGTRA	ARVPRTVLPF	EAMPRRPGNR	WLRLLQIWR	QGYEDLHLEV	HQTFQELGPI	FRYDLGGAGM
B1 Ratte	..VT.D	.WLR.QC	H.TR.T	KVA.K.LK	.I.QYSR.K	.KMI.L	.Q.N.M	.A.	.HSA.QI
B1 Maus	MT.VTTD	.WLR.QC	H.TR.T	TLA.K.LQ	.I.QYSR.K	.KMI.L	.Q.N.M	.V.R.	.HSV.KTQI
Identity	*****	*:*:*:*	*:*:*:*	*:*:*:*	*:*:*:*	*:*:*:*	*:*:*:*	*:*:*:*	*:*:*:*
CYP11B1	VCVMLPEDVE	KLQQVDSLHP	HRMSLEPWVA	YRQHRGHKCG	VFLNNGPEWR	FNRLRLNPEV	LSPNAVQRFL	PMVDAVARDF	SQALKKKVLQ
B1 Ratte	.S.A	.H.E.I.L	.P.	H.E.L.LRR	.AD.	.K.N	.N.V	.E.	.LE.R
B1 Maus	.F.T	.Y.E.T	C.P.S.IV	H.E.L.LGR	.Y	.Q.N	.K.K.V	.L.GI	.VDN.M.E
Identity	*:*:*:*	*:*:*:*	*:*:*:*	*:*:*:*	*:*:*:*	*:*:*:*	*:*:*:*	*:*:*:*	*:*:*:*
CYP11B1	NARGSLTLDV	QPSIFHYTIE	ASNLAIFGER	LGLVGHSPSS	ASLNFLHALE	VMFKSTVQLM	FMPRSLSRWT	SPKVVKEHFE	AWDCIFQYGD
B1 Ratte	.VH.MSINI	.SNM.N.M	.HFVIS	.T.DLKP	E.VT.T.H	S.T.L	.L.K.T	.TR.D	S.I.SE.VT
B1 Maus	SVH.FSM.F	.S.V.N	.HFV	.I.RDL.P	D.K.T.H	S.T.T.L	YL.T	.TR.NL	S.F.SE.VT
Identity	*****	*:*:*:*	*:*:*:*	*:*:*:*	*:*:*:*	*:*:*:*	*:*:*:*	*:*:*:*	*:*:*:*
CYP11B1	NCIQKIYQEL	AFSRPQQYTS	IVAELLNAE	LSPDAIKANS	MELTAGSVDT	TVFPLMLTLF	ELARNPNVQQ	ALRQESLAAA	ASISEHPQKA
B1 Ratte	K.KNV.R	.EG.Q.SWS	VIS.MVAQST	.M.H	.I.	.AIS.V	.D.	.VAN	
B1 Maus	K.KNV.R	.EG.Q.SWS	VT.VAERT	.M.Q	.I.T	.ST.V.F	.D.	.AAN	
Identity	*:*:*:*	*:*:*:*	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:
CYP11B1	TTELPLLR	LKETRLRYPV	GLFLERVASS	DLVLQNYHIP	AGTLVRFVFLY	SLGRNPALFP	RPERYNPQRW	LDIRGSGRNF	YHVPFPGMR
B1 Ratte	MSD	.S.V.IVH	.V	.F.IIY	.M.V	.M.V	.M.V	.ERK	.S.Q.LA
B1 Maus	MSD	.T.I.L	.V	.VLN.N	.M.V	.M.V	.M.V	.ERK	.S.K.LA
Identity	*****	*:*:*:*	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:
CYP11B1	QCLGRR	EMLLLHHV	KHLQVETLTQ	EDIKMYV	SFIRLPSM	FPPLT	FRAIN		
B1 Ratte	.V	.M	.TF.R	.MQ.FR.L	.M.SS.F	.PVS			
B1 Maus	.V	.M	.SFH.QEK	.VR.A.R.V	.M.SS	.PV			
Identity	*****	*:*:*:*	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:

Abbildung 9: Vergleich der CYP11B1 Proteinsequenz des Menschen, der Ratte und der Maus (Quelle für die Proteinsequenzen aus http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein: NP_000488.3, NP_036669, NP_001028401)

CYP11B2	--MALRAKAE	VCVAAPWLSL	QRARALGTRA	ARAPRTVLPF	EAMPQHGNR	WLRLLQIWR	QGYEHLHLEM	HQTFQELGPI	FRYNLGGPRM
B2 Ratte	MA.VT.D	.WLR.QC	H.T.T	TL.K.LK	.I.YSR.K	.KMI.L	.Q.N	.A.	.HSA.AQI
B2 Maus	MA.VT.D	.WLR.QC	H.T.T	TL.K.LQ	.I.YSR.K	.KMI.L	.Q.N	.V.R.	.HSV.KTQI
Identity	*****	*:*:*:*	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:
CYP11B2	VCVMLPEDVE	KLQQVDSLHP	CRMILEPWVA	YRQHRGHKCG	VFLNNGPEWR	FNRLRLNPDV	LSPKAVQRFL	PMVDAVARDF	SQALKKKVLQ
B2 Ratte	.S.A	.H.E.I.L	R.H.	H.E.L.LRR	.AD.	.K.N	.N.V	.E.	.LE.R
B2 Maus	.S.A	.H.E.ML	R.H.	H.E.L.LRR	.L	.K.N	.N.V	.E.	.LET.E
Identity	*:*:*:*	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:
CYP11B2	NARGSLTLDV	QPSIFHYTIE	ASNLAIFGER	LGLVGHSPSS	ASLNFLHALE	VMFKSTVQLM	FMPRSLSRWI	SPKVVKEHFE	AWDCIFQYGD
B2 Ratte	.M.	.Q.L.N	.F.	.L.DLNP	G.K.I.H	S.T.L	.L.K.T	.TR.D	.V.SE.AN
B2 Maus	.M.	.Q.L.N	.F.	.L.DL.P	G.K.I.H	S.S.L	.L.K.T	.TR.D	.V.SE.AN
Identity	*****	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:
CYP11B2	NCIQKIYQEL	AFNRPQHYTG	IVAELLKAE	LSLEAIKANS	MELTAGSVDT	TAFPLMLTLF	ELARNPDVQQ	ILRQESLAAA	ASISEHPQKA
B2 Ratte	R.W.VH	.RLGSS.T.S	.A.ITQGA	.P.D	.I.V	.A.T	.E	.AAN	
B2 Maus	R.W.VH	.RLGSS.T.S	.ISQGS	.P.D	.I.V	.K	.E	.AAN	
Identity	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:
CYP11B2	TTELPLLR	LKETRLRYPV	GLFLERVSS	DLVLQNYHIP	AGTLVQVFLY	SLGRNAALFP	RPERYNPQRW	LDIRGSGRNF	HHVPFPGMR
B2 Ratte	MSD	.G.I.LN	.V	.LLY	.M.P.V	.M.V	.M.V	.ERK	.S.Q.LA
B2 Maus	MSD	.G.I.L	.V	.LLY	.M.P.V	.M.V	.M.V	.ERK	.S.Q.LA
Identity	*****	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:
CYP11B2	QCLGRR	EMLLLHHV	KHFLVETLTQ	EDIKMYV	SFIRLPSM	FPPLT	FRAIN		
B2 Ratte	.V	.M	.T.Q.R	.VQ.A.R.V	.M.SS.V	.PVS			
B2 Maus	.V	.M	.T.Q.R	.VQ.A.R.V	.M.SS.V	.PVS			
Identity	*****	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:	*:*:*:

Abbildung 10: Vergleich der CYP11B2 Proteinsequenz des Menschen, der Ratte und der Maus (Quelle für die Proteinsequenzen aus http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein: NP_000489.3, NP_036670.2, NP_034121)

Die Proteinsequenzen CYP11B1 des Menschen und der Ratte bzw. Maus stimmen zu je 64% überein. Die CYP11B2 Proteinsequenzen stimmen zu je 69% zwischen Mensch und Ratte bzw. Maus überein. Für den Vergleich der Proteinsequenzen wurden die Sequenzen, wie bei <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein> angegeben, verwendet. Für die Proteinsequenzen des Menschen wurden die Referenzen NP_000488.3 und NP_000489.3, für die der Ratte die Referenzen NP_036670.2 und NP_036669 und für die Proteinsequenz der Maus die Referenzen NP_034121 und NP_001028401 verwendet. Der Vergleich der jeweiligen Proteinsequenzen untereinander erfolgte als Proteinblast auf <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Für die graphische Darstellung wurde das Programm GENtle verwendet.

3.4 Konzentrationsabhängige Inhibition der Aldosteronsynthese und 11 β -Hydroxylase in den Zelllinien Y1B1, Y1B2, NCI-h295 und V79B1, V79B2 und Selektivität gegenüber der Aldosteronsynthese

Die Inhibition der Aldosteronproduktion und Cortisolproduktion wurde an den Zellen der NCI-h295, V79B1, V79B2, Y1B1 und Y1B2 Linie getestet. Durch Zugabe der Inhibitoren in definierten Konzentrationen und Bestimmung der jeweiligen Aldosteron-, bzw. Cortisolkonzentration im Überstand konnte ein IC₅₀ Wert der entsprechenden Substanz bestimmt und ein Selektivitätsfaktor berechnet werden. Für jede unter 3.4.1 beschriebene Inhibitorkonzentration wurden drei unabhängige Versuchsansätze, jeweils im Duplikat, durchgeführt und entsprechende Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet.

3.4.1 Y1B1, Y1B2 und V79B1, V79B2

In beschichteten 6-Well-Platten wurden pro Well 2 ml Zellsuspension in entsprechendem Kulturmedium (siehe Tabelle) ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ bei 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellzahl der Y1 Zellen betrug 1 * 10⁶ pro Well, für die V79 Zellen 0,5 * 10⁶ Zellen pro Well. Nach 24 h waren die Zellen zu ca. 75% konfluent. Es wurde eine Verdünnungsreihe der neuen zu testenden Aldosteronsynthaseinhibitoren mit Kulturmedium erstellt. Die Endkonzentrationen der Inhibitoren lagen bei 10 μ M, 1 μ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM und 0,1 nM. Die

Vorläufersubstanzen Deoxycorticosteronacetat, für die Aldosteronsynthese in der Y1B2 bzw. V79B2 Zelllinie, bzw. 11-Deoxycortisol, für die Cortisolsynthese in der Y1B1 bzw. für die Corticosteronsynthese in der V79 Zelllinie, lagen in einer Konzentration von 1 μM vor. Die Zugabe der Vorläufersubstanzen ist notwendig, da beide Zelllinien diese nicht selbstständig synthetisieren. Es erfolgte die weitere Inkubation für 48 h. Nach insgesamt 72 h wurde je 1 ml des Überstands vorsichtig abgenommen und bis zur weiteren Hormonanalyse bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.4.2 NCI-h295

Von den NCI-h295 Suspensionszellen wurden $1 * 10^6$ Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. Die Zugabe von 1 ml der Inhibitoren mit entsprechenden Verdünnungen in Kulturmedium von 10 μM bis 0,1 nM erfolgte, ohne Vorinkubation von 24 h, gleich im Anschluss. NCI-h295 Zellen können alle Substanzen, die für die Aldosteron- und Cortisolsynthese nötig sind, selbst synthetisieren, weshalb keine Zugabe der Vorläufersubstanzen erfolgen musste. Nach 48 h Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 95% Luftfeuchtigkeit wurden 2 ml der Zellsuspension abgenommen, vorsichtig abzentrifugiert, der zellfreie Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Analyse aufbewahrt. Da sowohl die Aldosteronsynthese als auch die Cortisolsynthese in der Zelllinie simultan abläuft, wurden beide Parameter aus demselben Überstand bestimmt.

3.4.3 Aldosteronmessung

Die Messung der Aldosteronkonzentrationen der Proben aus den NCI-h295 Zellen und der Y1B2 Zellen erfolgte mittels Aldosteron-RIA Coat.A.Count der Firma Siemens. Das Testverfahren ist eine radioimmunologische Methode, um kleinste Mengen humanen Aldosterons quantitativ zu bestimmen. Der Radioimmunoassay beruht auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung von Aldosteron aus der zu untersuchenden Probe und einer bestimmten Menge radioaktiv markiertem Aldosterons, welche um die vorhandenen Antikörper konkurrieren. Die Antikörper sind stationär am Rand der Teströhrchen aus Polypropylen immobilisiert, in der flüssigen Phase befindet sich zum einen Aldosteron aus der Probe, zum anderen eine genau definierte Menge radioaktiv

markiertem [¹²⁵I]Aldosterons. Nach einer bestimmten Inkubationszeit wird die flüssige Phase entfernt und es bleiben die immobilisierten Antikörper mit gebundenem Aldosteron im Röhrchen zurück. Je mehr unmarkiertes Aldosteron in der Probe war und damit auch gebunden hat, desto weniger radioaktiv markiertes Aldosteron konnte binden und desto geringer ist die detektierte Gammastrahlung. Die Auswertung der Proben erfolgte nach einer Standardkurve, die bei jeder Messreihe neu mitgeführt und am Gammacounter ermittelt wurde.

Die Testdurchführung erfolgte entsprechend der Anleitung der Firma Siemens. Gemessen wurden alle Proben am Gammacounter.

