

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

Erfassung der Strahlenbelastung des Nebennierenvenenkatheters  
und Evaluation des Chemokinrezeptors CXCR4 als neues Target in  
der Differentialdiagnostik des primären Hyperaldosteronismus

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Carmina Teresa Fuß  
aus Würzburg**

**Würzburg, April 2018**

**Referentin: Prof. Dr. med. Stefanie Hahner**  
**Korreferent: Prof. Dr. med. Andreas Buck**  
**Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 2019**

**Die Promovendin ist Ärztin**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG UND GRUNDLAGEN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Nebenniere .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 <i>Entwicklung und Anatomie</i> .....	1
1.1.2 <i>Physiologie</i> .....	3
1.1.2.1 <i>Synthese und Funktion der Nebennierenrindenhormone</i> .....	3
1.1.2.2 <i>Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse</i> .....	4
1.1.2.3 <i>Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System</i> .....	5
<b>1.2 Primärer Hyperaldosteronismus .....</b>	<b>6</b>
1.2.1 <i>Definition, Klinik und Komorbiditäten</i> .....	6
1.2.2 <i>Diagnostik</i> .....	7
1.2.2.1 <i>Screening</i> .....	7
1.2.2.2 <i>Bestätigungstest</i> .....	8
1.2.2.3 <i>Lokalisationsdiagnostik</i> .....	8
1.2.2.4 <i>Alternativen zum Nebennierenvenenkatheter</i> .....	10
1.2.3 <i>Therapie</i> .....	12
<b>1.3 Chemokine und Chemokinrezeptoren .....</b>	<b>13</b>
1.3.1 <i>Grundlagen und Physiologie</i> .....	13
1.3.2 <i>Die CXCR4/CXCL12/CXCR7-Achse</i> .....	15
1.3.3 <i>CXCR4-spezifische PET-Bildgebung</i> .....	16
<b>1.4 Risiken erhöhter Strahlenexposition .....</b>	<b>16</b>
<b>2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>18</b>
<b>3. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Patienten .....</b>	<b>19</b>
3.1.1 <i>Nebennierenvenenkatheter</i> .....	19
3.1.2 <i>Patientenmaterial</i> .....	19
3.1.2.1 <i>Aldosteron-produzierende Adenome</i> .....	19
3.1.2.2 <i>Cortisol-produzierende Adenome</i> .....	20
3.1.2.3 <i>Endokrin-inaktive Adenome</i> .....	20
<b>3.2 Material .....</b>	<b>21</b>
3.2.1 <i>Geräte</i> .....	21
3.2.2 <i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	22
3.2.3 <i>Puffer, Lösungen und Reagenzien</i> .....	22

3.2.4	<i>Kits</i> .....	23
<b>3.3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>23</b>
3.3.1	<i>Parameter der Strahlenbelastung bei NNVK</i> .....	23
3.3.2	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)</i> .....	24
3.3.2.1	RNA-Extraktion.....	25
3.3.2.2	Herstellung von cDNA aus RNA.....	25
3.3.2.3	quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	25
3.3.3	<i>Immunhistochemie</i> .....	27
3.3.3.1	Durchführung.....	27
3.3.3.2	Auswertung.....	28
3.3.4	<i>Bildgebung mit <sup>68</sup>Ga-Pentixafor</i> .....	29
3.3.4.1	Synthese.....	29
3.3.4.2	Bindungsstudien .....	29
3.3.4.3	Patientenbildgebung.....	30
3.3.5	<i>Statistische Auswertung</i> .....	31
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>33</b>
4.1	<b>Erfassung der Strahlenbelastung bei Nebennierenvenenkathetern</b> .....	<b>33</b>
4.1.1	<i>Allgemeine Daten</i> .....	33
4.1.2	<i>Dosisflächenprodukt, Effektive Dosis und Durchleuchtungszeit</i> .....	34
4.1.3	<i>Untersuchungsmodalitäten</i> .....	38
4.2	<b>Quantitative Analyse der Expression verschiedener Chemokinrezeptoren</b> .....	<b>40</b>
4.3	<b>Immunhistochemie</b> .....	<b>41</b>
4.3.1	<i>Normale Nebenniere</i> .....	41
4.3.2	<i>Nebennierenadenome</i> .....	43
4.4	<b>Bildgebung mit <sup>68</sup>Ga-Pentixafor</b> .....	<b>47</b>
4.4.1	<i>Ex vivo Bildgebung</i> .....	47
4.4.2	<i>Patientenbildgebung</i> .....	48
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>54</b>
5.1	<b>Strahlenbelastung durch Nebennierenvenenkatheter</b> .....	<b>54</b>
5.2	<b>Chemokinrezeptoren in der Nebenniere und adrenocorticalen Adenomen</b> .....	<b>56</b>
5.2.1	<i>Normale Nebenniere</i> .....	56
5.2.2	<i>Nebennierenadenome</i> .....	58
5.3	<b>Funktionelle Bildgebung bei primärem Hyperaldosteronismus</b> .....	<b>60</b>

<b>5.4</b>	<b>Evaluation von <sup>68</sup>Ga-Pentixafor in Aldosteron-produzierenden Adenomen .....</b>	<b>61</b>
<b>5.5</b>	<b>Limitationen .....</b>	<b>63</b>
5.5.1	<i>Evaluation der Strahlenbelastung bei Nebennierenvenenkathetern .....</i>	63
5.5.2	<i><sup>68</sup>Ga-Pentixafor-PET bei primärem Hyperaldosteronismus .....</i>	64
<b>5.6</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>65</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>66</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>68</b>
<b>8.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>90</b>
<b>9.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>92</b>
<b>10.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>93</b>

## **DANKSAGUNG**

Meinen Eltern  
Rosaria und Albert

# 1. Einleitung und Grundlagen

## 1.1 Nebenniere

### 1.1.1 Entwicklung und Anatomie

Die Nebennieren (*Glandulae suprarenales*) sind paarig angelegte Organe, die retroperitoneal dem oberen Nierenpol aufsitzen und von einer Fettgewebkapsel (*Capsula adiposa renalis*) umgeben sind. Die arterielle Versorgung wird durch einen oberflächlichen Gefäßplexus gewährleistet, der aus drei Nebennierenarterien, *A. suprarenalis superior* aus der *A. phrenica inferior*, *A. suprarenalis media* aus der *Aorta abdominalis* und *A. suprarenalis inferior* aus der *A. renalis*, gespeist wird. Über sinusoidale Kapillaren durchfließt das Blut zunächst die Nebennierenrinde und anschließend die Sinusoide des Markes. Weitere Äste des Plexus versorgen das Nebennierenmark direkt. Der venöse Abfluss erfolgt über Markvenen in die *V. suprarenalis*, die links in die *V. renalis* und rechts direkt in die *V. cava inferior* mündet [1,2].

Makroskopisch lässt sich die Nebenniere in Rinde und Mark unterteilen. Die Nebennierenrinde umschließt das Nebennierenmark komplett und stellt sich aufgrund des hohen Lipidgehalts gelblich dar. Mikroskopisch gliedert sich die Rinde, von außen nach innen, weiter in drei Schichten: *Zona glomerulosa*, *Zona fasciculata* und *Zona reticularis* (**Abbildung 1**). Die Zellen aller drei Schichten synthetisieren bedarfsangepasst verschiedene Steroidhormone aus Cholesterinestern, die in Lipidtröpfchen gespeichert sind. Die unterschiedlichen Enzyme der Steroidhormonbiosynthese befinden sich in den Membranen der tubulären Mitochondrien, sowie des glatten endoplasmatischen Retikulums [3].

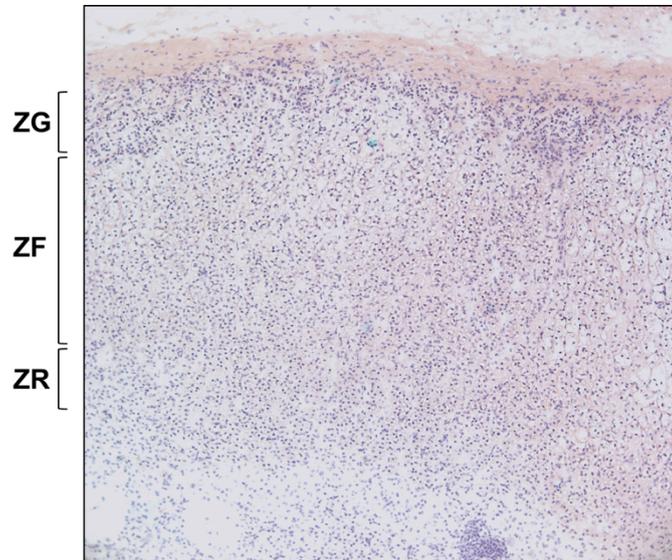
Die *Zona glomerulosa* liegt als schmalste Schicht der Nebennierenrinde direkt subkapsulär. Ihre Zellen sind eher klein, wenig lipidhaltig, bilden Zellcluster und synthetisieren Mineralocorticoide.

Im Gegensatz dazu macht die *Zona fasciculata* den größten Teil der Nebennierenrinde aus. Die strangartig angeordneten Zellen enthalten viele Lipidgranula und dienen der Glucocorticoidproduktion.

Die *Zona reticularis* sezerniert hauptsächlich Androgen-Vorstufen. Ihre Zellen sind im Vergleich zur *Zona fasciculata* netzartig verzweigt, kleiner, enthalten weniger Lipidtröpfchen und sind reicher an Lipofuszingranula.

Das Nebennierenmark sezerniert Katecholamine (Adrenalin, Noradrenalin) und

besteht hauptsächlich aus Strängen und Nestern feingranulierter, epithelartiger, chromaffiner Zellen. Weiterhin enthält das Nebennierenmark multipolare sympathische Ganglienzellen [1,4-6].



**Abbildung 1:** HE-Färbung der Nebennierenrinde. Vergrößerung 10x. ZG=Zona glomerulosa, ZF=Zona fasciculata, ZR=Zona reticularis. HE-Färbung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Zink, Endokrinologisches Labor, Universitätsklinikum Würzburg.