Die Aldosteronkonzentration in den Überständen der V79B2 Zellen wurden mittels Aldosteron ELISA (enzym-linked immunosorbent essay) der Firma DRG bestimmt. Das Prinzip des DRG ELISA basiert auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung von zu messendem Aldosteron aus dem Überstand und zugegebenem Aldosteron-Enzymkonjugat, das mit Meerrettichperoxidase konjugiert ist, an stationär gebundene polyklonale Antikörper. Nach Entfernung des nicht gebundenen Konjugats wird ein Substrat zugegeben, das von der Meerrettichperoxidase zu einem farbigen Substrat umgesetzt wird. Entsprechend der gebundenen Menge des Aldosteron-Meerrettichperoxidase-Konjugats fällt die Intensität der Färbung aus, die gemessen wird. Somit ist die Intensität der Färbung umgekehrt proportional der Aldosteronkonzentration der zu messenden Probe. Die Messung erfolgte nach der Anleitung der Firma DRG. Die Extinktion wurde bei 450 nm gemessen. Bei jeder Messreihe wurde eine Standardkurve für die Berechnungen bestimmt und Kontrollen mitgeführt.

3.4.4 Cortisolmessung

Die Messung der Cortisolwerte aus den Proben der Y1B1 und NCI-h295 Zellen erfolgte am Immulite® 2000 der Firma Siemens. Das Verfahren beruht auf der Grundlage eines Chemilumineszenz Enzymimmunoassays. Im vollautomatisierten Messgerät erfolgt eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die über mehrere Inkubations- und Waschschrte letztendlich zu einer Lichtemmission führt. Diese wird quantifiziert und hierüber erfolgt anhand von Standardkurven die Berechnung der Konzentration des in der Probe

enthaltenen Cortisols. Die Proben wurden nach Herstellerangaben behandelt und gemessen, Kontrollen wurden stets mitgeführt.

Die Corticosteronmessung aus der V79B1 Zelllinie erfolgte mittels Corticosterone (Rat/Mouse) ELISA der Firma DRG. Das Prinzip entspricht dem unter 3.4.3 beschriebenen kompetitiven ELISA. Die Messungen erfolgten laut Herstellerangaben, Kontrollen wurden stets mitgeführt.

3.4.5 IC₅₀ Werte und Selektivitätsfaktor

Der IC₅₀ Wert ist ein berechneter Wert, der die Konzentration des Inhibitors angibt, die zugegeben werden muss, um die Aldosteron- bzw. Cortisolproduktion um genau 50% gegenüber dem Kontrollwert, ohne Inhibitor, zu inhibieren. Der Selektivitätsfaktor gibt an, um welchen Faktor die Aldosteronkonzentration im Vergleich zur Cortisolkonzentration bei genau 50% Inhibition geringer ist und damit, wie selektiv der Inhibitor gegenüber der Aldosteronsynthese im Vergleich zur 11 β -Hydroxylase ist. Je größer der Wert, desto selektiver wird die Aldosteronproduktion gehemmt und die Cortisolproduktion nicht beeinträchtigt bei gegebener Aldosteronsynthaseinhibitorkonzentration.

Alle Auswertungen erfolgten über die Softwareprogramme Microsoft Excel und GraphPad Prism 5.

3.5 Zeitabhängige Traceraufnahme in die NCI-h295 Zellen

Für die weiteren Versuche wurden in dieser Arbeit drei der neu entwickelten Aldosteronsynthaseinhibitoren untersucht. Die Auswahl der Inhibitoren erfolgte nach der aktuellen Markierbarkeit der Tracer mit [¹⁸F]. Die Markierung gelang für die Aldosteronsynthaseinhibitoren mit den Nummern 12, 13, 14. Für die Radiosynthesen weiterer Tracer waren die analogen Nitroverbindungen als Markierungsvorläufer erforderlich. Deren Synthese war erheblich aufwändiger als die der nicht radioaktiven Fluorverbindungen, da passende Synthesebausteine nicht kommerziell erhältlich waren und erst selbst hergestellt werden mussten. Daher standen für die vorliegende Arbeit nur einige Markierungsvorläufer und damit Tracer zur Verfügung.

Die Experimente wurden mit NCI-h295 Suspensionszellen durchgeführt, um die Traceraufnahme im Zeitverlauf zu überprüfen, da diese Zellen beide Zielenzyme simultan exprimieren. Unmittelbar vor dem Experiment wurden 5 Millionen mit PBS gewaschene Zellen in 5 ml oben beschriebenem Kulturmedium ohne FCS resuspendiert und während des gesamten Experiments in einer 25 ml Glasflasche bei 37 °C auf einer Heizplatte inkubiert.

Die Negativkontrolle bestand aus 5 ml Kulturmedium ohne FCS, ohne Zellen, die entsprechend der Zellsuspension behandelt und gemessen wurde.

Nach Zugabe von 0,1 MBq [¹²⁵I] IMTO, bzw. 1 MBq des entsprechenden [¹⁸F] Tracers zur Zellsuspension bzw. Kontrolle wurden zu bestimmten Zeitpunkten 1-5 je dreimal 250 µl Zellsuspension entnommen. Diese wurden in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße im Eisbad für 5 min inkubiert, um die Traceraufnahme in die Zelle zu stoppen. Die erste Entnahme erfolgte direkt nach Zugabe und Vermengung des Inhibitors mit der Zellsuspension und entspricht dem Zeitpunkt 1. Die Zeitpunkte 2-5 entsprechen der Entnahme der Zellsuspension nach 5, 15, 30 bzw. 45 min Inkubationszeit. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 4 °C für 5 min mit 1500xg abzentrifugiert und der Überstand vom Zellpellet getrennt. Danach erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit 250 µl eisgekühltem PBS. Der Überstand aus beiden Waschschriften wurde mit dem Überstand aus dem ersten Zentrifugationsschritt in einem 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gepoolt und neben dem Zellpellet bei Raumtemperatur bis zur Messung am Gammacounter aufbewahrt.

Für die Zellkontrolle wurden je dreimal 250 µl Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und ohne Wasch- und Zentrifugationsschritte bei Raumtemperatur bis zur Messung aufbewahrt. Die hierbei gemessenen Werte dienten bei der Messung als 100% Wert.

Mit der Kontrolle, die keine Zellen enthielt, wurde ebenso verfahren.

Für jeden Tracer wurden drei unabhängige Versuchsansätze, jeweils im Triplet, durchgeführt und entsprechende Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet.

3.5.1 Messung am Gammacounter und Auswertung

Der Gammacounter misst von der Probe abgegebene Gammastrahlung als Counts pro min. Dies entspricht dem Gehalt an radioaktiv markierter Substanz in der Probe. Die Auswertung und graphische Darstellung der Traceraufnahme der Zellen über die Zeit erfolgte mit Excel und GraphPad Prism 5. Da [¹⁸F] eine Halbwertszeit von 110 min hat und die Messung am Gammacounter pro Probe 1 min dauert, erfolgte eine Umrechnung der Ergebnisse unter Berücksichtigung der Halbwertszeit im Vergleich zur 100% Kontrolle. Die Berechnung erfolgte nach dem Zerfallsgesetz.

$$N(t) = N(0) * 2^{(-t/T_{1/2})}.$$

Die Ergebnisse wurden in entsprechend der Halbwertszeit korrigierten Form angegeben.

3.6 Histologische Methoden

3.6.1 Gefrierschnitte

Alle humanen Gewebe entstammen der Tumorbank der Endokrinologie oder wurden freundlicherweise vom Pathologischen Institut der Uni Würzburg zur Verfügung gestellt. In den Versuchen kamen die in der Tabelle 7 aufgelisteten Gewebe zum Einsatz.

Nummer	Gewebe
1	Normale Nebenniere (nNN)
2	Aldosteronproduzierendes Adenom (APA)
3	Normale Nebenniere (nNN)
4	Aldosteronproduzierendes Adenom (APA)
5	Cortisolproduzierendes Adenom (CPA)
6	Adrenocorticales Karzinom (ACC)
7	Colon
8	Schilddrüse
9	Lunge
10	Niere
11	Leber

Tabelle 7: Übersicht über die humanen Gewebeschnitte, die für die Bindungsstudien eingesetzt wurden.

Die Gewebe wurden nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80 °C aufbewahrt. Zum Transport wurden alle Gewebe auf Trockeneis gelagert.

Zum Schneiden der Gewebe wurde das Kryostat Leica CM 1850 verwendet. Die Gewebe wurden bei einer Temperatur von -20 °C geschnitten. Die Schnittdicke lag bei abwechselnd zweimal 20 µm und 8 µm, um Schnittserien zu gewinnen, die es ermöglichen sollten, die angefertigten Image-Bilder, wofür eine Schnittdicke von 20 µm nötig war, mit einer immunhistochemischen Färbung der 8 µm dicken Schnitte zu vergleichen. Die Schnitte wurden auf Superfrostobjektträger aufgezogen und durch kurzes Erwärmen gestreckt und fixiert. Für die Imaging Versuche wurden immer zwei Schnitte mit 20 µm in gleicher Ausrichtung nebeneinander auf einen Objektträger aufgezogen. Alle Schnitte wurden auf Trockeneis transportiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.6.2 Bindungsstudie an humanen Gewebeschnitten (Imaging)

Die Bindungsstudien dienen dazu, die Inhibitoren auf die Bindungsfähigkeit an die verschiedensten humanen Gewebe und verschiedenen Tumoren der Nebenniere zu überprüfen. Hierzu wurden die mit [¹⁸F] radioaktiv markierten Tracer in geeigneter Verdünnung auf die vorbehandelten Schnitte gegeben und nach Inkubations- und Waschschritten zum Bindungsnachweis auf eine Imageplate aufgelegt und am CR35BIO Imageplate Scanner ausgewertet. Es erfolgt die Belichtung der Imageplate durch den am Gewebe gebundenen radioaktiv markierten Tracer und so kann die Stelle der Tracerbindung am Gewebe sichtbar gemacht werden.

Die Gewebeschnitte wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und sofort weiterverarbeitet. Von jedem Gewebe wurde pro Ansatz ein Objektträger mit zwei Schnitten mit je 20 µm verwendet. Die einzelnen Schnitte auf dem Objektträger wurden mit einem Fettstift eingerahmt und sofort für 5 min in eiskaltem 4%igem (w/v) Paraformaldehyd fixiert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen, dann für 5 min in 50 mM TRIS inkubiert und danach 1 h in 50 mM TRIS mit 2% (w/v) BSA geblockt. Auf einen Schnitt des Objektträgers wurde 0,1 MBq des Inhibitors in 200 µl Puffer, PBS mit 1% (v/v) Tween, vorsichtig aufgetragen. Auf den zweiten Schnitt des Objektträgers wurde ebenfalls 0,1 MBq des Inhibitors in 200 µl Puffer, jedoch zusätzlich enthaltenen 10 µM der nicht

radioaktiv markierten Substanz, zum Blocken der radioaktiv markierten Substanz, aufgetragen. Nach 1 h Inkubation erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit PBS und anschließend ein zehnmütiger Waschschrift mit 50 mM TRIS mit 0,05% Tween. Beim letzten Waschschrift wurden die mit [¹²⁵I]IMTO behandelten Schnitte zweimalig 10 min mit 50 mM TRIS ohne Tween Zusatz gewaschen.

Anschließend wurden die Schnitte im Heizschrank für ca. 10 min bei 80°C getrocknet. Die Schnitte wurden auf die Imageplate für 30 min aufgelegt und anschließend am CR35BIO Imageplate Scanner ausgelesen. Das Auslesen erfolgte mit der Software CR Reader. Die erstellten Bilder wurden sowohl als .dat, als auch als .xyz Datei abgespeichert und mit dem Programm Amide weiter ausgewertet [76]. Die Signalstärke, die durch die Bindung an die Gewebe erreicht wurde, wurde in der Einheit Voxels angegeben. Um die selektive Bindungsstärke der eingesetzten Tracer zu ermitteln, wurde die Signalstärke der Bindung der geblockten Gewebeschnitte von der Signalstärke der ungeblockten Bindung abgezogen.

3.6.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine gebräuchliche Färbemethode in der Histologie und Pathologie. Sie dient dazu einen Überblick über das vorliegende Gewebe zu bekommen und genügt häufig in der Klinischen Pathologie aus, um eine Diagnose zu stellen [7, 15]. Das Prinzip beruht darauf, dass das basische Hämatoxylin an basophile Zellstrukturen wie z.B. Zellkerne bindet und diese blau färbt. Das saure Eosin bindet an eosinophile Zellbestandteile, z.B. zytoplasmatische Proteine und Mitochondrien, und färbt diese rot an. [15]

Für die HE-Färbung wurden die Schnitte mit der Schnittdicke 8 µm verwendet. Um die Gefrierschnitte zu fixieren, wurden diese direkt aus -80 °C in Aceton bei 8 °C verbracht und für 10 min inkubiert. Danach erfolgte die Rehydratisierung der Schnitte über eine absteigende Alkoholreihe. Hierfür wurden die Schnitte nacheinander je für 5 min bei Raumtemperatur in 100% Ethanol, 95% Ethanol und 50% Ethanol inkubiert und anschließend in Aqua destillata (A.d.) gespült. Um die basischen Zellbestandteile anzufärben, erfolgte die Färbung mit Hämalaun für 5 min. Zum Bläuen wurden die Schnitte 10 min in fließendes Leitungswasser verbracht. Nach erneutem Spülen in A.d.

wurden die eosinophilen Zellstrukturen mit Eosin für 2 min angefärbt. Hierauf wurden die Schnitte nochmals mit A.d. gespült und anschließend in 100% Ethanol für 2 min entwässert und anschließend mit Entellan eingedeckt. Die Fotodokumentation der Schnitte erfolgte mit Hilfe der SPOT Software am Mikroskop Axioskop.