Die Nebennierenrinde ist mesodermalen Ursprungs. Bereits in der 5. Entwicklungswoche migrieren Zölomepithelzellen in das Mesenchym zwischen Mesenterialwurzel und Gonadenanlage. Dort differenzieren diese zu Zellen der fetalen Nebennierenrinde. Diese macht zu diesem Zeitpunkt 80-90% der Nebennierenrinde aus und ist Ort der Androgensynthese (insbesondere Dehydroepiandrosteron). Kurz darauf wird die fetale Nebennierenrinde von weiteren, kleineren Zölomepithelzellen umwachsen, die später die definitive Nebennierenrinde bilden und für die Cortisolproduktion verantwortlich sind. Postnatal kommt es rasch zur Rückbildung der fetalen Nebennierenrinde, mit Ausnahme der äußeren Schicht, die sich zur *Zona reticularis* entwickelt. Abgeschlossen ist der endgültige Umbau der Nebennierenrinde allerdings erst kurz vor der Pubertät [7,8].

Das Nebennierenmark entsteht aus Ektoderm. Während der Entwicklung der fetalen Nebennierenrinde kommt es zur Einwanderung von Sympathikoblasten aus der Neuralleiste, die ein modifiziertes sympathisches Ganglion bilden [2,8].

## 1.1.2 Physiologie

### 1.1.2.1 Synthese und Funktion der Nebennierenrindenhormone

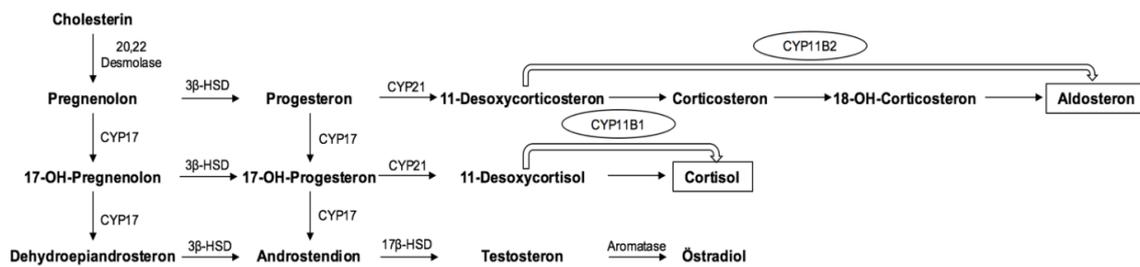
Die Nebennierenrinde ist für die Synthese verschiedener Steroidhormone verantwortlich. Hierzu zählen insbesondere Androgenvorstufen, Glucocorticoide und Mineralocorticoide. Als gemeinsamer Ausgangspunkt der Steroidhormone dient jeweils das Cholesterol.

Die Sexualsteroiden werden hauptsächlich in der *Zona reticularis* synthetisiert. Hierbei handelt es sich vor allem um Dehydroepiandrosteron (DHEA) und sein Sulfat DHEAS, sowie Androstendion. Diese können in den Zielgeweben zu Testosteron, Dihydrotestosteron und Östradiol umgewandelt werden [9].

Zellen der *Zona fasciculata* produzieren Glucocorticoide, insbesondere Cortisol, welche über die Bindung an den zytoplasmatischen Glucocorticoidrezeptor eine Vielzahl von Wirkungen entfalten können. Diese dienen vor allem der Adaptation des Körpers an Belastungssituationen. So stimulieren Glucocorticoide die hepatische Gluconeogenese, wirken katabol auf Muskulatur und Knochen, sowie synergistisch mit Katecholaminen. Außerdem haben sie immunsuppressive und antiinflammatorische Effekte und beeinflussen auf neuronaler Ebene Aufmerksamkeit, Lernbereitschaft und Stimmung [10]. Der Cortisoltransport im Blut erfolgt hauptsächlich über Bindung an Cortisolbindendes Globulin und Albumin [11]. An der Biosynthese der Glucocorticoide ist in entscheidendem Maße das Enzym CYP11B1 (11 $\beta$ -Hydroxylase) beteiligt. Dies wird hauptsächlich von Zellen der *Zona fasciculata* und *Zona reticularis* exprimiert, weniger in der *Zona glomerulosa*. CYP11B1 ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und katalysiert die 11 $\beta$ -Hydroxylierung von 11-Desoxycorticosteron oder 11-Desoxycortisol zu Corticosteron bzw. Cortisol [3].

Als von den Glomerulosazellen synthetisiertes Mineralocorticoid, spielt Aldosteron eine zentrale Rolle im Wasserhaushalt und der Blutdruckregulation. Es wirkt über die Bindung an den zytosolischen Mineralocorticoidrezeptor, der insbesondere in den Sammelrohren der Niere, aber auch dem Colon und den Schweißdrüsen zu finden ist. Seine Aktivierung führt u. a. zur gesteigerten Expression eines apikalen Natriumkanals (ENaC) und der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. In der Niere bewirkt Aldosteron eine Rückresorption von Natrium und Wasser am distalen Tubulus und Sammelrohr, wie auch eine vermehrte Ausscheidung von

Kalium-, Wasserstoff- und Ammoniumionen. Die Kaliumkonzentration im Serum nimmt in der Folge ab, das Blutvolumen nimmt zu und der Blutdruck steigt an. In Schweiß- und Speicheldrüsen und im Darm kommt es zusätzlich zu einer verlangsamten Natriumausscheidung [12]. Schlüsselenzym der Aldosteronsynthese ist CYP11B2, das im Gegensatz zu CYP11B1 zur Katalyse sowohl der 11 $\beta$ -Hydroxylierung von 11-Desoxycorticosteron als auch der anschließenden 18-Hydroxylierung und Oxidation fähig ist (**Abbildung 2**) [3,13].



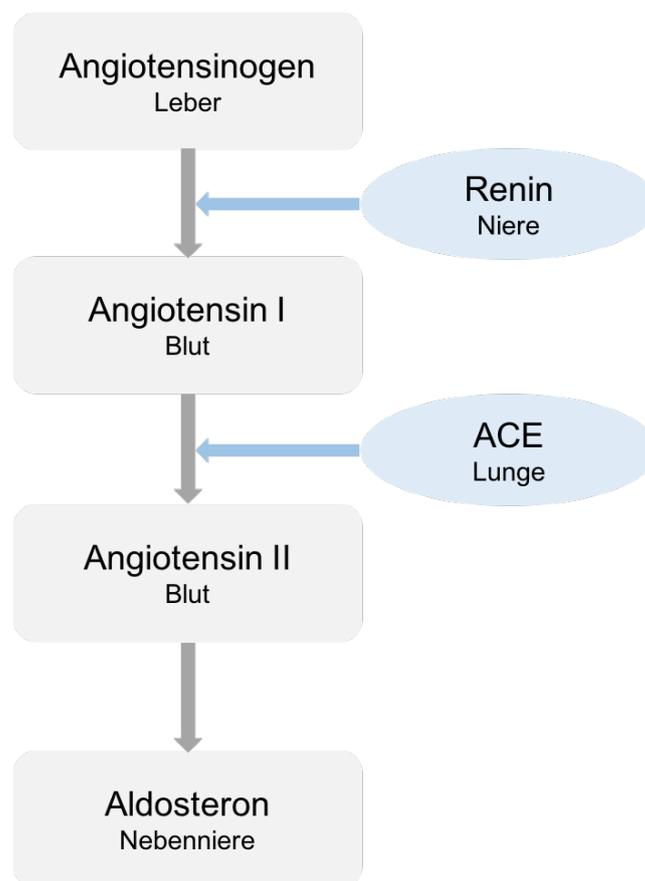
**Abbildung 2:** Steroidhormonbiosynthese. Modifiziert nach [12,14].

### 1.1.2.2 Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse

Die Glucocorticoidsynthese in der Nebenniere wird über das Zusammenspiel von Hypothalamus und Hypophyse gesteuert. Durch verschiedene Auslöser (z. B. Hypoglykämie, Stress), oder im Rahmen der zirkadianen Rhythmik erfolgt die Ausschüttung des Corticotropin-Releasing-Hormons (CRH) aus Neuronen im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus. Über die Bindung von CRH an G-Protein gekoppelte Rezeptoren auf corticotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens, kommt es zur Ausschüttung von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH), das durch Spaltung von Proopiomelanocortin (POMC) gebildet wird. Bei diesem Vorgang entstehen zusätzlich melanozytenstimulierendes Hormon (MSH),  $\beta$ -Lipotropin und  $\beta$ -Endorphin. ACTH wiederum bindet in der Nebenniere an den G-Protein gekoppelten Melanokortinrezeptor 2, was über verschiedene weitere Zwischenschritte (u. a. Aktivierung von StAR, Expression von Enzymen der Steroidbiosynthese) zur Synthese von Cortisol führt. Die Regulation des Cortisolspiegels erfolgt über eine negative Rückkopplung durch Cortisol auf CRH und ACTH [9,10,12,15,16].

### 1.1.2.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Im Gegensatz zum Cortisol und dessen Regulation durch die HPA-Achse, ist Aldosteron maßgeblich in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) involviert. Dieses dient insbesondere der Regulation des Blutdrucks und des intravasalen Blutvolumens. Die Freisetzung von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere wird hauptsächlich durch einen Abfall des renalen Perfusionsdruckes, aber auch einen erhöhten Sympathikotonus, Prostaglandine, sowie eine erniedrigte Natriumkonzentration an der Macula densa der Niere gefördert [17]. Durch seine proteolytische Aktivität spaltet Renin das in der Leber gebildete Angiotensinogen in Angiotensin I. Anschließend erfolgt die Umwandlung in Angiotensin II durch das Angiotensin-converting Enzym (ACE) (**Abbildung 3**).



**Abbildung 3:** Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Modifiziert nach [17].

Angiotensin II stellt wiederum über seine Wirkung an G-Protein gekoppelten AT1-Rezeptoren den Hauptstimulus der Aldosteronsynthese dar. Zusätzlich wird diese durch die extrazelluläre Kaliumkonzentration und in geringerem

Maße durch ACTH beeinflusst [17]. Angiotensin II selbst führt neben der Steigerung von Aldosteron außerdem u. a. zu einer Vasokonstriktion, vermehrter Natrium-Resorption am proximalen Tubulus der Niere und einer Stimulation der ADH-Freisetzung [9].

## 1.2 Primärer Hyperaldosteronismus

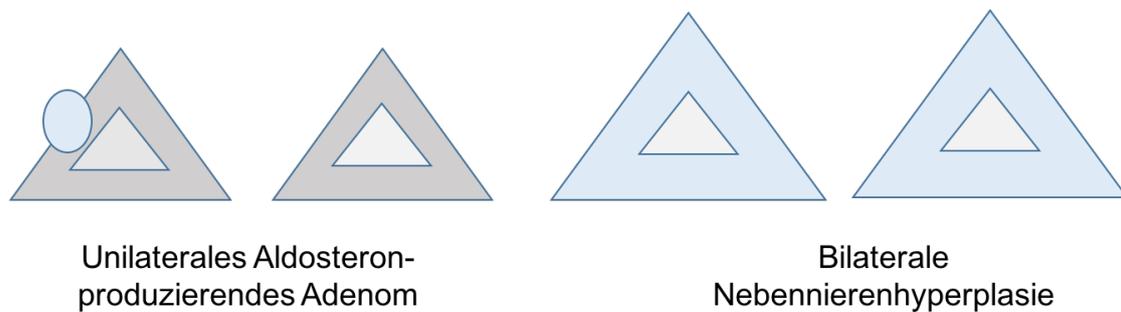
### 1.2.1 Definition, Klinik und Komorbiditäten

Der primäre Hyperaldosteronismus (PA) stellt mit einer Prävalenz von bis zu 12 % unter hypertensiven Patienten die häufigste endokrine Ursache einer sekundären Hypertonie dar [18,19]. Dieses erstmals 1954 von Jerome W. Conn beschriebene Krankheitsbild beruht auf einer Übersekretion von Aldosteron, die zu einer Retention von Natrium und gleichzeitiger Kaliumexkretion im distalen Tubulus und Sammelrohr der Niere führt. In seiner klassischen Verlaufsform geht der PA mit arterieller Hypertonie, Hypokaliämie und metabolischer Alkalose einher [20]. Die Hypokaliämie als charakteristisches Merkmal der Erkrankung liegt allerdings nur bei ca. 10 % der Patienten bei Diagnosestellung vor [19]. Meist beruht der Aldosteronexzess entweder auf einem unilateralen Aldosteron-produzierenden Adenom (APA), oder – in ca. 2/3 der Fälle – auf einer bilateralen Nebennierenhyperplasie (BAH) (**Abbildung 4**) [21-23]. Eine unilaterale Nebennierenhyperplasie, genetische Formen des primären Hyperaldosteronismus, oder ein Aldosteron-produzierendes Nebennierenrindenzarzinom stellen weitere, seltene Ursachen des PA dar [24]. Seit Aufkommen des Next-Generation-Sequencing hat sich das Verständnis der molekularen Mechanismen in APA ebenfalls erweitert. Häufige somatische Mutationen betreffen insbesondere vier Gene, die für verschiedene Kanäle und ATPasen kodieren und mit Unterschieden in der Expression von CYP11B2 einhergehen (**Tabelle 1**) [25,26].

Klinische Symptome der Erkrankung sind meist unspezifisch. Zu diesen Beschwerden zählen beispielsweise Abgeschlagenheit, Polyurie, Muskelschwäche und Parästhesien, die auf eine begleitende Hypokaliämie zurückzuführen sind [27,28].

Der PA ist außerdem mit diversen Komorbiditäten assoziiert. Beispielsweise treten bei Patienten mit PA im Vergleich mit Patienten mit essentieller Hypertonie (EH) häufiger kardio- und zerebrovaskuläre Ereignisse, wie

koronare Herzerkrankung, Vorhofflimmern, Herzinsuffizienz und Apoplex auf [29-33]. Darüber hinaus führt der anhaltende Aldosteronexzess zu renalen, metabolischen und psychischen Komplikationen [29,34-39].



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der häufigsten Entitäten des primären Hyperaldosteronismus. Links: unilaterales Aldosteron-produzierendes Adenom. Rechts: Bilaterale Nebennierenhyperplasie.

Gen	Protein	Vorkommen in sporadischen APA
KCNJ5	Kalium-Kanal GIRK4	10 – 68 %
CACNA1D	L-Typ-Calcium-Kanal Ca <sub>v</sub> 1.3	9,3 %
ATP1A1	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase, α-Untereinheit	5,2 %
ATP2B3	Ca <sup>2+</sup> -ATPase	1,6 %

**Tabelle 1:** Übersicht häufiger Mutationen in sporadischen Aldosteron-produzierenden Adenomen (APA). Modifiziert nach [40-42].

## 1.2.2 Diagnostik

### 1.2.2.1 Screening

Grundsätzlich erfolgt die Diagnostik des PA in Stufen (**Abbildung 5**). Nach der „Clinical Practice Guideline“ der Endocrine Society aus dem Jahr 2016 wird empfohlen, insbesondere Patienten mit einem erhöhten Risiko auf das Vorliegen eines PA zu screenen. Hierzu gehören Patienten mit einer persistierenden Hypertonie > 150/100 mmHg an drei verschiedenen Tagen, mit Hypertonie > 140/90 mmHg unter Therapie mit drei verschiedenen Antihypertensiva, oder mit kontrollierter Hypertonie > 140/90 mmHg unter

mindestens vierfacher antihypertensiver Medikation. Außerdem zählen hierzu Hypertoniker mit Hypokaliämie, Nebenniereninzidentalom, Schlafapnoe, oder einer Familienanamnese von Hypertonie oder zerebrovaskulären Ereignissen in jungen Jahren (< 40 Jahre). Alle hypertensiven Verwandten ersten Grades von Patienten mit bekanntem PA sollten ebenfalls gescreent werden [40].

Die Bestimmung des Aldosteron-Renin-Quotienten (ARQ) stellt aktuell die zuverlässigste Screening-Methode dar. Allerdings wird dieser durch verschiedene äußere Einflussfaktoren verändert, wie beispielsweise Medikamente (insbesondere Antihypertensiva mit Einfluss auf das RAAS), Elektrolythaushalt, Alter, Schwangerschaft, Nierenfunktion, aber auch Entnahmebedingungen wie Tageszeit und Körperposition. Daher sollte die Blutentnahme möglichst unter standardisierten Bedingungen erfolgen [40].

Aufgrund verschiedener Untersuchungsbedingungen und unterschiedlicher verfügbarer Assays zur Messung von Aldosteron und Renin existiert allerdings kein einheitlicher Cut-off-Wert zur Interpretation des ARQ und Vorhersage für das Vorliegen eines PA [40].

#### 1.2.2.2 Bestätigungstest

Aufgrund der verschiedenen Einflussfaktoren auf den ARQ reicht ein pathologisch erhöhter Quotient alleine nicht zur Diagnosestellung eines PA aus. An einen auffälligen ARQ sollte sich daher die Durchführung eines Suppressionstests anschließen, der eine autonome Aldosteronproduktion bestätigt. Hierfür stehen beispielsweise der Kochsalzbelastungstest (oral oder intravenös), der Captopril-Test oder der Fludrocortison-Test zur Verfügung [43].

#### 1.2.2.3 Lokalisationsdiagnostik

An die Bestätigung des PA sollte sich eine Lokalisationsdiagnostik zur Differenzierung zwischen uni- oder bilateraler Erkrankung anschließen, da sich die Therapie dieser beiden Entitäten grundlegend unterscheidet. Empfiehlt man bei unilateraler Erkrankung eine operative Entfernung des Adenoms bzw. der betroffenen Nebenniere, so wird im Gegensatz dazu die bilaterale Erkrankung lebenslang medikamentös mit Mineralokortikoidrezeptor-Antagonisten behandelt [40].

Alle Patienten mit PA sollten zunächst eine Computertomographie (CT) der Nebennieren erhalten. Diese dient primär der Beurteilung der Nebennierenmorphologie und Anatomie des venösen Abflusses. Da allerdings mit zunehmendem Alter die Inzidenz endokrin inaktiver Nebennierenadenome steigt, ist bei Vorliegen eines Nebennierentumors im CT eine BAH somit nicht ausgeschlossen [44]. In der Literatur beträgt die Sensitivität der CT-Diagnostik zur Differenzierung zwischen APA und BAH alleine nur ca. 50-80 % [40,45-47]. Daher wird aktuell als Referenzstandard der Subtypdifferenzierung bei PA die Durchführung eines Nebennierenvenenkatheters (NNVK) bei Patienten empfohlen, bei denen eine Operation grundsätzlich möglich scheint und gewünscht ist. Bei dieser Untersuchung wird über einen Zugang in der Femoralvene selektiv Blut aus den Nebennieren und aus der Peripherie (z. B. V. cava) zur Bestimmung von Aldosteron und Cortisol entnommen. Die Darstellung der Gefäße erfolgt unter röntgenologischer Durchleuchtung nach Injektion von Kontrastmittel über die Katheterspitze [48,49]. Der NNVK ist allerdings mit verschiedenen Nachteilen behaftet. Beispielsweise existiert kein allgemein standardisiertes Vorgehen hinsichtlich der Durchführung der Untersuchung. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf die Verwendung der ACTH-Stimulation, die Lokalisation der Entnahmeorte, sowie die zeitliche Abfolge der Blutentnahme aus den Nebennierenvenen [40]. Auch finden zentrumsabhängig zur Interpretation der Ergebnisse unterschiedliche cut-off-Werte zur Beurteilung der Selektivität und Lateralisierung Anwendung [48]. Außerdem gestaltet sich die beidseits selektive Katheterisierung der Nebennierenvenen schwierig. Nach einer Auswertung innerhalb des Deutschen Conn-Registers liegt die Quote für bilateral erfolgreiche Katheter bei 30,5 % und ist deutlich abhängig von der Erfahrung des durchführenden Radiologen [50]. Durch Einführung einer intrainterventionellen Cortisol-Schnellmessung zur Überprüfung der korrekten Katheterlage kann diese allerdings auf bis zu 85 % angehoben werden [51]. Weitere Nachteile des NNVK liegen außerdem in seiner Invasivität, hohen Kosten und der Applikation von Röntgen-Kontrastmittel bei renal vorgeschädigten Patienten [35]. Ein zudem häufig angeführtes Argument gegen den NNVK liegt in der mit diesem Verfahren verbundenen Strahlenexposition. Obwohl Risiken durch hohe