3.6.4 Immunhistochemische Färbung der humanen Gewebeschnitte durch Anti-CYP11B1 und Anti-CYP11B2 Antikörper

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung beruht darauf, dass ein monoklonaler Antikörper im ersten Schritt spezifisch an eine Zielstruktur bindet. Nach Entfernung der nicht gebundenen Antikörper kommt ein Sekundärantikörper zum Einsatz, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist. An den Sekundärantikörper ist ein Konjugat gekoppelt, das über eine Farbreaktion eine Visualisierung der Antikörperbindungsstelle ermöglicht. Um die Expression der 11 β -Hydroxylase und der Aldosteronsynthese in den Geweben nachzuweisen, wurden zwei primäre Antikörper eingesetzt, gerichtet gegen CYP11B1 bzw. CYP11B2 (zur Verfügung gestellt von Prof. Kuniaki Mukai, Keio Universität Tokyo) [9].

Alle Schritte der immunhistochemischen Färbung wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur ausgeführt. Die 8 μ m Kryostatschnitte wurden mit einer 4% (w/v) Paraformaldehydlösung fixiert. Nach zweimaligem Waschschrift mit PBS für 5 min erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidasen mit 0,3% (v/v) Wasserstoffperoxid in 100% Methanol. Anschließend wurden die Schnitte einmalig für 5 min mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 5% (w/v) BSA in PBS, Inkubationszeit 30 min, geblockt. Der erste primäre Antikörper gegen CYP11B1 mit einer Verdünnung von 1:5000 in 5% (w/v) BSA in PBS wurde über Nacht bei 4 °C auf den Schnitten belassen und nach einem dreimaligen Waschschrift für 5 min mit PBS erfolgte anschließend die Inkubation mit dem HRP (Horseradisch-Peroxidase) gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h. Danach erfolgte die Inkubation mit dem zweiten primären Antikörper gegen CYP11B2, der in einer Verdünnung von 1:10000 in 5% (w/v) BSA in PBS auf die Schnitte gegeben wurde. Die Inkubation verlief wieder über Nacht bei 4 °C und war gefolgt von einem dreimaligen Waschschrift mit PBS. Anschließend wurden die Schnitte mit dem zweiten Sekundärantikörper,

gekoppelt mit einer Phosphatase, für 1 h inkubiert. Die HRP Aktivität, die die Bindungsstelle des Antikörpers gegen CYP11B1 nachweist, wurde mit 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid und Wasserstoffperoxid sichtbar gemacht. Die Phosphatase-Aktivität zum Nachweis von CYP11B2 wurde mit 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat und Nitroblautetrazoliumchlorid sichtbar gemacht.

3.7 *Ex-vivo* Nebennierenversuche

Entnommene Nebennieren sind in geeignetem Medium noch über einige Stunden fähig die Enzymaktivität, u.a. der Aldosteronsynthese und 11 β -Hydroxylase, aufrechtzuerhalten. Diese Eigenschaft wurde dazu genutzt, die Inhibition der Aldosteronsynthese und 11 β -Hydroxylase durch die Aldosteronsyntheseinhibitoren an murinen Organen direkt zu testen. Hierfür wurde die für die Aldosteronsynthese humanisierte Maus MRK0301 der Firma Tarconic Artemis eingesetzt. Es wurde der Inhibitor mit der Nummer 14, sowie Iodmetomidat in diesem Versuch getestet.

Die Mäuse wurden durch Inkubation mit CO₂ euthanasiert. Nach dem Exitus erfolgte die Eröffnung der Maus durch einen medianen thorakolumbalen Schnitt. Zunächst erfolgte die Entfernung der Nieren mit dem umgebenden perirenal Fettgewebe. Hierbei war besonders auf die im Fettgewebe gelegenen ca. 1x1mm großen Nebennieren am Oberpol der Nieren zu achten. Anschließend wurden unter größter Vorsicht die Nebennieren aus dem die Nieren umgebenden Fettgewebe entfernt, um die Nebenniere nicht zu verletzen. Das die Nebennieren umgebende Fettgewebe wurde vollständig entfernt.

Direkt nach Entnahme der Nebenniere wurde das Organ in PBS eingetaucht, in 700 μ l RPMI-Medium überführt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden 100 μ l des Mediums entfernt und hieraus die basale Aldosteron- bzw. Corticosteronkonzentration bestimmt. Diese basalen Konzentrationen wurden im weiteren Verlauf als Konzentrationen zum Zeitpunkt 0 min angegeben und als 100% Wert definiert. Danach erfolgte die Stimulation der Enzymexpression durch Zugabe von ACTH in einer Endkonzentration von 13,3 μ g/l. Zeitgleich wurde in einer Versuchsreihe der Inhibitor zugegeben und für weitere 150 min bei 37 °C inkubiert. Die zugegebene Inhibitor- bzw. Iodmetomidatkonzentration lag bei 10 μ M. In der zweiten

Versuchsreihe wurde lediglich das entsprechende Volumen Medium, ohne Inhibitor ergänzt. In beiden Versuchsansätzen wurde nach 30, 60 und 150 min nach Inhibitor- bzw. Mediumzugabe je 100 µl des Überstands entnommen, um die Konzentrationen von Aldosteron bzw. Corticosteron zu bestimmen. Jeder Versuchsansatz ohne Inhibitor wurde mit 8 Nebennieren, mit Inhibitor bzw. Iodmetomidat mit 6 Nebennieren durchgeführt und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Die Messung der Aldosteron- bzw. Corticosteronmessung erfolgte wie unter 3.4.3 und 3.4.4 beschrieben mittels den Aldosteron ELISA und Corticosteron ELISA der Firma DRG.

Die einzelnen Nebennieren zeigten je nach Alter der Maus und Sorgfältigkeit der Präparation verschiedene absolute Aldosteron- und Corticosteronkonzentrationen. Aus diesem Grund wurde für jede Nebenniere die basale Aldosteron- bzw. Corticosteronkonzentration als 100% definiert und die nachfolgend gemessenen Werte zu diesem 100% Wert ins Verhältnis gesetzt, um den Konzentrationsverlauf darzustellen und die Werte vergleichbar zu machen.

Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test mit dem Programm GraphPad Prism 5. P-Werte < 0,05 sind statistisch signifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Konzentrationsabhängige Inhibition der Aldosteronsynthese und 11 β -Hydroxylase und Selektivität der neuen Aldosteronsynthaseinhibitoren

Es wurden 15 Substanzen hinsichtlich der Inhibition der Aldosteron- und Cortisol synthese untersucht als indirekter Nachweis einer Bindung und Inhibition der humanen Aldosteronsynthase und humanen 11 β -Hydroxylase. Dies erfolgte in den Y1 Zelllinien, Y1B2 bzw. Y1B1. In dieser Zelllinie war es möglich, die Inhibition der beiden Enzyme in zwei getrennten Versuchsansätzen bei entsprechender Expression eines der beiden Enzyme zu untersuchen. Voraussetzung für eine weitere Testung des Inhibitors in den Zelllinien NCI-h295 und V79 war, dass ein IC₅₀ Wert von kleiner oder gleich 15nM und zusätzlich ein Selektivitätsfaktor über 10 für die Aldosteronsynthase in den Y1 Zellen vorlag. In der NCI-h295 Zelllinie wurde die Inhibition und Selektivität der sechs, auf die definierten Voraussetzungen passenden, Aldosteronsynthaseinhibitoren gegenüber beiden humanen Enzymen bei simultaner Expression getestet. In den beiden V79 Zelllinien V79B1 und V79B2 wurde in getrennten Versuchsansätzen die Inhibition der murinen Enzyme CYP11B1 und CYP11B2 getestet, die ebenfalls je einzeln in zwei getrennten Zelllinien exprimiert wurden. Der Vergleich der Inhibition und Selektivität der Inhibitoren gegenüber den humanen Enzymen und den murinen Enzymen wurde durchgeführt, um eine spätere Möglichkeit für die direkte Testung der Inhibitoren im murinen Tiermodell beurteilen zu können.

4.1.1 IC₅₀ Werte und Selektivitätsfaktoren der neuen Aldosteronsynthaseinhibitoren in den Zelllinien Y1B1 und Y1B2

Die errechneten Konzentrationen, um eine 50%ige Inhibition der CYP11B2 in der Y1B2 Zelllinie zu erreichen, lagen zwischen 1,33 nM und 1270 nM (Tabelle 8). Im Fall des getesteten Inhibitors Nr. 5 kam es zu keiner Inhibition der CYP11B2 bei allen getesteten Konzentrationen und der IC₅₀ Wert wurde mit >10.000 nM angegeben. Die IC₅₀ Werte für die Inhibition der CYP11B1 in der Y1B1 Zelllinie lagen zwischen 44,9

nM und >10.000 nM. Ein Wert von >10.000 nM wurde entsprechend wieder angegeben, wenn keine Inhibition des Enzyms bei allen eingesetzten Konzentrationen des getesteten Inhibitors, im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitorzusatz, gemessen werden konnte.

Die meisten der 15 Aldosteronsynthaseinhibitoren zeigten eine selektive Inhibition von CYP11B2 in der Y1 Zelllinie. Es ließen sich Selektivitätsfaktoren von 26,7 bis 86,7 errechnen (Tabelle 8). Die Substanz mit der Nr. 11 zeigte keine Selektivität gegenüber CYP11B2 und die Substanz mit der Nr. 9 eine stärkere Inhibition von CYP11B1 im Vergleich zur CYP11B2 und damit einen errechneten Selektivitätsfaktor von 0,04.

Y1-Zellen				
Nr.	Formel	IC ₅₀ CYP11B1 [nM]	IC ₅₀ CYP11B2 [nM]	Selektivitätsfaktor
1		>10.000	142 ± 195	/
2		>10.000	712 ± 619	/
3		1460 ± 181	24,9 ± 3,2	58,6
4		1620 ± 90	35,0 ± 14,8	46,3
5		>10.000	>10.000	/
6		754 ± 204	8,7 ± 0,4	86,7
7		>10.000	348 ± 10	/
8		1430 ± 150	25,2 ± 8,86	56,7
9		49,9 ± 82,3	1270 ± 799	0,04
10		399 ± 522	7,2 ± 0,75	55,4
11		38,6 ± 11,5	39,0 ± 11,4	1,0
12		588 ± 328	9,6 ± 2,1	61,3
13		270 ± 60,3	10,1 ± 1,46	26,7
14		44,9 ± 14,0	1,33 ± 0,05	33,8
15		674 ± 349	12,0 ± 1,73	56,2

Tabelle 8: Übersicht über die IC₅₀ Werte mit Standardabweichung und Selektivitätsfaktoren in der Y1 Zelllinie.

4.1.2 IC₅₀ Werte und Selektivitätsfaktoren der neuen Aldosteronsynthaseinhibitoren in der Zelllinie NCI-h295

Sechs der 15 getesteten Aldosteronsynthaseinhibitoren entsprachen den oben erwähnten, vorher definierten Voraussetzungen für die weitere Testung in den NCI-h295 und V79 Zelllinien und wurden entsprechend weiter untersucht.

Nr.	Y1-Zellen			NCI-h295-Zellen		
	IC ₅₀ CYP11B1 [nM]	IC ₅₀ CYP11B2 [nM]	SF	IC ₅₀ CYP11B1 [nM]	IC ₅₀ CYP11B2 [nM]	SF
6	754 ± 204	8,7 ± 0,4	86,7	532 ± 275	5,64 ± 1,52	94,3
10	399 ± 522	7,2 ± 0,75	55,4	324 ± 207	11,0 ± 3,9	29,5
12	588 ± 328	9,6 ± 2,1	61,3	599 ± 363	10,6 ± 3,54	56,5
13	270 ± 60,3	10,1 ± 1,46	26,7	276 ± 142	6,74 ± 6,64	40,9
14	44,9 ± 14,0	1,33 ± 0,05	33,8	61,0 ± 21,5	4,9 ± 4,04	12,4
15	674 ± 349	12,0 ± 1,73	56,2	469 ± 229	11,4 ± 6,63	41,1

Tabelle 9: Übersicht über die IC₅₀ Werte mit Standardabweichung und Selektivitätsfaktoren (SF) der CYP11B1 und CYP11B2 Inhibition in der Y1 und NCI-h295 Zelllinie der sechs ausgewählten Aldosteronsynthaseinhibitoren.

Die Inhibitoren mit den Nummern 6, 10, 12-15 erbrachten IC₅₀ Werte zwischen 1,33±0,05 nM und 12,0±1,73 nM und Selektivitätsfaktoren zwischen 26,7 und 86,7 bei Testung in den Y1 Zelllinien. Bei der Untersuchung in den NCI-h295 Zellen konnten vergleichbare Werte gemessen werden, hier lagen die IC₅₀ Werte zwischen 4,9±4,04 nM und 11,4±6,63 nM und die Selektivitätsfaktoren zwischen 12,4 und 94,3 (Tabelle 9).

4.1.3 IC₅₀ Werte und Selektivitätsfaktoren der neuen Aldosteronsynthaseinhibitoren in den Zelllinien V79B1 und V79B2

Es zeigte sich in der V79 Zelllinie kein vergleichbares Ergebnis in der Inhibition der murinen Aldosteronsynthase. Hier liegen die IC₅₀ Werte bei >500 nM und die

Selektivitätsfaktoren waren in fünf Fällen nicht bestimmbar, in einem Fall lag der Wert bei 0,68 (siehe Tabelle 10). Alle sechs Inhibitoren gehören der Stoffgruppe der Cyanofluorphenylpyridine bzw. Cyanofluorphenylpyrazine (Nr. 6) an.