Strahlenbelastung bekannt sind, wie beispielsweise die Induktion maligner Neoplasien, wurde diese für den NNVK bis dato nicht systematisch evaluiert. Seit Veröffentlichung der SPARTACUS-Studie steht auch die Relevanz des NNVK im Hinblick auf das Outcome der Patienten zur Diskussion. Hierbei handelt es sich um eine randomisierte, kontrollierte Studie, in der die Subtyppendifferenzierung bei 184 Patienten mit gesichertem PA entweder mittels alleiniger CT-Untersuchung (n=92) oder NNVK (n=92) erfolgte. Ein Jahr nach Therapie auf Basis der jeweiligen Ergebnisse (Adrenalektomie bei APA oder medikamentöse Therapie bei BAH) wurde das Outcome der Patienten primär anhand der täglich zur Blutdruckkontrolle nötigen antihypertensiven Therapie verglichen. Bei Follow-Up bestanden überraschenderweise weder signifikante Unterschiede hinsichtlich der antihypertensiven Therapie noch in Bezug auf die biochemische Remission des PA zwischen CT und NNVK [47]. Allerdings sind zur Beurteilung dieser Ergebnisse einige Punkte zu beachten: Beispielsweise verlangten die Einschlusskriterien der Studie das Vorliegen eines PA in Kombination mit therapieresistenter Hypertonie oder Hypokaliämie, wodurch besonders schwere Fälle mit hoher Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines APA ausgewählt wurden, weshalb die Studienkohorte nicht als repräsentativ zu erachten ist [52]. Auch wurde als primärer Endpunkt die antihypertensive Therapie bei Follow-Up gewählt und nicht die biochemische Remission des PA, welche den Erfolg der Adrenalektomie zuverlässiger beurteilen lässt. Zur Beurteilung des gewählten Endpunktes lag in der SPARTACUS-Studie allerdings eine zu niedrige statistische Power vor [53,54]. Zusätzlich erfolgte die Durchführung des NNVK unter ACTH-Stimulation, was eine Übertragung der Ergebnisse auf alle NNVK erschwert [55].

#### 1.2.2.4 Alternativen zum Nebennierenvenenkatheter

Vor diesem Hintergrund wird die Notwendigkeit eines alternativen Vorgehens zur Differentialdiagnostik bei PA deutlich. Ein Vorschlag hierfür besteht in der Anwendung klinischer Vorhersage-Scores für das Vorliegen einer unilateralen Erkrankung. Dies hat zum Ziel, die Untergruppe an Patienten zu ermitteln, welche ohne Durchführung eines NNVK korrekterweise eine Adrenalektomie erhalten könnten. Allerdings reichen diese Scores alleine bisher nicht aus, um den NNVK zuverlässig zu umgehen [56-60]. Die Bestimmung eines

Steroidprofils mittels Massenspektrometrie stellt einen weiteren interessanten Ansatz zur Identifizierung von Patienten mit APA dar. Hierbei handelt es sich insbesondere um die Messung von 18-Hydroxycorticosteron, das durch CYP11B2 aus Desoxycorticosteron synthetisiert wird (vgl. **Abbildung 2**, S. 4) und bei Patienten mit APA höhere Konzentrationen im Serum aufweist als bei Patienten mit BAH. Außerdem sind zwei weitere über CYP11B2 synthetisierte Steroide (18-Oxocortisol und 18-Hydroxycortisol, beide aus 11-Desoxycortisol) ebenfalls bei APA höher nachweisbar als bei BAH [61-63].

Verschiedene SPECT- (Single Photon Emission Computed Tomography) oder PET- (Positronen-Emissions-Tomographie) basierte funktionelle Bildgebungsmethoden wurden ebenfalls als Alternativen zum NNVK diskutiert.

Bereits in den 1970er Jahren erfolgte die Evaluation von NP-59 (131I-6 $\beta$ -Iodomethyl-19-Norcholesterol) als möglicher Tracer. Während die Verbindung zwischen anatomischen Verhältnissen und funktioneller Aktivität hierdurch zwar möglich ist, ist die Sensitivität der Untersuchung bei kleinen Tumoren (< 1,5 cm) limitiert. Auch ist die Verbreitung der Substanz eingeschränkt, weswegen NP-59 in der Differentialdiagnostik des PA mittlerweile nur noch eine untergeordnete Rolle spielt [40,64-67].

Im Jahr 2012 konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine PET-Bildgebung mittels 11C-Metomidat, eine Substanz, die an CYP11B1 und CYP11B2 bindet, grundsätzlich für die Identifikation Aldosteron-produzierenden Gewebes geeignet ist. Aufgrund der fehlenden Selektivität für CYP11B2 ist allerdings eine Vorbehandlung mit Dexamethason zur Verminderung der Traceraufnahme in normalem Nebennierengewebe nötig. Der Hauptnachteil von 11C-Metomidat liegt in der Notwendigkeit eines Zyklotrons zur Synthese des Tracers, wodurch sich der Einsatz dieser Substanz deutlich einschränkt. Zudem weisen endokrin inaktive Nebennierenadenome oft eine Expression von CYP11B1 auf, die auch durch Vorbehandlung mit Dexamethason möglicherweise nicht suffizient reduziert wird, sodass Fehlinterpretationen möglich sind [68-70].

Erst kürzlich erfolgte die Evaluation des CYP11B2-spezifischen PET-Tracers 18F-CDP2230 in vitro und in Ratten. Hierbei zeigte sich eine insgesamt niedrige Affinität zu CYP11B1 und CYP11B2 im Vergleich zu 11C-Metomidat; allerdings war die Selektivität für CYP11B2 deutlich höher. Biodistributions-Experimente in Ratten wiesen eine Akkumulation von 18F-CDP2230 in den Nebennieren mit

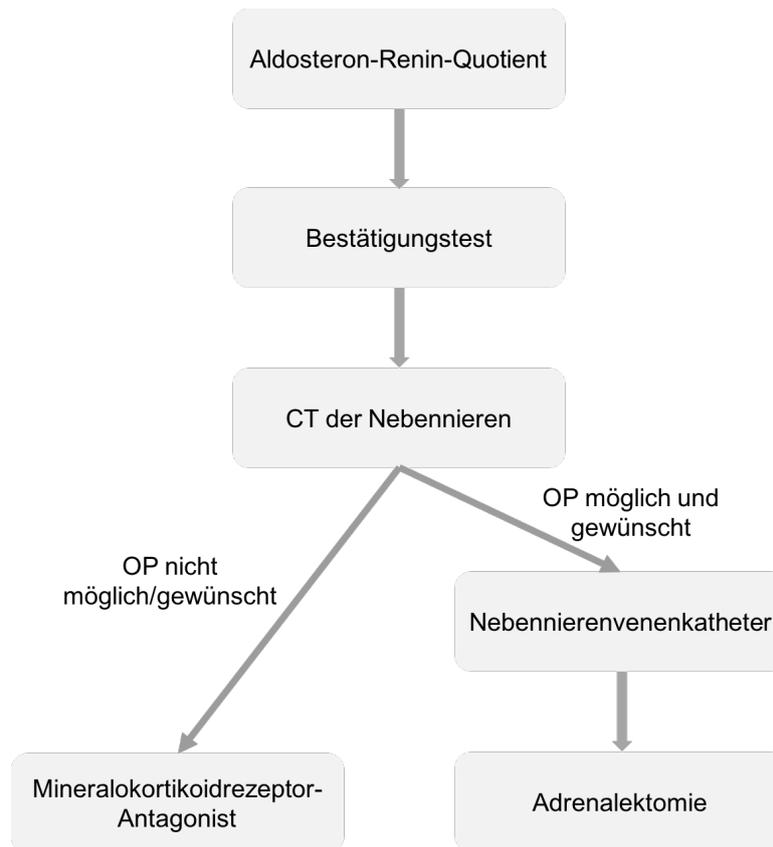
nur niedriger Hintergrundaktivität auf. Eine weiterführende Studie des Inhibitors an Patienten mit PA bleibt allerdings abzuwarten [71].

### 1.2.3 Therapie

Die Therapie des PA hängt ab von der Lokalisation des Aldosteron-Exzesses. Bei Vorliegen eines unilateralen APA stellt die laparoskopische Adrenalektomie die Therapie der Wahl dar [40]. Nach dem Eingriff stellen sich bei nahezu allen Patienten mit APA und präoperativer Hypokaliämie normale Serum-Kalium-Werte ein. Auch kann eine deutliche Besserung der Hypertonie, bis hin zur kompletten Remission (ca. 50 % der Patienten, Blutdruck < 140/90 mmHg) beobachtet werden [40]. Insbesondere Frauen, sowie Patienten in jüngerem Alter, weisen eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine komplette klinische Remission des PA nach Adrenalektomie auf [54].

Patienten mit gesicherter bilateraler Erkrankung, sowie Patienten mit APA, bei denen keine Operabilität gegeben ist oder eine Operation abgelehnt wird, sollten medikamentös mit einem Mineralokortikoid-Antagonisten therapiert werden [40]. Unter Spironolacton kann sowohl eine effektive Reduktion des Blutdrucks als auch begleitender Antihypertensiva verzeichnet werden. Allerdings ist die Einnahme von Spironolacton mit dosisabhängigen Nebenwirkungen, wie Gynäkomastie, Verlust der Libido und Zyklusstörungen verbunden, welche durch die zusätzliche antiandrogene und Progesteron-agonistische Wirkung des Präparates bedingt sind [40]. Derartige Effekte werden unter Therapie mit dem selektiven Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten Eplerenon nicht beobachtet. Allerdings beträgt die Potenz von Eplerenon im Vergleich zu Spironolacton nur ca. 50 %. Außerdem ist Eplerenon bisher in Deutschland für die Therapie des PA nicht zugelassen [72].

Eine aktuelle Analyse des kardiovaskulären Outcomes bei Patienten mit PA unter medikamentöser Therapie zeigte interessanterweise ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit PA, bei welchen die Renin-Aktivität unter Therapie weiterhin supprimiert blieb (< 1 µg/l/h) im Vergleich zu denjenigen mit nicht supprimiertem Renin (≥ 1 µg/l/h), weshalb eine Messung des Renins und daran orientierte Titration der Spironolacton-Dosis empfehlenswert scheint [73].



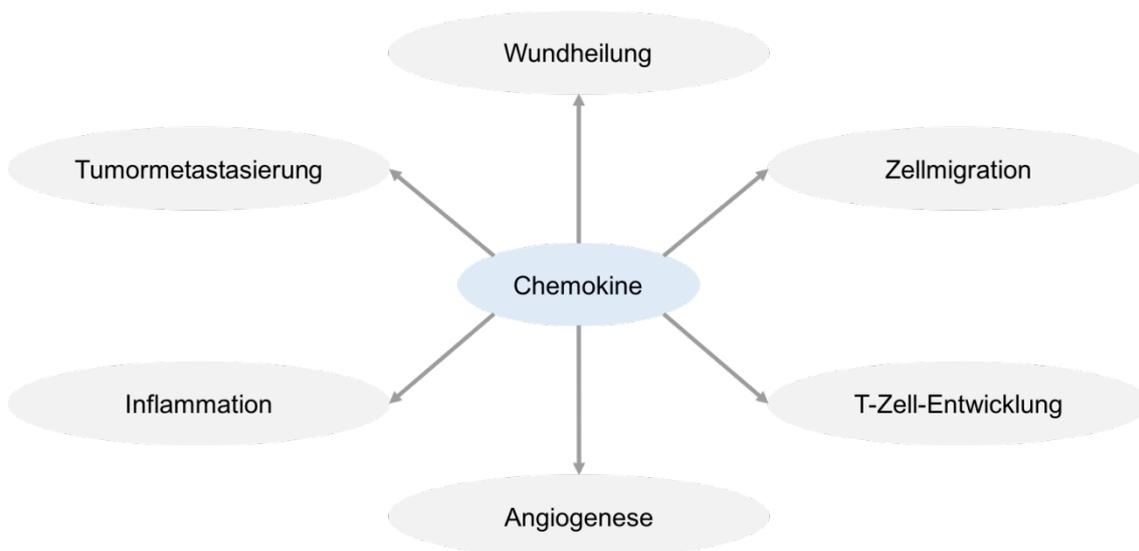
**Abbildung 5:** Grundzüge des diagnostischen und therapeutischen Algorithmus bei primärem Hyperaldosteronismus. Modifiziert nach [40].

## 1.3 Chemokine und Chemokinrezeptoren

### 1.3.1 Grundlagen und Physiologie

Chemokine sind zwischen 8 und 10 kDa große, sekretorische Peptide, welche chemotaktische Wirkungen entfalten. Bis dato sind über 50 verschiedene Chemokine und mehr als 20 korrespondierende Chemokinrezeptoren bekannt. Die Klassifikation der Chemokine unterscheidet anhand der Anzahl N-terminal konservierter Cysteinreste und dazwischen liegender Aminosäuren vier Gruppen: CXC-, CC-, (X)C- und CX3C. Abhängig davon, ob ein Chemokin oder ein Rezeptor vorliegt, wird diese Bezeichnung um ein R (Rezeptor) oder L (Ligand) ergänzt [74-76]. Auch funktionell lässt sich eine Einteilung in „inflammatorische“ und „homöostatische“ Chemokine treffen. Während inflammatorische Chemokine insbesondere bei Entzündungsprozessen, Infektionen und Gewebeschäden sezerniert werden, dienen homöostatische Chemokine der Regulation physiologischer Vorgänge, wie beispielsweise der Ausbildung des Immunsystems [77].

Funktionell sind Chemokine an verschiedenen Prozessen beteiligt, die eine gerichtete Migration von Zellen anhand eines Gradienten erfordern. Hierzu zählen beispielsweise Lymphozyten-Trafficking und der Transport hämatopoietischer Stammzellen und corticaler Interneurone [78-83]. Auch haben Chemokine Einfluss auf Angiogenesevorgänge und die Metastasierung verschiedener maligner Tumore [84-89]. Eine Übersicht der vielfältigen Chemokin-Effekte ist in **Abbildung 6** aufgeführt.



**Abbildung 6:** Übersicht über Funktionen von Chemokinen. Modifiziert nach [75].

Chemokine entfalten ihre Wirkungen über Chemokinrezeptoren. Diese sind meist G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Wenige Chemokinrezeptoren fungieren stattdessen als Scavenger-Rezeptoren oder folgen dem  $\beta$ -Arrestin-Signalweg [90]. Die klassischen G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren binden bis auf wenige Ausnahmen mehrere Chemokine; umgekehrt ist ein Chemokin meist in der Lage, mehrere Rezeptoren zu aktivieren. Nach Aktivierung des Rezeptors dissoziiert der G<sub>i</sub>-Komplex in seine Untereinheiten (G <sub>$\alpha$</sub>  und G <sub>$\beta\gamma$</sub> ). Über die Aktivierung des MAP (mitogen-activated protein)-Kinase-Pathway, des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Pathway, der Proteinkinase C, sowie der Phospholipase C, welche ihrerseits die Bildung von Diacylglycerol und Inositoltriphosphat induziert, werden die jeweiligen Effekte wie Zellproliferation und –migration vermittelt [89,91]. Welche Chemokine bzw. Chemokinrezeptoren allerdings in der Nebenniere vorhanden sind, ist bisher nicht bekannt.

### 1.3.2 Die CXCR4/CXCL12/CXCR7-Achse

Der Chemokinrezeptor CXCR4 zählt zu den am meisten untersuchten Chemokinrezeptoren. Er gehört ebenfalls zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und wird in vielen verschiedenen Zellen und Geweben, wie zum Beispiel in Gehirn, Colon, Niere, Herz, Lunge, sowie auf hämatopoietischen Zellen (Stammzellen, T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten, Neutrophile, Eosinophile) exprimiert [92]. Eine Besonderheit von CXCR4 liegt in der Eigenschaft, selektiv nur einen Liganden – CXCL12 (Stromal-derived factor 1 $\alpha$ , SDF1 $\alpha$ ) – zu binden. CXCR4 und CXCL12 sind maßgeblich an der regelrechten embryologischen Entwicklung beteiligt. Ein Knock-Out von CXCR4 oder CXCL12 in Mäusen führt zu einer fehlregulierten Kolonisation des Knochenmarks mit hämatopoietischen Stammzellen und Defekten in der Entwicklung von Herz, Gehirn und großen Gefäßen. Diese Organschäden sind bereits *in utero* tödlich [93-97]. CXCR4 spielt ebenfalls eine Rolle in pathologischen Prozessen, insbesondere bei der Entstehung maligner Tumore. Bis dato sind mindestens 23 Tumorentitäten bekannt, deren Zellen CXCR4 exprimieren. Hierzu zählen unter anderem hämatologische Neoplasien (B-CLL, CML, AML, B-ALL, Non-Hodgkin Lymphom, follikuläres Lymphom) [98-103], multiple Myelome [104], Neuroblastome [105] und Karzinome von Mamma [88,106], Pankreas [107], Prostata [108], Colon [109], aber auch der Nebenniere [110-112]. [113] Hinsichtlich seiner Funktion in malignen Tumoren wird am häufigsten eine direkt durch Aktivierung von CXCR4 induzierte Migration von Zellen anhand eines CXCL12-Gradienten beschrieben, was insbesondere im Hinblick auf das Metastasierungsverhalten dieser Tumore von Relevanz ist [105,107,113-117]. Auch können CXCL12/CXCR4 in manchen Karzinomen die Proliferation von Tumorzellen stimulieren [113,118-120].

Im Jahr 2005 wurde zum ersten Mal ein zweiter Chemokinrezeptor beschrieben, der ebenfalls in der Lage ist CXCL12, aber auch CXCL11 zu binden (CXCR7) [121,122]. CXCR7 zählt zu den atypischen Chemokinrezeptoren, da zum einen die Signaltransduktion nicht über G-Proteine vermittelt wird und zum anderen dessen Aktivierung nicht direkt in Chemotaxis und Zellmigration resultiert [123,124]. Im Vergleich zu CXCR4 besitzt CXCR7 eine ca. 10fach höhere Affinität zu CXCL12. Außerdem konnte

gezeigt werden, dass CXCR7 größere Mengen an CXCL12 abbauen und internalisieren kann, weshalb ihm eine Funktion als Scavenger-Rezeptor in der Regulation des Chemokin-Angebotes zugeschrieben wird [125-128].

### 1.3.3 CXCR4-spezifische PET-Bildgebung

Aufgrund der hohen CXCR4-Expression in malignen Tumoren und dessen möglicher Rolle als therapeutisches Target, wurden verschiedene Substanzen als Tracer für eine CXCR4-spezifische funktionelle Bildgebung evaluiert [129]. Diese Art der Bildgebung bietet zum einen die Möglichkeit der Detektion CXCR4-positiver Läsionen *in vivo* und zum anderen, in einem nächsten Schritt, einer CXCR4-gerichteten Radiotherapie bei malignen Erkrankungen. Insbesondere der von Wester et al. entwickelte PET-Tracer <sup>68</sup>Ga-Pentixafor ist zwischenzeitlich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* etabliert [130-134]. Beispielsweise wurde bereits das Speicherverhalten der Substanz bei Patienten mit lymphoproliferativen Erkrankungen, multiplen Myelomen, Pleuramesotheliomen, Nebennierenkarzinomen, aber auch bei Patienten nach Myokardinfarkt oder mit Atherosklerose genauer untersucht [110,135-140].

## 1.4 Risiken erhöhter Strahlenexposition

Es ist bekannt, dass eine erhöhte Strahlenexposition mit verschiedenen Risiken einhergeht. Hierbei kann grundsätzlich zwischen deterministischen und stochastischen Effekten unterschieden werden. Unter deterministischen Folgen erhöhter Strahlenbelastung sind beispielsweise Hautreaktionen und die Entstehung von Katarakten zu verstehen, die sich oberhalb eines geschätzten Dosis-Schwellenwertes von 500 mSv manifestieren [141]. Stochastische Risiken bestehen klassischerweise in der Entstehung von DNA-Schäden und Induktion maligner Neoplasien, welche im Gegensatz zu den deterministischen Effekten nicht einer bestimmten Schwellendosis zugeordnet werden können, sondern interindividuell mit verschiedener Wahrscheinlichkeit auftreten [142,143]. Beispielsweise zeigte sich in einer Subgruppe von Atombomben-Überlebenden, die niedrigeren Strahlendosen zwischen 5 und 150 mSv ausgesetzt waren, bereits eine signifikante Zunahme des Krebsrisikos [144,145].