Nr.	Y1-Zellen			NCI-h295-Zellen			V79-Zellen		
	IC ₅₀ CYP11B1 [nM]	IC ₅₀ CYP11B2 [nM]	SF	IC ₅₀ CYP11B1 [nM]	IC ₅₀ CYP11B2 [nM]	SF	IC ₅₀ CYP11B1 [nM]	IC ₅₀ CYP11B2 [nM]	SF
6	754±204	8,7±0,4	86,7	532±275	5,64±1,52	94,3	>10.000	962±696	/
10	399±522	7,2±0,75	55,4	324±207	11,0±3,9	29,5	>10.000	>10.000	/
12	588±328	9,6±2,1	61,3	599±363	10,6±3,54	56,5	>10.000	>10.000	/
13	270±60,3	10,1±1,46	26,7	276±142	6,74±6,64	40,9	47,9±45,6	>10.000	/
14	44,9±14,0	1,33±0,05	33,8	61,0±21,5	4,9±4,04	12,4	409±707	605±172	0,68
15	674±349	12,0±1,73	56,2	469±229	11,4±6,63	41,1	>10.000	>10.000	/

Tabelle 10: Übersicht über die IC₅₀ Werte mit Standardabweichung und Selektivitätsfaktoren (SF) der CYP11B1 und CYP11B2 Inhibition in der Y1, NCI-h295 und V79 Zelllinie der sechs ausgewählten Aldosteronsynthaseinhibitoren.

4.2 Ergebnisse der zeitabhängigen Traceraufnahme in die NCI-h295 Zellen

Für die weiteren Versuche wurden in dieser Arbeit drei der neu entwickelten Aldosteronsynthaseinhibitoren untersucht. Die Auswahl der Inhibitoren erfolgte nach der möglichen Markierbarkeit der Substanzen mit [¹⁸F]. Die Markierung gelang für die Substanzen mit den Nummern 12, 13 und 14.

Bei der zeitabhängigen Aufnahme der untersuchten radioaktiv markierten Tracer und der Referenzsubstanz [¹²⁵I]IMTO zeigte sich für die Referenzsubstanz [¹²⁵I]IMTO über die Zeit von 45 min eine Aufnahme in die Zelle von im Mittel 28,18%. Die Tracer [¹⁸F]12, [¹⁸F]13 und [¹⁸F]14 zeigten im zeitlichen Verlauf keinen Anstieg der Aufnahme in die NCI-h295 Zellen und lagen nach 45 min im Mittel bei 5,24%, 4,34% bzw. 5,64%.

Zeitpunkte	Zeitabhängige Traceraufnahme in die Zelle (Prozent Mittelwert \pm Standardabweichung)			
	[¹²⁵ I]IMTO	[¹⁸ F]12	[¹⁸ F]13	[¹⁸ F]14
1	20,72 \pm 8,53	5,55 \pm 4,33	3,35 \pm 0,94	4,21 \pm 1,17
2	24,24 \pm 10,36	5,66 \pm 3,77	3,08 \pm 0,52	4,90 \pm 2,25
3	24,38 \pm 7,97	5,32 \pm 3,06	4,31 \pm 0,90	4,93 \pm 2,92
4	28,61 \pm 11,74	5,64 \pm 3,49	3,41 \pm 0,15	5,53 \pm 2,98
5	28,18 \pm 9,41	5,24 \pm 2,87	4,34 \pm 2,36	5,64 \pm 1,43

Tabelle 11: Zeitlicher Verlauf der Traceraufnahme in die Zelle. Die erste Entnahme erfolgte direkt nach Zugabe und Vermengung des Inhibitors mit der Zellsuspension und entspricht dem Zeitpunkt 1. Die Zeitpunkte 2-5 entsprechen der Entnahme der Zellsuspension nach 5, 15, 30 bzw. 45 min Inkubationszeit.

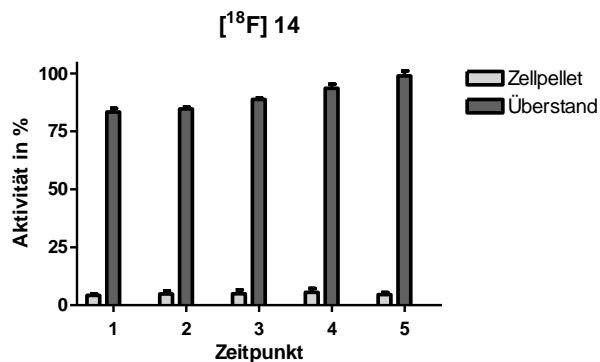
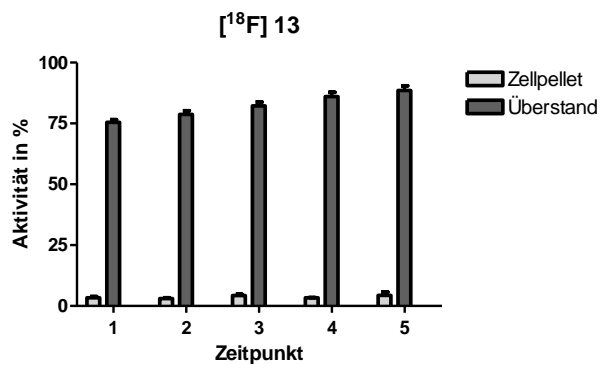
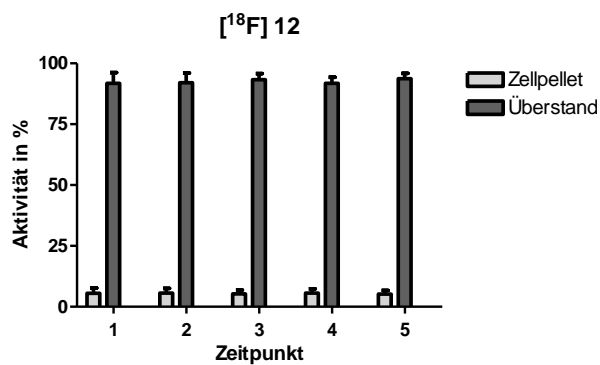
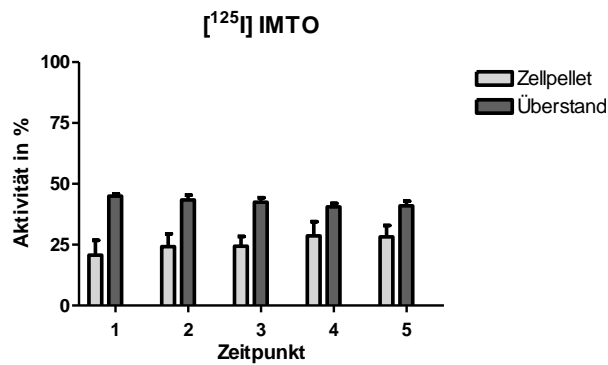


Abbildung 11: Graphische Darstellung über den zeitlichen Verlauf der Traceraufnahme der untersuchten [¹⁸F] markierten Tracer und [¹²⁵I]IMTO in die NCI-h295 Zellen. Der Zeitpunkt 1 entspricht der Entnahme der Zellsuspension direkt nach Zugabe und Vermengung des Inhibitors. Die Zeitpunkte 2-5 entsprechen der Inkubationszeit 5, 15, 30 bzw. 45 min.

4.3 Ergebnisse der Bindungsstudien an humanen Gewebeschnitten

Untersucht wurden die Referenzsubstanz [^{125}I]IMTO und die Tracer [^{18}F]12, [^{18}F]13 und [^{18}F]14. Die Referenzsubstanz IMTO bindet sowohl an CYP11B1 als auch an CYP11B2. [^{125}I]IMTO zeigte eine spezifische Bindung an alle Gewebe adrenalen Ursprungs, sowie unspezifische Bindung an Lebergewebe. Es fand keine Bindung an Nieren-, Lungen-, Schilddrüsen- und Colongewebe statt. Die Gewebeschnitte, die mit radioaktiv markiertem [^{125}I]IMTO zusammen mit nicht radioaktiv markiertem IMTO inkubiert wurden, zeigten ein deutlich geringeres Signal. Für die Berechnungen und die graphische Darstellung wurde die Stärke dieses Signals, angegeben in Voxels, von der Signalstärke der rein mit radioaktiv markiertem [^{125}I]IMTO inkubierten Gewebe abgezogen.

Die Tracer [^{18}F]12 und [^{18}F]13 zeigten nur geringe Bindung an adrenale Gewebe und Lebergewebe. Die Signalstärke der ungeblockten und heißen Gewebeschnitte unterschieden sich nicht signifikant, somit konnte keine Berechnung und graphische Darstellung erfolgen.

Der Tracer [^{18}F]14 zeigte eine starke Bindung an Gewebe adrenalen Ursprungs. Es kam zu keiner Bindung an Colon-, Schilddrüsen-, Lungen- und Nierengewebe, ebenso erfolgte weder spezifische noch unspezifische Bindung an Lebergewebe. Bei gleichzeitiger Inkubation von radioaktiv markiertem und unmarkiertem Inhibitor kommt es zur vollständigen Blockade der Bindungsstellen durch den unmarkierten Inhibitor.

[¹²⁵I] IMTO

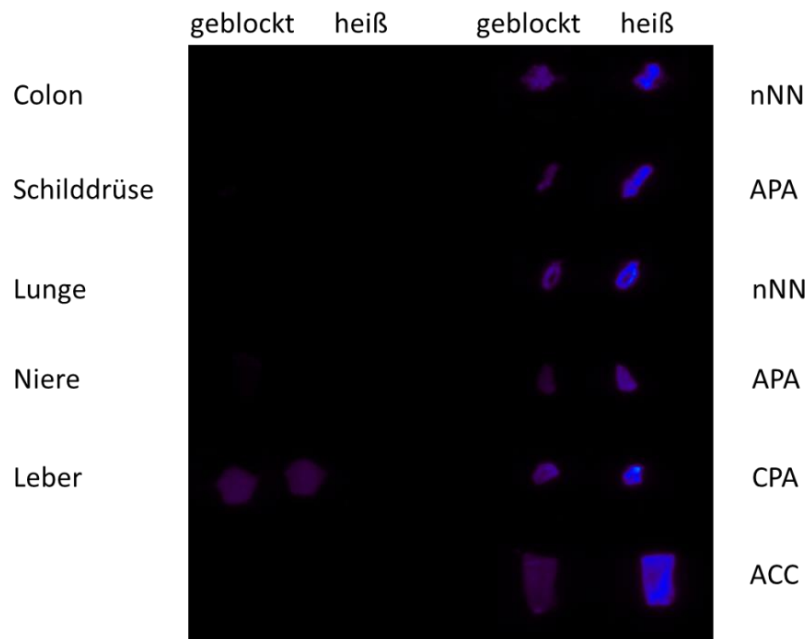


Abbildung 12: Bindungsstudie von [¹²⁵I]IMTO an humanen Gewebeschnitten.

[¹⁸F] 12

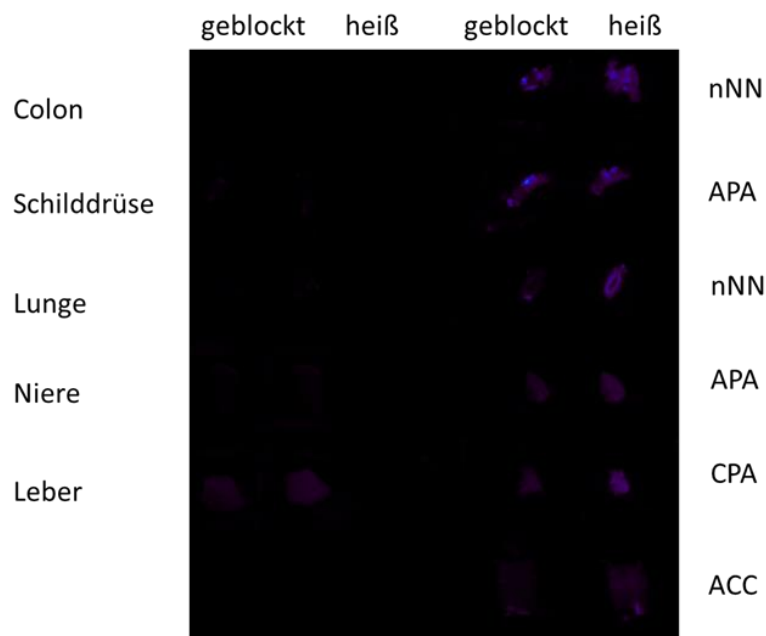


Abbildung 13: Bindungsstudie von [¹⁸F]12 an humanen Gewebeschnitten.

[F¹⁸] 13

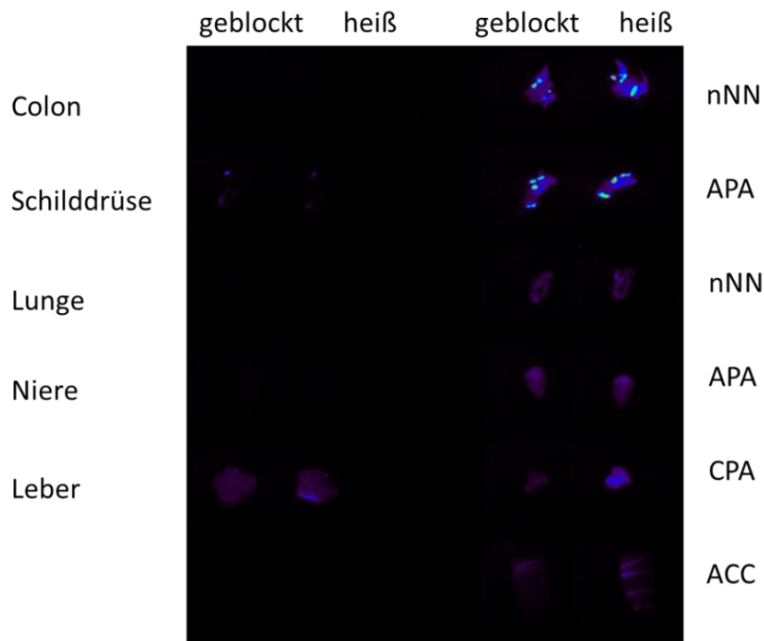


Abbildung 14: Bindungsstudie von [F¹⁸]13 an humanen Gewebeschnitten.