In den letzten Jahrzehnten ist eine stetige Zunahme an medizinischen Bildgebungen zu verzeichnen. Während 1998 in den USA noch 26 Millionen

CT-Untersuchungen durchgeführt wurden, stieg diese Zahl auf mehr als 70 Millionen im Jahr 2008 an [146]. Insbesondere durch die lange Latenz zwischen Strahlenexposition und dem Auftreten maligner Tumore stellt es sich allerdings sehr schwierig dar, diese als Ursache einer malignen Erkrankung im weiteren Verlauf zu identifizieren. Zur Vermeidung zu hoher Strahlenbelastungen bei Patienten im Rahmen medizinischer Untersuchungen, existieren in Deutschland Referenzwerte für einzelne Prozeduren, herausgegeben vom Bundesamt für Strahlenschutz. Das Dosisflächenprodukt einer routinemäßigen Koronarangiographie sollte beispielsweise nicht mehr als 2800 cGy cm<sup>2</sup> (=28 Gy cm<sup>2</sup>) betragen, wohingegen im Rahmen eines interventionellen Verfahrens, wie der transarteriellen Chemoembolisation (TACE) ein maximales DFP von 30000 cGy cm<sup>2</sup> (=300 Gy cm<sup>2</sup>) nicht überschritten werden sollte (**Tabelle 2**).

<b>Untersuchung</b>	<b>Dosisflächenprodukt</b> cGy cm <sup>2</sup>
Röntgen Thorax p.a.	15
Abdomen a.p.	230
Koronarangiographie	2800
Koronarangiographie + PCI	5500
TACE	30000

**Tabelle 2:** Referenzwerte des Bundesamtes für Strahlenschutz für ausgewählte radiologische Untersuchungen in cGy cm<sup>2</sup>. Modifiziert nach [147]. PCI=Perkutane coronare Intervention, TACE=Transarterielle Chemoembolisation.

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Während verschiedene Nachteile des aktuellen Standards zur Subtypendifferenzierung bei PA, dem NNVK, im Laufe der Jahre untersucht wurden, existieren bisher keine Daten zur Strahlenbelastung, der Patienten mit PA im Rahmen dieser Untersuchung ausgesetzt werden. Im ersten Teil dieser Arbeit soll diese Strahlenbelastung an verschiedenen Zentren erfasst und ausgewertet werden. Hierbei geht es insbesondere um folgende Aspekte:

1. Wie hoch ist die Strahlenbelastung und Durchleuchtungszeit an den beteiligten Zentren generell?
2. Bestehen interinstitutionelle Unterschiede hinsichtlich der Strahlenbelastung?
3. Unterscheiden sich die einzelnen Zentren im Hinblick auf die jeweiligen Untersuchungsmodalitäten?

Aus den oben erörterten Nachteilen des NNVK zur Lokalisationsdiagnostik bei PA wird ersichtlich, dass eine Alternative zu dieser Untersuchung von hohem klinischen Nutzen wäre. Außerdem wurde das Vorkommen von Chemokinrezeptoren in der Nebenniere und benignen Nebennierentumoren bis dato nicht evaluiert.

Ziel dieser Arbeit ist es, diese beiden Punkte und deren Zusammenhang genauer zu beleuchten, weswegen im zweiten Abschnitt der Arbeit folgende Fragestellungen behandelt werden sollen:

1. Sind Chemokinrezeptoren in Nebennierengewebe, insbesondere in Nebennierenadenomen, nachweisbar und wenn ja, welche?
2. Wie gestaltet sich die Expression nachgewiesener Chemokinrezeptoren, explizit CXCR4, in Zusammenschau mit CYP11B1 und CYP11B2 in der normalen Nebenniere sowie in adrenocorticalen Adenomen?
3. Stellt eine CXCR4-gerichtete PET-Bildgebung eine potentielle Alternative zum NNVK in der Differentialdiagnostik des PA dar?

## **3. Patienten, Material und Methoden**

### **3.1 Patienten**

#### *3.1.1 Nebennierenvenenkatheter*

Zur Erfassung der Strahlenbelastung bei NNVK erfolgte eine multizentrische retrospektive Analyse. Das Einverständnis mit der Durchführung der Untersuchung aller Patienten wurde im Rahmen der klinischen Routine im Einvernehmen mit den jeweiligen örtlichen Bestimmungen eingeholt. Auf die Unterzeichnung einer zusätzlichen Einverständniserklärung wurde in Abstimmung mit der Ethikkommission der Universität Würzburg verzichtet (AZ121/17). 658 NNVK zwischen 1999 und 2017 aus Berlin (n=53), Leipzig (n=52), München (n=400) und Würzburg (n=151) mit dokumentierten Informationen zu Dosisflächenprodukt (DFP), Durchleuchtungszeit (DLZ) und, falls verfügbar, durchführendem Radiologen, Erfolg der Katheterisierung der Nebennierenvenen, basierend auf der Höhe der Cortisolwerte, sowie Schwierigkeit der Kanülierung (Dokumentation im radiologischen Befund), wurden in die Analyse eingeschlossen. Außerdem wurde die Durchführung von Cortisol-Schnellmessungen erfasst. Spezielle Ausschlusskriterien kamen nicht zur Anwendung.

#### *3.1.2 Patientenmaterial*

Die Sammlung von Paraffingewebe und korrespondierender klinischer Daten erfolgte an fünf verschiedenen Universitätskliniken: Berlin, Essen, München, Turin und Würzburg. Diese wurde durch die Ethikkommission der einzelnen Zentren genehmigt (Würzburg 88/11, Essen 01-187-1787-Z, Charité Berlin EA1/169/08, München 379/10, Turin CEI/349). Dementsprechend wurde nach ärztlicher Aufklärung eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt.

##### **3.1.2.1 Aldosteron-produzierende Adenome**

Die Diagnostik von Patienten mit unilateralem APA erfolgte anhand der Endocrine Society Clinical Practice Guideline aus dem Jahr 2008 [148]. Als Screening-Test für das Vorliegen eines PA erfolgte die Bestimmung des ARQ nach Absetzen möglicher interferierender Medikation. Anschließend erfolgte zur Bestätigung der Diagnose ein Kochsalzbelastungstest. 103 von 117 Patienten

erhielten darauffolgend einen NNVK zur Lokalisationsdiagnostik. Bei den übrigen 14 Patienten fiel die Entscheidung zur Adrenalectomie basierend auf konventioneller Nebennierenbildgebung (CT oder MRT) in Kombination mit jungem Alter (< 45 Jahre) und/oder positivem Orthostase-Test. Im Anschluss an die Operation erfolgte die histologische Begutachtung durch einen lokalen Pathologen. Die Einseitigkeit der Erkrankung wurde durch die Normalisierung des ARQ und des Kaliums, sowie Heilung oder Besserung des Hypertonus bei Follow-Up bestätigt (verfügbar für 113 von 117 Patienten).

#### 3.1.2.2 Cortisol-produzierende Adenome

Alle Patienten mit CPA wiesen einen abnormalen Dexamethason-Suppressionstest auf (Serum-Cortisol nach Gabe von 1 mg Dexamethason > 1,8 µg/dl). Serum-Cortisol nach Dexamethason lag im Mittel bei 15,9 µg/dl (2,2 – 30,6). Zusätzlich war das Vorliegen eines weiteren pathologischen Tests zum Einschluss erforderlich: Cortisol im 24-Stunden-Sammelurin über der Norm, oder auffälliges Cortisol um 24 Uhr im Serum oder auffälliges Cortisol um 24 Uhr im Speichel.

#### 3.1.2.3 Endokrin-inaktive Adenome

Patienten mit EIA wiesen weder klinisch noch laborchemisch (normwertiger ARQ, normwertiges Cortisol) einen Anhalt für einen Hormonexzess auf. Das Vorliegen eines adrenocorticalen Adenoms (ACA) wurde durch die jeweiligen ortsansässigen Pathologen bestätigt.

## 3.2 Material

### 3.2.1 Geräte

---

Gerät	Firma
Magnetic Stirrer MMS-3000	Grant Instruments, Royston, UK
RET Basic	IKA, Staufen, Deutschland
Kryostat CM 1850	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
InLab <sup>®</sup> Easy pH Meter	Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA
Imageplate Reader CR35	Dürr Medical, Bietigheim-Bissingen, Deutschland
Schnellkochtopf Sicomatic <sup>®</sup> -T	Silit, Riedlingen, Deutschland
THL 1097 Einzelkochtafel 1000 Watt	Rommelsbacher, Dinkelsbühl, Deutschland
UNOLD Electro 8125 Wasserkocher 1,0 L	Unold, Hockenheim, Deutschland
Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Analysenwaage ABJ 120-4M	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Pipetten Research Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transferpette <sup>®</sup>	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim, Deutschland
Axioskop 2 plus	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Laborofen	Heraeus, Hanau, Deutschland
Eurostar 20 digital	IKA, Staufen, Deutschland
Heraeus <sup>™</sup> Biofuge Fresco	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge MIKRO 200R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
NanoDrop <sup>™</sup> 2000/2000c	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Mikrotom HN-40	Reichert-Jung, Leica Microsystems,

	Wetzlar, Deutschland
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, Kalifornien, USA
Glashomogenisator	B. Braun Biotech, Berlin, Deutschland

**Tabelle 3:** Geräte.

### 3.2.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Firma
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Save Seal Micro Tubes	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PCR Soft Tubes	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
QIAshredder Mini Spin Column	Qiagen, Alameda, Kalifornien, USA
RNeasy Mini Spin Column	Qiagen, Alameda, Kalifornien, USA
ImmEdge Hydrophobic Barrier PAP Pen	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA

**Tabelle 4:** Verbrauchsmaterialien.

### 3.2.3 Puffer, Lösungen und Reagenzien

Bezeichnung	Firma
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Xylol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
TRIS-Puffer (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
PFA (Paraformaldehyd)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland

Tween	BioChemica, Darmstadt, Deutschland
Citronensäuremonohydratpuffer	10 mM Citronensäuremonohydrat, pH 6,5 NaOH beides Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
H2O2	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 5:** Puffer, Lösungen und Reagenzien.

### 3.2.4 Kits

Bezeichnung	Firma
RNeasy mini Kit	Qiagen, Alameda, Kalifornien, USA
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Alameda, Kalifornien, USA
EnVision+ System HRP	Dako, Santa Clara, USA
DAB Substrate Kit	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA

**Tabelle 6:** Kits.

## 3.3 Methoden

### 3.3.1 Parameter der Strahlenbelastung bei NNVK

Zur Beurteilung der Strahlenbelastung bei NNVK erfolgte die Auswertung von DFP, DLZ und ED. Das DFP ist definiert als das Produkt der Strahlendosis zu Luft, multipliziert mit der Fläche des Röntgenfeldes. Dies wird gemessen durch eine am Röntgenkollimator angebrachte Ionisationskammer. Basierend auf dem DFP wird zur Ermittlung des stochastischen Risikos durch ionisierende Strahlung die ED wie folgt berechnet:

$$ED \text{ (mSv)} = \text{DFP (Gy cm}^2 \times 0.2 \text{ mSv/Gy cm}^2) \text{ [149].}$$

Die an den verschiedenen beteiligten Zentren verwendeten Röntgenanlagen sind in **Tabelle 7** aufgelistet.