[F¹⁸] 14

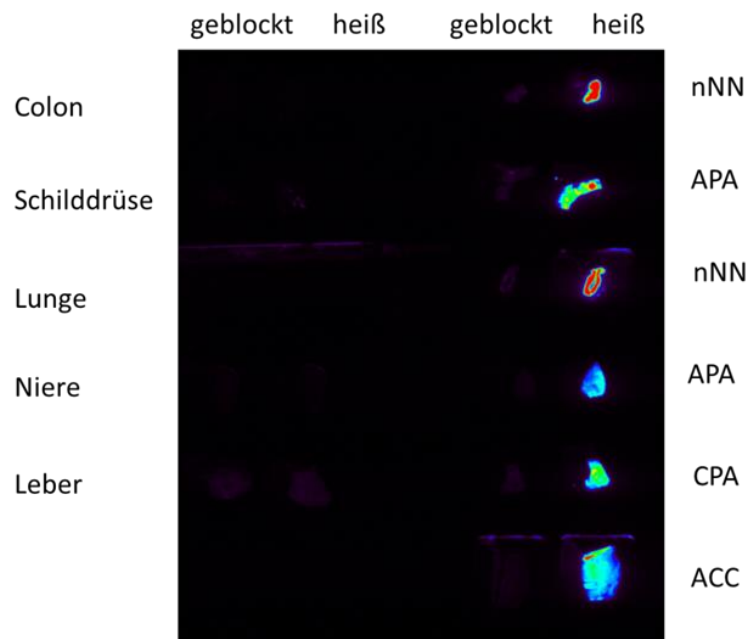


Abbildung 15: Bindungsstudie von [F¹⁸]14 an humanen Gewebeschnitten.

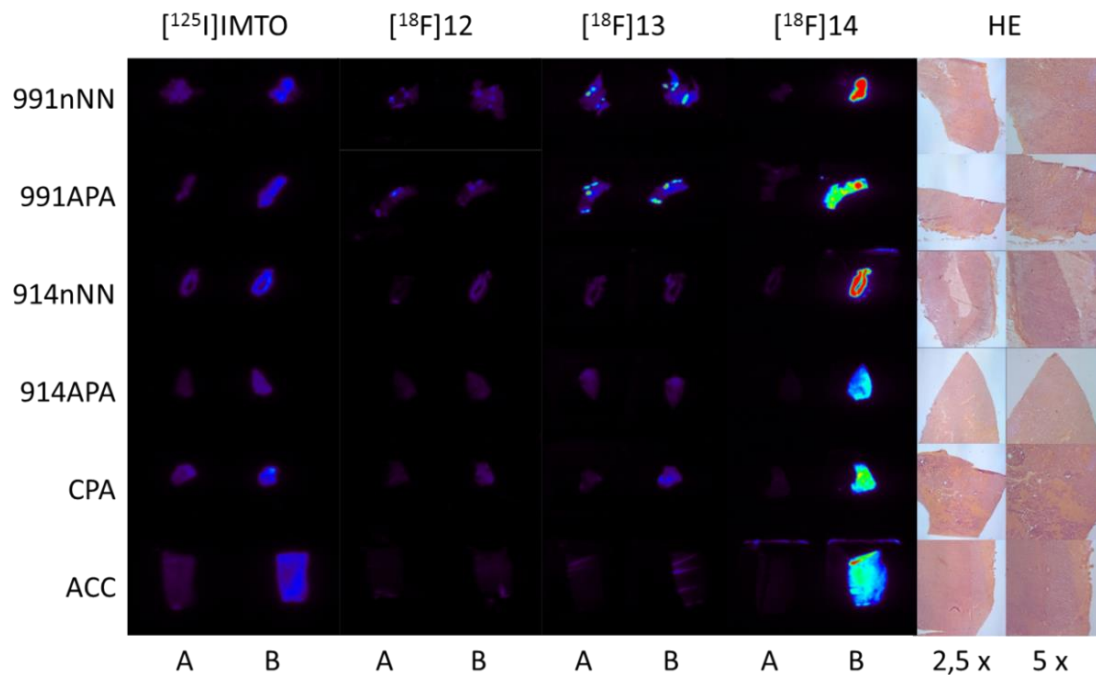


Abbildung 16: Übersicht über die Bindungsstudien an humanen Gewebeschnitten, sowie den Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten mit einer 2,5- bzw. 5-fachen Vergrößerung. A= 0,1 MBq Tracer + 10 µM kalter Inhibitor, B= 0,1 MBq Tracer.

In der graphischen Darstellung lässt sich die Bindungsstärke von $[^{125}\text{I}]\text{IMTO}$ und $[^{18}\text{F}]14$ nebeneinander aufzeigen. Für die Darstellung der Bindungsstärke wurden die Voxels über den ROIs (region of interest) berechnet. Die Werte wurden in Voxels angezeigt und wurden nach Abzug der geblockten Bindungen von den ungeblockten Bindungen angegeben. Es zeigte sich eine starke Bindung von $[^{125}\text{I}]\text{IMTO}$ an die untersuchten Gewebe. Zieht man die Bindungsstärke der geblockten Bindung von der ungeblockten Bindung ab, um die unspezifischen Bindungen zu eliminieren, zeigte sich insgesamt eine starke Bindung des Tracers $[^{18}\text{F}]14$ an alle eingesetzten adrenalen Gewebeschnitte als $[^{125}\text{I}]\text{IMTO}$. $[^{18}\text{F}]14$ hat stärker an normales Nebennierengewebe (nNN) und in geringerem Maße an die eingesetzten Schnitte der aldosteronproduzierenden Adenome (APA) gebunden. Die Bindung an das cortisolproduzierende Adenom (CPA) und das adrenokortikale Karzinom (ACC) überstieg die Bindung an das eine APA. Auch $[^{125}\text{I}]\text{IMTO}$ hat in geringerem Maße an ein APA, als an die entsprechende nNN, jedoch in geringerem Maße an das CPA und das ACC gebunden.

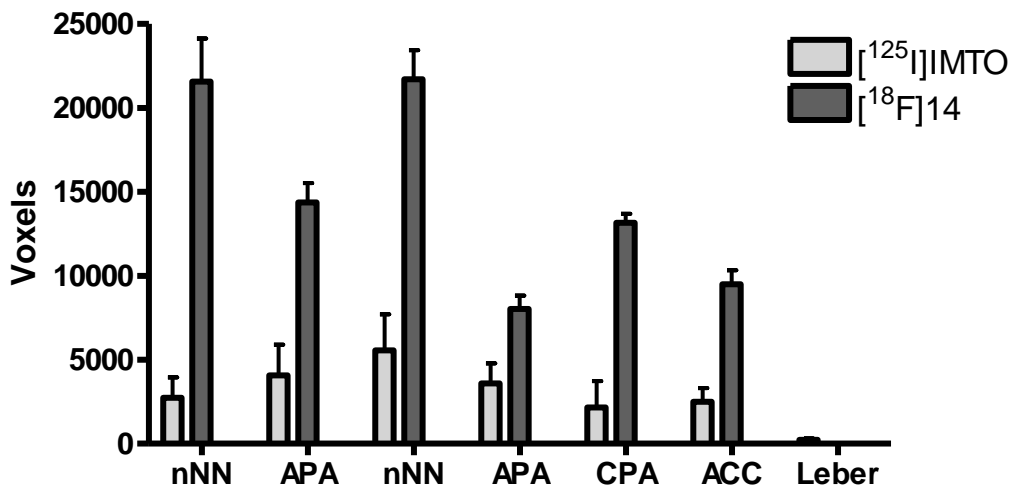


Abbildung 17: Graphische Darstellung der Bindungsstärke von [¹²⁵I]IMTO und [¹⁸F]14 an adrenales humanes Gewebe und Lebergewebe, angegeben in Voxels.

Trotz der adäquaten und wiederholten Durchführung der immunhistochemischen Färbung und unterschiedlicher Modifikation der Versuchsansätze konnte mit den, freundlicherweise von Prof. Kuniaki Mukai zur Verfügung gestellten, Antikörpern kein immunhistochemischer Nachweis der humanen CYP11B1 bzw. CYP11B2 Enzyme in den humanen Gewebeschnitten erfolgen.

4.4 Ergebnisse der *ex-vivo* Nebennierenversuche

Es wurden der Inhibitor mit der Nummer 14 und Iodmetomidat als Referenzsubstanz untersucht. Nach Stimulation durch ACTH erfolgte ein Anstieg der Aldosteronproduktion auf 476% des Ausgangswertes nach 150 min in der Kontrolle ohne Inhibitorzugabe. Die Corticosteronproduktion war in der Kontrolle auf 295% des Ausgangswertes nach 150 min angestiegen. Nach Zugabe der Referenzsubstanz Iodmetomidat stieg die Konzentration von Aldosteron und Corticosteron nur auf 254% bzw. 194% nach 150 min an, bereits nach 90 min kam es zu einer signifikanten Reduktion der Aldosteron- und Corticosteronproduktion (Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,05$ für die Zeitpunkte 90 min und 150 min). Nach Zugabe des Inhibitors Nr.14 kam es zu keiner signifikanten Reduktion der Corticosteronproduktion für alle gemessenen

Zeitpunkte (Mann-Whitney-U-Test: $p > 0,05$). Nach 150 min lag der Wert bei 274% des Ausgangswertes verglichen mit 295% ohne Inhibitor. Im Falle der Aldosteronkonzentration erfolgte eine signifikante Reduktion des Konzentrationsanstiegs bereits nach 30 min (Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,05$ für alle Zeitpunkte). Die Konzentration von Aldosteron stieg nach 150 min lediglich auf 223% nach Inhibitorzugabe im Vergleich zu 476% ohne Inhibitor an.

Zeit (min)	Corticosteronproduktion in % (Mittelwert ± Standardabweichung) p – Werte		
	ohne Inhibitor	mit IMTO	mit 14
0	100	100	100
30	156 ± 15	129 ± 35 p > 0,05	181 ± 15 p > 0,05
90	269 ± 37	178 ± 39 p = 0,0062	257 ± 28 p > 0,05
150	295 ± 27	194 ± 33 p = 0,0016	274 ± 32 p > 0,05

Tabelle 12: Corticosteronproduktion durch die entnommenen NN der humanisierten Maus nach ACTH Stimulation in %. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test, p-Werte < 0,05 zeigen eine statistisch signifikante Reduktion der Corticosteronproduktion durch die Zugabe von IMTO zu den Zeitpunkten 90 und 150 min an. Durch den Inhibitor mit der Nummer 14 erfolgte keine statistisch signifikante Reduktion der Corticosteronproduktion (p > 0,05).

Zeit (min)	Aldosteronproduktion in % (Mittelwert ± Standardabweichung) p – Werte		
	ohne Inhibitor	mit IMTO	mit 14
0	100	100	100
30	209 ± 31	204 ± 43 p > 0,05	169 ± 15 p = 0,0047
90	368 ± 82	214 ± 51 p = 0,0027	207 ± 18 p = 0,0007
150	476 ± 105	254 ± 69 p = 0,0007	223 ± 17 p = 0,0007

Tabelle 13: Aldosteronproduktion durch die entnommenen NN der gegenüber der Aldosteronsynthese humanisierten Maus nach ACTH Stimulation in %. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test, p-Werte < 0,05 zeigten eine statistisch signifikante Reduktion der Aldosteronproduktion durch die Zugabe von IMTO zu den Zeitpunkten 90 und 150 min an. Durch den Inhibitor mit der Nummer 14 erfolgte bereits ab dem Zeitpunkt 30 min eine statistisch signifikante Reduktion der Aldosteronproduktion (p < 0,05).

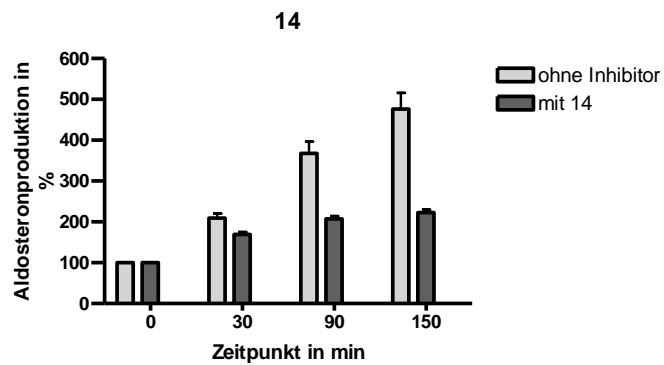
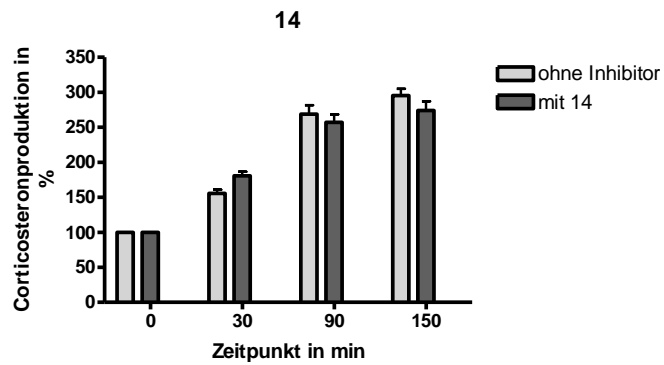
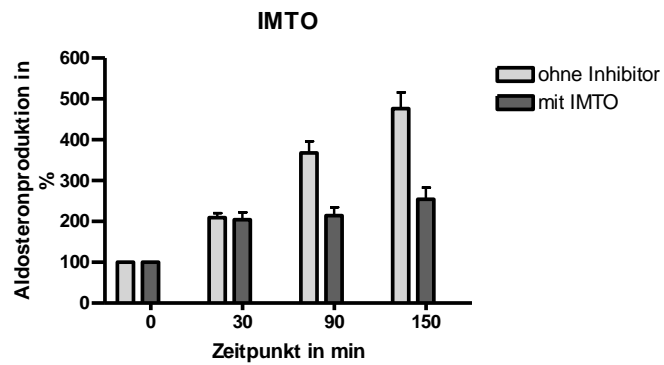
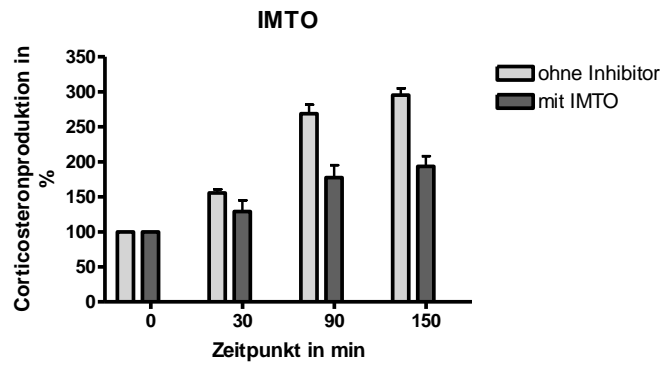


Abbildung 18: Graphische Darstellung der Aldosteron- und Corticosteronproduktion durch die gegenüber der Aldosteronsynthese humanisierten Maus NN nach Zugabe von IMTO bzw. dem Inhibitor mit der Nummer 14 im Vergleich zur Kontrolle.

5 Diskussion

In dieser Arbeit konnte für fast alle der 15 getesteten Aldosteronsynthaseinhibitoren eine gute Inhibition der Aldosteronsynthase im Vergleich zur 11 β -Hydroxylase in der Zelllinie Y1 gezeigt werden. In den Y1B2 bzw. Y1B1 Zelllinien wurden je einzeln die Inhibition der Aldosteronsynthase nach Zugabe der Vorläufersubstanz DOC bzw. die Inhibition der 11 β -Hydroxylase nach Zugabe von RSS getestet [57]. Die notwendigen Konzentrationen für eine 50%ige Inhibition der Aldosteronsynthase in der Y1B2 Zelllinie liegen mit Werten von 1,33 nM bis 12 nM in einem vergleichbaren Bereich wie die Referenzsubstanz IMTO mit einem IC₅₀ Wert von 6,90 \pm 1,37 nM für die Inhibition der Aldosteronsynthase in Y1B2 Zellen [57]. Fast alle der 15 getesteten Substanzen zeigten eine geringere bzw. keine Inhibition der 11 β -Hydroxylase mit IC₅₀ Werten ab 38,6 nM, bzw. ab 44,9 nM für die sechs in allen drei Zelllinien getesteten Inhibitoren, in der Y1B1 Zelllinie. IMTO hingegen zeigte in der Y1B1 Zelllinie eine ebenfalls gute Inhibition der 11 β -Hydroxylase mit einem IC₅₀ Wert von 1,83 \pm 1,83 nM [57]. IMTO besitzt einen Selektivitätsfaktor von 0,27; somit inhibiert IMTO stärker die 11 β -Hydroxylase als die Aldosteronsynthase. Die Selektivitätsfaktoren der Aldosteronsynthaseinhibitoren hingegen zeigen mit Werten von 26,7 bis 86,7 eine erheblich stärkere Inhibition der Aldosteronsynthase im Vergleich zur 11 β -Hydroxylase und sind somit hochselektiv gegenüber der Aldosteronsynthase.

Für weitere Testungen in den Zelllinien NCI-h295 und V79 wurden nur die Inhibitoren ausgewählt, die den vorher definierten Kriterien entsprachen. Diese sechs Substanzen erfüllten die Voraussetzungen eines IC₅₀ Wertes <15 nM, sowie gleichzeitig vorliegendem Selektivitätsfaktor von über 10 für die Aldosteronsynthase. Diese sechs Substanzen (6, 10, 12, 13, 14, 15) gehören der Stoffgruppe der Cyanofluorphenylpyridine bzw. Cyanofluorphenylpyrazine (Nr. 6) an. Diese Stoffgruppen besitzen die strukturelle Eigenschaft, um eine hochspezifische und hochaffine Bindung an die Aldosteronsynthase zu ermöglichen.

Die Ergebnisse in der Testung in den NCI-h295 Zellen bestätigten die Ergebnisse aus den Testungen in den Y1 Zelllinien. Diese NCI-h295 Zelllinie exprimiert gleichzeitig CYP11B1 und CYP11B2 und andere Enzyme der Steroidbiosynthese [16]. Hier bestätigte sich mit IC₅₀ Werten von 4,9 nM bis 11,4 nM und Selektivitätsfaktoren von

12,4 bis 94,3 der sechs getesteten Substanzen eine hohe Affinität und Selektivität gegenüber der Bindung und Inhibition der humanen Aldosteronsynthase. Die Inhibitoren 6, 10, 12, 13, 14 und 15 sind selektiv gegenüber CYP11B2, trotz einer Homologie von 95% der CYP11B1 und CYP11B2, bzw. 93%iger Homologie auf Proteinebene [66, 77-79]. Auch das gleichzeitige Vorhandensein der beiden zu testenden Zielenzyme hat keinen Einfluss auf die Selektivität der getesteten Aldosteronsynthaseinhibitoren. Ähnliche Ergebnisse konnten in anderen Studien beim Einsatz der NCI-h295 Zelllinie zur Testung von Aldosteronsynthase- und 11 β -Hydroxylaseinhibitoren gezeigt werden [16].

Der bisher in der Therapie des primären Hyperaldosteronismus in klinischen Studien untersuchte Aldosteronsynthaseinhibitor LCI699 weist ebenfalls IC₅₀ Werte im nM Bereich auf (0,7 nM), besitzt aber nur einen Selektivitätsfaktor von 3,6 gegenüber der Aldosteronsynthase im Vergleich zur 11 β -Hydroxylase [80]. Durch diese geringe Selektivität kommt es bei der oralen Gabe höherer Dosen LCI699 auch zu einer unerwünschten Inhibition der 11 β -Hydroxylase [71, 72, 81]. Langfristige Untersuchungen stehen zu diesem Zeitpunkt noch aus; ob eine längerfristige und hochdosierte Gabe eines in diesem Maße unselektiven Aldosteronsynthaseinhibitors nicht gar zu einer lebensbedrohlichen Nebennierenrindeninsuffizienz führen könnte, steht ebenfalls nicht fest. Dies ist ein wichtiger Limitationsfaktor für den Einsatz des bisherigen Aldosteronsynthaseinhibitors LCI699 in der Therapie der Hypertonie und des primären Hyperaldosteronismus. Selektivere Aldosteronsynthaseinhibitoren versprechen dagegen einen geringeren Einfluss auf die Cortisolbiosynthese. Damit wäre die Gefahr einer bedrohlichen Nebennierenrindeninsuffizienz, die dann vor allem in Stresssituationen für den Körper wie Infektionen oder Operationen auftreten kann [82, 83], deutlich geringer.

Bei der Testung der sechs Inhibitoren gegenüber den murinen Enzymen konnten die Ergebnisse nicht bestätigt werden. Es kam zu keiner Inhibition der murinen Aldosteron- bzw. Corticosteronproduktion. Dies ist durch die nur 69%ige bzw. 64%ige Homologie der murinen und der humanen Enzyme erklärbar, die neu entwickelten Aldosteronsynthaseinhibitoren binden spezifisch an die humanen, nicht aber an die murinen Enzyme. Die Aldosteronsynthaseinhibitoren LCI699 und FAD286, deren

Struktur ähnlich ist [66], wurde im humanen Modell in der Zellkultur, an transgenen Ratten [68], und im *in vivo* und *in vitro* Tiermodell an Ratten getestet [84]. Im humanen *in vitro* Modell konnten IC₅₀Werte von 1,6 nM bzw. 37 nM und einer 6-fach höheren Selektivität gegenüber der Aldosteronsynthase für FAD286 gemessen werden [68, 85]. Für die Inhibition der Rattenenzyme *in vitro* konnten IC₅₀ Werte von 670nM und ein Selektivitätsfaktor von 5 ermittelt werden, was für eine ca. 20-400-fach höhere Potenz der Substanz gegenüber humanen Enzymen spricht [84]. Ähnliche Ergebnisse wurden für LCI699 gezeigt [80]. In Ratten zeigte FAD286 eine gute Inhibition der Aldosteronsynthase *in vivo*, wobei der Selektivitätsfaktor hier um ein 10-faches höher lag als in der Zellkultur [84]. Hier wirft sich die vorher bereits gestellte Frage auf, ob eine Testung am murinen Tiermodell sinnvoll ist oder nicht [86]. Die Ergebnisse in den Zellkulturversuchen dieser Arbeit deuten ebenfalls darauf hin, dass eine Testung an murinen Enzymen *in vitro* und *in vivo* keine validen und aussagekräftigen Ergebnisse für die neu entwickelten Aldosteronsynthaseinhibitoren erwarten lässt. Ein transgenes Tiermodell, das die humanen Enzyme exprimiert, wäre eine denkbare Alternative, um die Eigenschaften der neuen Aldosteronsynthaseinhibitoren *in vivo* am Tiermodell zu untersuchen.

Ein für die humane Aldosteronsynthase humanisiertes Mausmodell war verfügbar. Der neu entwickelte Aldosteronsynthaseinhibitor Nr. 14, der in den *in vitro* Testungen die besten Ergebnisse erbracht hatte, wurde im Vergleich zu IMTO in *ex vivo* Analysen an den murinen Nebennieren des humanisierten Mausmodells untersucht. Korrespondierend zu den Ergebnissen der *in vitro* Testung zeigte sich eine potente Inhibition der Aldosteronsynthase durch die Nr. 14, wohingegen IMTO beide Enzyme inhibierte. Durch den Inhibitor mit der Nr.14 wird sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* die murine Corticosteronsynthase nicht signifikant reduziert, wohingegen die Inhibition der humanen Aldosteronsynthase signifikant ist ($p < 0,05$). IMTO im Vergleich zeigt für beide Enzyme eine signifikante Reduktion der Synthese ($p > 0,05$). Da jedoch nur die Aldosteronsynthase in diesem Tiermodell humanisiert ist, nicht jedoch die 11 β -Hydroxylase, können die Ergebnisse der Corticosteronmessungen am *ex vivo* Modell nicht für die Interpretation der Selektivität beider humaner Enzyme herangezogen werden. Letztendlich zeigen die Ergebnisse, dass das humanisierte Enzym eine suffiziente Aldosteronproduktion bewirkt und das Mausmodell geeignet ist, um gezielt

weitere Untersuchungen hinsichtlich der inhibitorischen Wirkung, Enzymbindung und Pharmakokinetik der neuen Substanzen *in vivo* durchzuführen.

Für eine erfolgreiche Darstellung der Enzyme auf molekularer Ebene im PET ist eine Aufnahme des Tracers in die Zielzelle und Bindung an das Zielenzym Aldosteronsynthase entscheidend. In dieser Arbeit wurde die zeitliche Aufnahme in die NCI-h295 Zelle untersucht. Im Vergleich zur Referenzsubstanz [¹²⁵I]IMTO zeigten die drei getesteten Inhibitoren [¹⁸F]12, [¹⁸F]13 und [¹⁸F]14 eine wesentlich geringere Aufnahme in die Testzellen NCI-h295. Hier ist jedoch anzumerken, dass der Zelluptake von IMTO extrem hoch ist. Der Uptake der drei radiofluorierten Tracer ist zwar deutlich niedriger, aber signifikant und - wie durch die Bindungsstudien nachgewiesen - spezifisch. Als Erklärungen für den höheren Uptake von IMTO kommen z.B. eine durch die höhere Lipophilie von IMTO bedingte erleichterte Penetration der Zellwand oder eine geringe metabolische Stabilität der radiofluorierten Tracer in Betracht. Auch eine evtl. niedrigere spezifische Aktivität der radiofluorierten Tracer kann zu einem niedrigen Zelluptake führen. Da IMTO mit hoher Affinität sowohl an CYP11B1 und an CYP11B2 bindet, stehen zudem mehr Bindungsstellen zur Verfügung im Vergleich zur alleinigen Bindung an CYP11B2.

Außerdem könnte eine unterschiedliche spezifische Aktivität bei der Radiofluorierung von Bedeutung für den gemessenen Zelluptake sein. Wie in den Blockadeexperimenten gezeigt, führt das Vorliegen von kalter Tracersubstanz zu einer Blockade der Bindungsstelle. Die Ausbeute für die Nummern 12-14 lag zwischen ca. 4% und 70%, da die Markierungsbedingungen teilweise variierten. Insgesamt ist davon auszugehen, dass ca. 1nM kalte Tracersubstanz während des Experiments vorlag und damit die Bindungsstellen blockiert, weshalb hier nur ein geringer Zelluptake gemessen werden kann, es wohl tatsächlich aber zu einem höheren Uptake in die Zelle kommt.

Durch Untersuchungen der Genexpression konnte gezeigt werden, dass in Zellen eines APA eine bis zu 10-fach höhere Expression von CYP11B2 und damit eine höhere Konzentration der Aldosteronsynthase vorliegt [26], als in dem dem APA angrenzenden normalen Nebennierengewebe [31]. Die Genexpression zwischen normalen Nebennieren und dem dem APA angrenzenden Nebennierengewebe zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Expression von CYP11B2 [31]. Histologische

Untersuchungen an normalen Nebennieren haben dies bestätigt und gezeigt, dass nur einzelne Zellnester der Zona glomerulosa einer normalen Nebenniere eine CYP11B2 Expression aufweisen [9]. Diese vermehrte Expression von CYP11B2 in aldosteronproduzierenden Adenomen und der bilateralen Hyperplasie bei primärem Hyperaldosteronismus lässt sich für eine Bildgebung im PET nutzen, indem die hochselektiven Tracer an die vermehrt gebildete Aldosteronsynthase binden und die Detektion des mit [¹⁸F] markierten Tracers ermöglichen.