Zentrum	Anlage	Firma
<b>Berlin</b>	ALLURA Xper FD System	Philips Healthcare, Hamburg, Deutschland
<b>Leipzig</b>	Innova 4100	GE Healthcare, Milwaukee, USA
	Axiom Artis BA	Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland
<b>München</b>	Multistar TOP	Alle Siemens Healthcare
	Artis Zee MP	
	Axiom Artis XA C	
	Polystar XA	
<b>Würzburg</b>	Artis Zee MP	Siemens Healthcare

**Tabelle 7:** Röntgenanlagen der teilnehmenden Zentren.

### 3.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das Grundprinzip der PCR liegt in der Amplifikation von Genfragmenten *in vitro*. Dies geschieht in verschiedenen Schritten: Zunächst erfolgt die Trennung der DNA-Doppelstränge (Denaturierung, ca. 95 °C). Anschließend lagern sich spezifische Primer an die DNA an (Annealing, ca. 55-65 °C). In einem letzten Schritt, der Elongation, wird nun der komplementäre Strang durch die DNA-Polymerase vervollständigt. Bei der sogenannten Real-Time-PCR kann außerdem durch Hinzugabe eines Fluoreszenzfarbstoffs das entstandene Produkt in Echtzeit quantifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden spezifische TaqMan-Sonden verwendet, die an entgegengesetzten Enden mit einem Quencher und einem Reporter markiert sind. Durch die 5'-3'-Exonuclease-Aktivität der TaqMan-Polymerase erfolgt die Trennung von Reporter und Quencher, wodurch ein charakteristisches Emissionsspektrum des Reporters sichtbar wird, da dessen Fluoreszenz aufgrund der räumlichen Entfernung nicht mehr durch den Quencher (als Akzeptor-Fluorochrom) ausgelöscht werden kann. Die Quantifizierung beruht auf  $C_T$  (threshold cycle) – Werten, die den Zyklus beschreiben, in dem die gemessene Fluoreszenz zum ersten Mal die Hintergrundfluoreszenz übersteigt [150,151].

### 3.3.2.1 RNA-Extraktion

Zunächst wurde aus bei -80 °C tiefgefrorenem Gewebe von normalen Nebennieren (nNN, n=4) und adrenocorticalen Adenomen (ACA), bestehend aus APA (n=12), Cortisol-produzierenden Adenomen (CPA, n=11) und endokrin-inaktiven Adenomen (EIA, n=3) unter Verwendung des RNeasy mini Kits (Qiagen, Alameda, Kalifornien, USA) RNA isoliert. Das Gewebe wurde hierfür in 600 µl Puffer RLT mit β-Mercaptoethanol (Konzentration 10 µl/ml) für 30 sec homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat bei 10000 rpm für 3 min zentrifugiert, mit 600 µl 70 % Ethanol gemischt und in ein RNeasy Röhrchen überführt. Dieses Röhrchen ermöglicht bei bestimmten Salzkonzentrationen eine Bindung von RNA mit Mindestgröße von 200 Basen. Hierauf folgten drei Waschschrte (RW1-Puffer, 2 x RPE-Puffer). Abschließend wurde die so gewonnene RNA in RNase-freiem Wasser gelöst. Die Messung des RNA-Gehaltes im Eluat erfolgte mittels Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

### 3.3.2.2 Herstellung von cDNA aus RNA

Die Umschreibung der gewonnenen RNA in cDNA erfolgte mittels QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Alameda, Kalifornien, USA). In einem 0,2 ml Eppendorf-Gefäß wurde zunächst die Template-RNA (1000 ng) mit gDNA Wipeout Buffer (4 µl) und RNase-freiem Wasser (bis zu einem Gesamtvolumen von 28 µl) für 5 min bei 42 °C zur Elimination genomischer DNA inkubiert. Im nächsten Schritt wurde ein Mastermix aus Quantiscript Reverse Transcriptase (2 µl), Quantiscript RT Buffer (8 µl) und RT Primer Mix (2 µl) erstellt und zusammen mit der Template-RNA für 15 min bei 42 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reversen Transcriptase wurde nach Ablauf der 15 min die Temperatur für weitere 3 min auf 95 °C erhöht.

### 3.3.2.3 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Für die qRT-PCR wurden 40 ng cDNA pro Reaktion verwendet. Diese wurde in einer 96-Well Platte jeweils im Duplikat durchgeführt. Der TaqMan Gene Expression Master Mix enthält alle für die qRT-PCR nötigen Substanzen wie beispielsweise Polymerasen und Nukleotide und wurde von der Firma Applied

Biosystems (Darmstadt, Deutschland) kommerziell erworben. Der Ansatz einer PCR-Reaktion pro Well ist in **Tabelle 8**, die spezifischen TaqMan Genexpressions-Assays in **Tabelle 9** dargestellt. Anschließend wurde die qRT-PCR nach dem in **Tabelle 10** aufgeführten Programm gestartet. Nach automatischer Auswertung der Daten mittels Bio-Rad CFX Manager Software 2.0, erfolgte die Normalisierung der erhaltenen CT-Werte gegenüber  $\beta$ -Actin [152].

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
Master Mix	12,5 $\mu$ l
H2O	9,25 $\mu$ l
Sonden-Primer-Mix	1,25 $\mu$ l
cDNA	2 $\mu$ l
Gesamtvolumen	25 $\mu$ l

**Tabelle 8:** Ansatz qRT-PCR pro Well.

<b>Gen</b>	<b>Assay Nummer</b>
CCR1	Hs00928897_s1
CCR2	Hs00704702_s1
CCR3	Hs01847760_s1
CCR4	Hs00747615_s1
CCR5	Hs99999149_s1
CCR6	Hs10890706_s1
CCR7	Hs01013469_m1
CCR8	Hs00174764_m1
CCR9	Hs01890924_s1
CCR10	Hs00706455_s1
CCR11	Hs00664347_s1
CXCR1	Hs01921207_s1
CXCR2	Hs01891184_s1
CXCR3	Hs01847760_s1
CXCR4	Hs00607978_s1

CXCR5	Hs00540548_s1
CXCR6	Hs01890898_s1
CXCR7	Hs00664172_s1
β-Actin	Hs9999903_m1

**Table 9:** Spezifische Taqman Genexpression-Assays von Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland.

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	95°C	3 min
50	95°C	30 sec
50	60°C	30 sec
50	72°C	30 sec
Abkühlen	15°C	

**Table 10:** Programmierung des Thermocyclers.

### 3.3.3 Immunhistochemie

#### 3.3.3.1 Durchführung

Zur Analyse der Expression von CXCR4, CYP11B1 und CYP11B2 wurden immunhistochemische Färbungen an formalinfixiertem Paraffingewebe von 2 nNN und 220 ACA (117 APA, 54 CPA, 49 EIA) durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die Beurteilung der dem Tumorgewebe anhängenden Nebennierenrinde, sowie eine Analyse von CXCL12 bei jeweils 5 APA, CPA und EIA. Paraffinschnitte wurden zunächst in Xylol deparaffiniert (2 x 12 min) und anschließend in einer Ethanolreihe rehydriert (10 %, 90 %, 80 %, 70 % für jeweils 5 min). Zur Entfernung überschüssigen Ethanols wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach Antigendemaskierung in 10 mM Citronensäuremonohydrat-Puffer (pH 6,5) für 13 min bei 120 °C im Schnellkochtopf, erneuter Spülung mit destilliertem Wasser, Umrandung der Schnitte mittels Fettstift und Hemmung der endogenen Peroxidase (3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für 10 min, anschließend Spülung mit destilliertem Wasser) wurden unspezifische Protein-Antikörper-Bindungsstellen durch Inkubation mit 20 % humanem AB-Serum (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) in PBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit

den jeweiligen Antikörpern (**Tabelle 11**) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Als Negativkontrolle diente N-Universal Negative Control Anti-Rabbit/Rat/Mouse (jeweils Dako, Santa Clara, USA). Anschließend wurden die Schnitte 5 Mal mit PBS gespült. Signalamplifikation wurde mittels EnVision+ System HRP (Dako) für 40 min (2 x 20 min, dazwischen je 3 x 5 min Waschen mit PBS) für CXCR4, CXCR7 und CXCL12 bzw. Anti-Rat-IgG (CYP11B1, bereitgestellt von Celso Gomez-Ranchez) oder Anti-Mouse IgG (CYP11B2, bereitgestellt von Celso Gomez-Ranchez) für 1 Stunde erreicht und anschließend mit dem Diaminobenzidin Substrate Kit (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA) für 10 min nach Herstellerangaben entwickelt. Nach Spülung mit Leitungswasser wurden die Zellkerne mit Hämatoxylin für 2 min gegengefärbt. Abschließend wurden die Schnitte für 5 min unter laufendem Leitungswasser gebläut, kurz mit Ethanol (100 %) gespült und für ca. 20 min bei 56 °C getrocknet.

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Firma</b>
Anti-CXCR4	1:100	Abcam (12824), Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-RDC1 (CXCR7)	1:1000	Abcam (72100), Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-CXCL12	1:750	Abcam (9797), Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-CYP11B1	1:100	Die Antikörper gegen CYP11B1 und CYP11B2 wurden freundlicherweise von Celso Gomez-Sanchez, Universität Mississippi (USA) zur Verfügung gestellt.
Anti-CYP11B2	1:200	

**Tabelle 11:** Auflistung der zur Immunhistochemie verwendeten Antikörper und Verdünnungen.

### 3.3.3.2 Auswertung

Die semiquantitative Beurteilung der Expression mittels h-score erfolgte durch C. T. Fuß und Dr. B. Heinze. Zur Ermittlung des Scores wurde zunächst die

Färbeintensität mit 0, 1, 2, oder 3 entsprechend keiner, einer schwachen, moderaten oder starken Färbung, erhoben. Anschließend wurde die Anzahl positiver Zellen eines jeden Schnittes evaluiert und mit 0 bei 0 %, 0,1 bei 1-9 %, 0,5 bei 10-49 % oder 1 bei > 50 % positiver Zellen gewertet. Die Berechnung des endgültigen h-scores erfolgte anschließend durch Multiplikation der Färbeintensität mit dem der Anzahl positiver Zellen zugeordneten Wert [153]. Die Berechnung des h-scores wurde separat für Membran und Zytoplasma, sowie die anhängende Nebenniere durchgeführt. Ein h-score  $\leq 1$  wurde als niedrig, ein h-score  $> 1$  als hoch gewertet.