Bisher wurde der Einsatz von [¹¹C]Metomidat im PET und PET-CT in der adrenalen Bildgebung und in der Differentialdiagnostik des PHA untersucht [58, 61, 64, 65, 87]. Unter der Hypothese, dass eine Dexamethason Vorbehandlung die ACTH Sekretion und damit die 11 β -Hydroxylase Konzentration im Parenchym der normalen Nebenniere, aber nicht im Conn Adenom reduziert, sollte eine bessere Differenzierung von kleinen Conn Adenomen ermöglicht werden [64]. Diese Hypothese konnte jedoch nicht bestätigt werden [64].

Jedoch wird in einer weiteren Studie, ebenfalls nach Dexamethason Vorbehandlung, [¹¹C]Metomidat als sensitiver und spezifischer Tracer im Einsatz im PET-CT beschrieben und diese Methode als mögliche Alternative zur Nebennierenvenenkatheteruntersuchung für Patienten mit PHA angegeben [65]. Prinzipiell ist damit ein "proof of principle" erfolgt, dass auch kleine Conn Adenome mittels PET-Bildgebung sehr gut darstellbar sind. Grundsätzlich besteht jedoch hinsichtlich des Einsatzes eines Tracers, der an beide CYP11B Enzyme bindet, die Frage der Spezifität, da auch häufig koinzident vorliegende endokrin inaktive Adenome eine hohe CYP11B1 Enzymexpression aufweisen. Es wird auch auf eine begrenzte Einsatzmöglichkeit bei besonderen Gegebenheiten, wie Vorliegen bilateraler Adenome oder einer unilateraler Hyperplasie hingewiesen [65].

Entscheidend ist, dass [¹¹C]Metomidat besonders als Inhibitor bzw. Marker für die 11 β -Hydroxylase charakterisiert wird [59, 61, 87]. Metomidat zeigt in *in vitro* Studien IC₅₀ Werte für die Inhibition der CYP11B1 von 4,6 nM bzw. für CYP11B2 16,7 nM [57]. Trotz der etwas höheren Selektivität gegenüber der 11 β -Hydroxylase wurde der Einsatz für die Differentialdiagnostik des PHA untersucht [64, 65]. Die 11 β -Hydroxylase wird zwar neben der Aldosteronsynthase auch in APAs exprimiert [9], jedoch bleibt die

Expression der CYP11B1 im Vergleich zum an das APA angrenzende normale Nebennierengewebe konstant und nur die Expression der CYP11B2 ist gesteigert [31]. Somit lässt sich interpretieren, dass in der Differentialdiagnostik des primären Hyperaldosteronismus mit dem [¹¹C]Metomidat PET-CT auch ein Enzym detektiert wird und für die Interpretation des erhobenen Befundes mit einbezogen wird, das mit der eigentlichen Pathophysiologie des PHA gar nichts zu tun hat. Ziel muss jedoch sein, einen Tracer einzusetzen, der hochspezifisch an das für die Erkrankung ausschlaggebende Enzym, die Aldosteronsynthase bindet, wie dies die neu entwickelten Tracer in den durchgeführten Versuchen versprechen.

Ein weiterer Nachteil des [¹¹C]Metomidat ist die sehr kurze Halbwertszeit von 20 min, die das Vorhandensein eines Zyklotron voraussetzt [60]. Tracer, die mit [¹⁸F] markierbar sind, ebenfalls ein Positronenemitter und flächendeckend im [¹⁸F]FDG-PET im Einsatz, wären eine denkbare Alternative zur [¹¹C] Markierung. Ein Tracer der außerdem spezifisch und hochaffin an die Aldosteronsynthase bindet, wie in den *in vitro* Versuchen dieser Arbeit für 6 Aldosteronsynthaseinhibitoren gezeigt, ergäben neue Möglichkeiten für die Differentialdiagnostik des PHA und zeigen gute Voraussetzung für eine Testung *in vivo* und anschließend in klinischen Studien.

Die untersuchten Tracer dieser Arbeit sind mit [¹⁸F] markierbar und haben in den Zellkulturversuchen eine starke und selektive Inhibition der Aldosteronsynthase gezeigt. In den Bindungsstudien an die humanen Gewebe konnte für den Tracer [¹⁸F]14 eine starke und spezifische Bindung an adrenales Gewebe, bevorzugt an die APAs und die entsprechenden normalen Nebennieren gezeigt werden. Der Tracer [¹⁸F]14 zeigt keine unspezifische Bindung. Die Referenzsubstanz IMTO hingegen bindet auch unspezifisch an Lebergewebe in den durchgeführten *in vitro* Studien. Auch für den PET Tracer [¹¹C]Metomidat ist beschrieben, dass es zu unspezifischen Bindungen an Lebergewebe kommt, sowohl in *in vitro* Bindungsstudien an Gefrierschnitten, als auch in *in vivo* Studien an Affen [58]. Für die Bildgebung ist diese unspezifische Bindung für eine eindeutige Interpretation der Befunde hinderlich. Somit kann es bei unspezifischer Bindung an Lebergewebe zu einer erschwerten Interpretationsmöglichkeit der rechten Nebenniere kommen [59].

Um zu verifizieren, ob die hohe Bindung des [¹⁸F]14 Tracers an die adrenalen Gewebe durch die Bindung an die Aldosteronsynthese bedingt ist, war das Ziel, die in der Bindungsstudie eingesetzten Schnitte mit den angefertigten Schnittserien zu vergleichen. Hierzu sollten die in Serie geschnittenen Gewebe mittels immunhistochemischer Färbung angefärbt werden und so die Aldosteronsynthese und die 11β-Hydroxylase zur Darstellung kommen [9]. Hier könnte man auch die Erklärung finden dafür, dass sowohl [¹²⁵I]IMTO als auch [¹⁸F]14 stärker an die eine in den Versuchen eingesetzte normale Nebenniere binden und nur geringer an das entsprechende aldosteronproduzierende Adenom. Nach Anfärbung mit einem Antikörper, der die Expression des CYP11B2 markiert, könnte man erkennen, in welchem Maße in den Gewebeschnitten auch tatsächlich die Aldosteronsynthese vorliegt [9].

Es konnte gezeigt werden, dass bei CPAs in Anteilen nichttumorösen Gewebes der Nebenniere Zellcluster vorliegen, die CYP11B2 exprimieren, wobei im tumorösen Anteil des CPA ausschließlich CYP11B1 exprimierende Zellen vorliegen [9]. Die Möglichkeit, dass diese Zellcluster, die CYP11B2 exprimieren, in dem untersuchten CPA vorliegen, woran der Tracer [¹⁸F]14 bindet, besteht und könnte durch die immunhistochemische Anfärbung bestätigt werden. Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit Antikörpern durchgeführt, die bisher für die Anfärbung von formalinfixiertem Paraffingewebe eingesetzt wurden [9]. Für die Anfärbung von Gefrierschnitten konnten in dieser Arbeit keine guten und reproduzierbaren Ergebnisse geliefert werden. Um mit dieser immunhistochemischen Methode die Aldosteronsynthese bzw. 11β-Hydroxylase in den verwendeten Gefrierschnitten nachzuweisen, müssten weitere Modifikationen an den Färbeprotokollen und/oder an der Fixierungsmethode erfolgen. Die durchgeführte Fixierung mittels Paraformaldehyd verändert z.B. bei Überfixierung die Aminosäurestruktur und kann damit das Epitop der Antikörperbindungsstelle verändern [88]. Andere Fixierungen mittels z.B. alkoholischen Fixantien oder Aceton könnten die immunhistochemische Anfärbung mit den vorliegenden Antikörpern ermöglichen. Die Etablierung geeigneter Fixierungs- und Färbeprotokolle war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

6 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in dieser Arbeit 15 neu entwickelte Substanzen zur selektiven und hochaffinen Blockade der Aldosteronsynthese untersucht werden konnten. Es wurden mehrere neue aufeinander aufbauende Testsysteme etabliert, um die neuen Substanzen auf ihre Selektivität und Affinität gegenüber der Aldosteronsynthese zu untersuchen. Eine Testung der Inhibition der humanen Aldosteronsynthese und der 11 β -Hydroxylase zuerst in getrennten Zellkulturansätzen, die die humanen Enzyme stabil exprimieren, und anschließend in der NCI-h295 Zelllinie, die beide Enzyme und zusätzlich die meisten anderen Enzyme der Steroidbiosynthese stabil exprimieren, ist eine gute Voraussetzung, um selektive und hochaffine Aldosteronsynthaseinhibitoren zu finden. Hier konnten sechs Inhibitoren ausgewählt werden, die hochaffin und selektiv an die Aldosteronsynthese binden und diese inhibieren. Die weitere Testung der [^{18}F] markierten Substanzen zeigte für eine Substanz eine hochaffine und selektive Bindung an humanes adrenales Gewebe und keine unspezifische Bindung an andere humane Gewebe. Hier liegt die Voraussetzung vor, den Tracer weiteren *in vivo* Studien zuzuführen, um am humanisierten Mausmodell zu untersuchen, ob eine Bindung *in vivo* entsprechend den vielversprechenden Ergebnissen *in vitro* abläuft. Auch die *ex vivo* Studie an Nebennieren einer gegenüber der CYP11B2 humanisierten Maus bekräftigte diese Ergebnisse. Mit Hilfe dieser Untersuchungsmethoden lassen sich in Zukunft noch weiter entwickelte Substanzen umfangreich auf ihre Selektivität, Spezifität und Affinität testen. Dies dient als Grundlage für weitere Untersuchungen zur Entwicklung eines PET-Tracers für die Differentialdiagnostik bei primärem Hyperaldosteronismus. Eine Erkrankung, die häufiger ist als vermutet, und bei der die Differentialdiagnostik die entscheidende Voraussetzung für die Einleitung einer Therapie ist, die sich entweder operativ oder medikamentös darstellt. Bisherige differentialdiagnostische Vorgehensweisen beim primären Hyperaldosteronismus bieten aktuell keine zufriedenstellenden Ergebnisse; dies kann sich mit der Einführung eines neuen PET Tracers ändern.

7 Literaturverzeichnis

1. Lippert, H., *Lehrbuch Anatomie*. Vol. 6. 2003: Urban und Fischer.
2. Schulte, E., *Anatomie Duale Reihe*. Vol. 2. 2010: Georg Thieme Verlag Stuttgart.
3. Udelsman, R., *Adrenal in Surgery, Basic Science and Clinical Evidence*. 2008: Springer New York.
4. Sadler, W. and J. Langmann, *Medizinische Embryologie*. Vol. 11. 2008: Georg Thieme Verlag Stuttgart.
5. Löffler, G., *Basiswissen Biochemie*. Vol. 6. 2005: Springer Verlag Heidelberg.
6. Königshoff, M. and T. Brandenburg, *Kurzlehrbuch Biochemie*. Vol. 1. 2004: Georg Thieme Verlag Stuttgart.
7. Böcker, W., H. Denk, and P.U. Heitz, *Pathologie*. Vol. 3. 2004: Elsevier München.
8. Elliott, T.R., *Some results of excision of the adrenal glands*. J Physiol, 1914. **49**(1-2): p. 38-53.
9. Nishimoto, K., et al., *Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(5): p. 2296-305.
10. Lüllmann, H., *Taschenatlas Pharmakologie*. Vol. 6. 2008: Georg Thieme Verlag Stuttgart.
11. Herold, G., *Innere Medizin*. 2011: Gerd Herold.
12. Arlt, W., et al., *Dehydroepiandrosterone replacement in women with adrenal insufficiency*. N Engl J Med, 1999. **341**(14): p. 1013-20.
13. Allolio, B. and W. Arlt, *DHEA treatment: myth or reality?* Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(7): p. 288-94.
14. Lang, K., S. Burger-Stritt, and S. Hahner, *Is DHEA replacement beneficial in chronic adrenal failure?* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2015. **29**(1): p. 25-32.
15. Lüllmann-Rauch, R., *Histologie*. Vol. 1. 2003: Georg Thieme Verlag Stuttgart.
16. Muller-Vieira, U., M. Angotti, and R.W. Hartmann, *The adrenocortical tumor cell line NCI-H295R as an in vitro screening system for the evaluation of CYP11B2 (aldosterone synthase) and CYP11B1 (steroid-11beta-hydroxylase) inhibitors*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2005. **96**(3-4): p. 259-70.

17. Born-Frontsberg, E. and M. Quinkler, [*Conn's syndrome*]. Internist (Berl), 2009. **50**(1): p. 17-26.
18. Potthoff, S.A., F. Beuschlein, and O. Vonend, [*Primay hyperaldosteronism--diagnostic and treatment*]. Dtsch Med Wochenschr, 2012. **137**(48): p. 2480-4.
19. Delcayre, C., et al., *Cardiac aldosterone production and ventricular remodeling*. Kidney Int, 2000. **57**(4): p. 1346-51.
20. Conn, J.W., *Presidential address. I. Painting background. II. Primary aldosteronism, a new clinical syndrome*. J Lab Clin Med, 1955. **45**(1): p. 3-17.
21. Reincke M, S.L., Rump LC, *Normokaliämischer primärer Hyperaldosteronismus*. Deutsches Ärzteblatt, 2003. **4**(100): p. A184-190.
22. Mulatero, P., et al., *Increased diagnosis of primary aldosteronism, including surgically correctable forms, in centers from five continents*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(3): p. 1045-50.
23. Stewart, P.M. and B. Allolio, *Adrenal vein sampling for Primary Aldosteronism: time for a reality check*. Clin Endocrinol (Oxf), 2010. **72**(2): p. 146-8.
24. Calhoun, D.A., et al., *Hyperaldosteronism among black and white subjects with resistant hypertension*. Hypertension, 2002. **40**(6): p. 892-6.
25. Funder, J.W., et al., *Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(9): p. 3266-81.
26. Rossi, G.P., et al., *A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(11): p. 2293-300.
27. Hannemann, A., et al., *Screening for primary aldosteronism in hypertensive subjects: results from two German epidemiological studies*. Eur J Endocrinol, 2012. **167**(1): p. 7-15.
28. Beuschlein, F., *Regulation of aldosterone secretion: from physiology to disease*. Eur J Endocrinol, 2013. **168**(6): p. R85-93.
29. Amar, L., P.F. Plouin, and O. Steichen, *Aldosterone-producing adenoma and other surgically correctable forms of primary aldosteronism*. Orphanet J Rare Dis, 2010. **5**: p. 9.
30. Boulkroun, S., et al., *Adrenal cortex remodeling and functional zona glomerulosa hyperplasia in primary aldosteronism*. Hypertension, 2010. **56**(5): p. 885-92.
31. Wang, T., et al., *Gene expression profiles in aldosterone-producing adenomas and adjacent adrenal glands*. Eur J Endocrinol, 2011. **164**(4): p. 613-9.

32. Bassett, M.H., et al., *Expression profiles for steroidogenic enzymes in adrenocortical disease*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(9): p. 5446-55.
33. Giacchetti, G., et al., *Primary aldosteronism, a major form of low renin hypertension: from screening to diagnosis*. Trends Endocrinol Metab, 2008. **19**(3): p. 104-8.
34. Savard, S., et al., *Cardiovascular complications associated with primary aldosteronism: a controlled cross-sectional study*. Hypertension, 2013. **62**(2): p. 331-6.
35. Milliez, P., et al., *Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(8): p. 1243-8.
36. Funder, J.W., *Medicine. The genetics of primary aldosteronism*. Science, 2011. **331**(6018): p. 685-6.
37. Born-Frontsberg, E., et al., *Cardiovascular and cerebrovascular comorbidities of hypokalemic and normokalemic primary aldosteronism: results of the German Conn's Registry*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(4): p. 1125-30.
38. Schirpenbach, C., et al., *The diagnosis and treatment of primary hyperaldosteronism in Germany: results on 555 patients from the German Conn Registry*. Dtsch Arztebl Int, 2009. **106**(18): p. 305-11.
39. Lumachi, F., et al., *Long-term results of adrenalectomy in patients with aldosterone-producing adenomas: multivariate analysis of factors affecting unresolved hypertension and review of the literature*. Am Surg, 2005. **71**(10): p. 864-9.
40. Letavernier, E., et al., *Blood pressure outcome of adrenalectomy in patients with primary hyperaldosteronism with or without unilateral adenoma*. J Hypertens, 2008. **26**(9): p. 1816-23.
41. Rossi, G.P., et al., *An expert consensus statement on use of adrenal vein sampling for the subtyping of primary aldosteronism*. Hypertension, 2014. **63**(1): p. 151-60.
42. Mulatero, P., et al., *Diagnosis of primary aldosteronism: from screening to subtype differentiation*. Trends Endocrinol Metab, 2005. **16**(3): p. 114-9.
43. Mosso, L., et al., *Primary aldosteronism and hypertensive disease*. Hypertension, 2003. **42**(2): p. 161-5.
44. Tanabe, A., et al., *Variability in the renin/aldosterone profile under random and standardized sampling conditions in primary aldosteronism*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(6): p. 2489-94.
45. Reincke M., S.L., Rump L.C., *Normokaliämischer primärer Hyperaldosteronismus*. Deutsches Ärzteblatt, 2003. **4**: p. A184-190.

46. Young, W.F., et al., *Role for adrenal venous sampling in primary aldosteronism*. *Surgery*, 2004. **136**(6): p. 1227-35.
47. Vonend, O., et al., [*Comparison of adrenal imaging and selective adrenal vein sampling in primary hyperaldosteronism*]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2007. **132**(46): p. 2436-41.
48. Lim, V., et al., *Accuracy of adrenal imaging and adrenal venous sampling in predicting surgical cure of primary aldosteronism*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014. **99**(8): p. 2712-9.
49. Harvey, A., G. Kline, and J.L. Pasiaka, *Adrenal venous sampling in primary hyperaldosteronism: comparison of radiographic with biochemical success and the clinical decision-making with "less than ideal" testing*. *Surgery*, 2006. **140**(6): p. 847-53; discussion 853-5.
50. Daunt, N., *Adrenal vein sampling: how to make it quick, easy, and successful*. *Radiographics*, 2005. **25 Suppl 1**: p. S143-58.
51. Vonend, O., et al., *Adrenal venous sampling: evaluation of the German Conn's registry*. *Hypertension*, 2011. **57**(5): p. 990-5.
52. Young, W.F. and A.W. Stanson, *What are the keys to successful adrenal venous sampling (AVS) in patients with primary aldosteronism?* *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2009. **70**(1): p. 14-7.
53. Seccia, T.M., et al., *Adrenocorticotrophic hormone stimulation during adrenal vein sampling for identifying surgically curable subtypes of primary aldosteronism: comparison of 3 different protocols*. *Hypertension*, 2009. **53**(5): p. 761-6.
54. Kloos, R.T., et al., *Incidentally discovered adrenal masses*. *Endocr Rev*, 1995. **16**(4): p. 460-84.
55. Sundin, A., *Imaging of adrenal masses with emphasis on adrenocortical tumors*. *Theranostics*, 2012. **2**(5): p. 516-22.
56. Mansmann, G., et al., *The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management*. *Endocr Rev*, 2004. **25**(2): p. 309-40.
57. Hahner, S., et al., [*123 I*]Iodometomidate for molecular imaging of adrenocortical cytochrome P450 family 11B enzymes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. **93**(6): p. 2358-65.
58. Bergstrom, M., et al., *In vitro and in vivo primate evaluation of carbon-11-etomidate and carbon-11-metomidate as potential tracers for PET imaging of the adrenal cortex and its tumors*. *J Nucl Med*, 1998. **39**(6): p. 982-9.
59. Bergstrom, M., et al., *PET imaging of adrenal cortical tumors with the 11beta-hydroxylase tracer 11C-metomidate*. *J Nucl Med*, 2000. **41**(2): p. 275-82.

60. Hahner, S., et al., *Functional characterization of adrenal lesions using [123I]IMTO-SPECT/CT*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(4): p. 1508-18.
61. Hennings, J., et al., *[11C]metomidate positron emission tomography of adrenocortical tumors in correlation with histopathological findings*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(4): p. 1410-4.
62. Kreissl, M.C., et al., *[(1)(2)(3)I]Iodometomidate imaging in adrenocortical carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(7): p. 2755-64.
63. Hahner, S., et al., *[131I]iodometomidate for targeted radionuclide therapy of advanced adrenocortical carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(3): p. 914-22.
64. Hennings, J., et al., *11C-metomidate positron emission tomography after dexamethasone suppression for detection of small adrenocortical adenomas in primary aldosteronism*. Langenbecks Arch Surg, 2010. **395**(7): p. 963-7.
65. Burton, T.J., et al., *Evaluation of the sensitivity and specificity of (11)C-metomidate positron emission tomography (PET)-CT for lateralizing aldosterone secretion by Conn's adenomas*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(1): p. 100-9.
66. Azizi, M., L. Amar, and J. Menard, *Aldosterone synthase inhibition in humans*. Nephrol Dial Transplant, 2013. **28**(1): p. 36-43.
67. Connell, J.M., et al., *A lifetime of aldosterone excess: long-term consequences of altered regulation of aldosterone production for cardiovascular function*. Endocr Rev, 2008. **29**(2): p. 133-54.
68. Fiebeler, A., et al., *Aldosterone synthase inhibitor ameliorates angiotensin II-induced organ damage*. Circulation, 2005. **111**(23): p. 3087-94.
69. Pitt, B., et al., *Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction*. N Engl J Med, 2003. **348**(14): p. 1309-21.
70. Pitt, B., et al., *The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators*. N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 709-17.
71. Amar, L., et al., *Aldosterone synthase inhibition with LCI699: a proof-of-concept study in patients with primary aldosteronism*. Hypertension, 2010. **56**(5): p. 831-8.
72. Calhoun, D.A., et al., *Effects of a novel aldosterone synthase inhibitor for treatment of primary hypertension: results of a randomized, double-blind, placebo- and active-controlled phase 2 trial*. Circulation, 2011. **124**(18): p. 1945-55.

73. Bertagna, X., et al., *LCI699, a potent 11beta-hydroxylase inhibitor, normalizes urinary cortisol in patients with Cushing's disease: results from a multicenter, proof-of-concept study*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(4): p. 1375-83.
74. Yasumura, Y., V. Buonassisi, and G. Sato, *Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype*. Cancer Res, 1966. **26**(3): p. 529-35.
75. Gazdar, A.F., et al., *Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis*. Cancer Res, 1990. **50**(17): p. 5488-96.
76. Loening, A.M. and S.S. Gambhir, *AMIDE: a free software tool for multimodality medical image analysis*. Mol Imaging, 2003. **2**(3): p. 131-7.
77. Hobler, A., et al., *Human aldosterone synthase: recombinant expression in E. coli and purification enables a detailed biochemical analysis of the protein on the molecular level*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2012. **132**(1-2): p. 57-65.
78. Bassett, M.H., P.C. White, and W.E. Rainey, *The regulation of aldosterone synthase expression*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **217**(1-2): p. 67-74.
79. Taymans, S.E., et al., *Human CYP11B2 (aldosterone synthase) maps to chromosome 8q24.3*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(3): p. 1033-6.
80. Menard, J., et al., *Aldosterone synthase inhibition: cardiorenal protection in animal disease models and translation of hormonal effects to human subjects*. J Transl Med, 2014. **12**: p. 340.
81. Hargovan, M. and A. Ferro, *Aldosterone synthase inhibitors in hypertension: current status and future possibilities*. JRSM Cardiovasc Dis, 2014. **3**: p. 2048004014522440.
82. Quinkler, M., et al., *Adrenal cortical insufficiency--a life threatening illness with multiple etiologies*. Dtsch Arztebl Int, 2013. **110**(51-52): p. 882-8.
83. Quinkler, M., *Morbus Addison Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin*, 2012. **107**(6): p. 454-459.
84. Rigel, D.F., et al., *Pharmacodynamic and pharmacokinetic characterization of the aldosterone synthase inhibitor FAD286 in two rodent models of hyperaldosteronism: comparison with the 11beta-hydroxylase inhibitor metyrapone*. J Pharmacol Exp Ther, 2010. **334**(1): p. 232-43.
85. LaSala, D., Y. Shibanaka, and A.Y. Jeng, *Coexpression of CYP11B2 or CYP11B1 with adrenodoxin and adrenodoxin reductase for assessing the potency and selectivity of aldosterone synthase inhibitors*. Anal Biochem, 2009. **394**(1): p. 56-61.

86. Ehmer, P.B., et al., *Development of a test system for inhibitors of human aldosterone synthase (CYP11B2): screening in fission yeast and evaluation of selectivity in V79 cells.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2002. **81**(2): p. 173-9.
87. Zettinig, G., et al., *Positron emission tomography imaging of adrenal masses: (18)F-fluorodeoxyglucose and the 11beta-hydroxylase tracer (11)C-metomidate.* Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2004. **31**(9): p. 1224-30.
88. www.rndsystems.com.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken die einen Teil dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit entstehen konnte.

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. Stefanie Hahner herzlichst für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit bedanken. Vielen Dank für die kontinuierliche Unterstützung und das stets offene Ohr für jegliche Fragen, die im Verlauf dieser Arbeit auftraten und immer sehr zuverlässig beantwortet wurden.

Außerdem gebührt Frau Dr. Britta Heinze ein großer Dank für eine tolle Betreuung während der gesamten Entstehungszeit der Arbeit. Durch Ihre Ideen und Denkanstöße, aber auch durch die tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit war diese Arbeit erst möglich.

An Herrn Dr. Andreas Schirbel aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin ergeht ein herzliches Dankeschön für die Synthese der Aldosteronsynthaseinhibitoren und Radiosynthese der Tracer, wann immer ich diese für die Versuche benötigte. Außerdem vielen Dank für die Beantwortung aller Fragen, nicht nur zu besonderen chemischen Fragestellungen.

Ein großer Dank geht an die MTAs aus dem Forschungslabor der Endokrinologie, insbesondere Katja Marienfeld, Martina Zink und Sonja Steinhauer für die Einführung in den Laboralltag, in die Zellkulturarbeiten und der tatkräftigen Unterstützung bei einigen Versuchen. Ebenfalls hatten Sie stets ein offenes Ohr für alle meine Fragen.

Ich möchte mich bei meiner Familie und Freunden bedanken. Meine Eltern haben mir erst meine Ausbildung und das anschließende Studium der Humanmedizin ermöglicht und mir bei allen Schritten meines Lebens den Rücken gestärkt. Vielen Dank an meine Zwillingsschwester für die Unterstützung und die konstruktive Kritik. Uns wird stets eine besondere Beziehung verbinden.

Zuletzt möchte ich meinem Mann Christian danken. Du stehst nun über die Hälfte meines Lebens an meiner Seite und unterstützt mich bei allen Entscheidungen, auch wenn ich diese mal nicht in Deinem Sinne treffe. Vielen Dank für alles, ohne Dich hätte ich diese Arbeit und andere Projekte in meinem Leben nie beenden können.