### 3.3.4 *Bildgebung mit <sup>68</sup>Ga-Pentixafor*

#### 3.3.4.1 *Synthese*

Die Synthese von <sup>68</sup>Ga-Pentixafor erfolgte in der Nuklearmedizin des Klinikums der Universität Würzburg anhand einer bereits vorbeschriebenen standardisierten Labeling-Sequenz in einer vollautomatischen Prozedur gemäß der Richtlinien der Guten Herstellungspraxis unter Verwendung eines GRP-Modules (Scintomics GmbH, Fürstenfeldbruck, Deutschland) ausgestattet mit Einweg-Kassetten-Kits (ABX, Radeberg, Deutschland) [132,133,154].

#### 3.3.4.2 *Bindungsstudien*

Zur Evaluation des Bindungsverhaltens von <sup>68</sup>Ga-Pentixafor an Nebennieren und Nebennierentumoren (4 APA, 4 EIA, 2 Nebennierenkarzinome, 3 normale Nebennieren) erfolgten Bindungsstudien. Hierfür wurde Kryogewebe verwendet, welches direkt nach Entnahme in flüssigen Stickstoff überführt wurde und bei -80 °C gelagert wurde. Vor Anfertigung der Schnitte wurden diese bei -20 °C aufbewahrt. Anschließend wurden 20 µm dicke Schnitte hergestellt, jeweils 2 davon nebeneinander auf Superfrostobjektträger aufgezogen und bei -80 °C gelagert. Zunächst erfolgte die Umrandung der Schnitte mit einem Fettstift. Zu Beginn erfolgte die Fixierung der Schnitte mit 4 % PFA in PBS für 10 min. Nach zweimaligem Waschen mit PBS, wurden die Schnitte für 5 min bei Raumtemperatur in TRIS-Puffer inkubiert (pH 7,4, 50 mM). Anschließend wurden die Schnitte zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 20 % humanem AB-Serum (in PBS) behandelt. Hierauf erfolgte die Inkubation jeweils eines Schnittes desselben Präparates mit 2 MBq

<sup>68</sup>Ga-Pentixafor bzw. 2 MBq <sup>68</sup>Ga-Pentixafor plus 10 µM des nicht-radioaktiven Compounds zum Blocken der radioaktiven Substanz (1 h). Nach zweimaligem Waschen mit PBS folgte ein erneuter Waschschrift mit 50 mM TRIS mit 0,05 % Tween (insg. 10 min). Anschließend wurden die Schnitte bei 80 °C getrocknet (ca. 10 min), für 30 min auf die Imager Plates in entsprechenden Kassetten aufgelegt und am CR35BIO Imageplate Scanner (Dürr Medical, Bietigheim-Bissingen, Deutschland) ausgelesen. Die Datenauswertung erfolgte mit den Softwares CR Reader (Dürr Medical), Microsoft Excel 2007 (Microsoft, Redmond, Washington, USA) und Amide Version 0.9.0 [155].

#### 3.3.4.3 Patientenbildgebung

Zur genaueren Beurteilung von <sup>68</sup>Ga-Pentixafor *in vivo* bei Patienten mit PA, wurde bei insgesamt 9 Patienten mit PA aus den Universitätskliniken München (n=6, 5 mittels PET/MRT, 1 mittels PET/CT) und Würzburg (n=3, alle PET/CT) ein <sup>68</sup>Ga-Pentixafor-PET durchgeführt. Nach ausführlicher ärztlicher Aufklärung und Bedenkzeit wurde eine schriftliche Einverständniserklärung der Patienten eingeholt. Vor Injektion der Substanz wurde die Qualität des <sup>68</sup>Ga-Pentixafor gemäß der Standards der europäischen Pharmacopöe für <sup>68</sup>Ga-Edotreotide (Europäische Pharmacopöe, Monograph 01/2013:2482, verfügbar auf [www.edqm.eu](http://www.edqm.eu)). Die radiochemische Reinheit des Tracers wurde durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, sowie Dünnschichtchromatographie bestätigt und lag bei > 99 %. Die Verabreichung von <sup>68</sup>Ga-Pentixafor erfolgte in Einvernehmen mit dem Arzneimittelgesetz (AMG §13 2b) und der Regierungen von Unterfranken und Oberbayern, Deutschland [155].

Bei 4 Patienten mit PA, die eine PET/CT-Bildgebung erhielten, wurde die korrespondierende CT mittels low-dose Protokoll erstellt (20 mA, 120 keV, 512 x 512 Matrix, 5 mm Schichtdicke, 30 mm/s Inkrement, Rotationszeit 0,5 s, Pitch-Index 0,8), einschließlich Schädelbasis und proximale Oberschenkel. Daten zur PET Emission wurden in einem dreidimensionalen Modus erfasst (200 x 200 Matrix, 2-3 min Emissionszeit pro Position). Nach Korrektur für Streuung und Zerfall erfolgte die Bildrekonstruktion mithilfe der Software Esoft (Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland). Die übrigen 5 Patienten erhielten eine kombinierte PET/MRT-Bildgebung. Hierbei wurden PET- und MRT-Daten

gleichzeitig über 20 Minuten an einem integrierten PET/MRT-System 50 bis 69 Minuten nach Injektion von  $^{68}\text{Ga}$ -Pentixafor erhoben. Die PET-Aufnahme erfolgte im 3D-list-mode inklusive PET-basierter Atemtriggerung. Eine Schwächungskorrektur wurde mittels Dixon-basierter MR-Sequenzen erzielt. Zur anatomischen Korrelation wurden zusätzlich axiale T1w und fettgesättigte T2, sowie koronare T2w Sequenzen erfasst.

Die injizierte Aktivität lag zwischen 115 und 207 MBq und die Aufnahmen wurden 50 bis 86 Minuten nach Injektion begonnen.

Alle Untersuchungen wurden jeweils an einem PET/CT-System (Siemens Biograph mCT 64 und 128, Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland), oder PET/MRT-System (Siemens Biograph mMR; Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) durchgeführt. Die semiquantitative Auswertung des PET erfolgte durch Berechnung der höchsten metabolischen Aktivität in jeder Nebenniere (maximum standardized uptake values =  $\text{SUV}_{\text{max}}$ ) mittels 2D regions of interest (ROI) mit einem Durchmesser von 1 cm. Außerdem erfolgte eine qualitative Analyse des CT zur Beurteilung der Lage und Größe des vorliegenden Nebennierentumors. Alle Aufnahmen wurden durch einen erfahrenen Radiologen (CT, MRT) oder Nuklearmediziner (PET) befundet.

Referenzwerte für den  $^{68}\text{Ga}$ -Pentixafor-Uptake in normalen Nebennieren wurden durch eine retrospektive Auswertung des Tracer-Uptakes (Bestimmung des  $\text{SUV}_{\text{max}}$  mittels 2D ROI von 1 cm Durchmesser) im  $^{68}\text{Ga}$ -Pentixafor-PET von Patienten mit multiplen Myelomen ( $n=20$ ) [140], Pleuramesotheliomen ( $n=6$ ) und gastrointestinalen Tumoren ( $n=18$ ). Das  $^{68}\text{Ga}$ -Pentixafor-PET erfolgte bei diesen Patienten zur Evaluation einer möglichen Therapieoption der zugrundeliegenden Tumorerkrankung mittels  $^{177}\text{Lu}$ -Pentixather. Keiner dieser Patienten wies eine im konventionellen CT sichtbare Nebennierenraumforderung auf.

### 3.3.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Daten wurden SPSS, Version 23.0 und 24.0 (IBM, Chicago, Illinois, USA) und Graphpad PRISM 6 (La Jolla, California, USA) verwendet. Normalverteilte kontinuierliche Daten wurden mittels t-Test, nicht normalverteilte mittels Mann-Whitney  $U$  Test verglichen. Zur Berechnung des DFP und der DLZ zwischen verschiedenen Radiologen wurde der Kruskal-

Wallis-Test mit anschließender post-hoc Analyse nach Dunn-Bonferroni verwendet. Zum Vergleich zwischen APA, CPA und EIA gruppiert nach hoher und niedriger CXCR4-Expression wurde der Chi-Quadrat-Test eingesetzt. Zur Ermittlung einer Korrelation CXCR4- und CYP11B2-Expression erfolgte die Berechnung des Pearson-Korrelations-Koeffizienten. Eine ROC (Receiver Operating Characteristic) – Kurve für den SUV<sub>max</sub> in APA und Kontrollen wurde mit Graphpad PRISM 6 erstellt. Die Darstellung nicht normalverteilter Werte erfolgt als Median [Minimum – Maximum], normalverteilter Werte als Mittelwert ± Standardabweichung. Ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant erachtet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Erfassung der Strahlenbelastung bei Nebennierenvenenkathetern

#### 4.1.1 Allgemeine Daten

Insgesamt wurden 658 NNVK evaluiert. Aufgrund unzureichender Daten für DFP, DLZ und ED wurden 2 Untersuchungen nicht in die endgültige Analyse aufgenommen (n=656). Das mediane Alter der Patienten betrug 53 Jahre [16 – 85]. Von allen Patienten wurden insgesamt 10 einem NNVK zweimal unterzogen. Die Durchführung von intrainerventionellen Cortisol-Schnellmessungen zur Evaluation einer regelrechten Katheterlage erfolgte in den Zentren München (n= 400/400) und Würzburg (n=81/151). Hinsichtlich der Schwierigkeit der Untersuchung auf Grundlage des radiologischen Befundes lagen Informationen aus Leipzig und Würzburg vor. In jeweils 44,2 % und 13,2 % war die Katheterisierung als erschwert dokumentiert. In 79,9 % der Fälle gestaltete sich die Kanülierung erfolgreich, allerdings mit deutlicher Variabilität unter den beteiligten Zentren. Die Erfolgsrate zeigte signifikante Unterschiede zwischen NNVK mit und ohne Cortisol-Schnellmessung (88,6% vs. 55,8%, p<0,001) (**Tabelle 12**).

Zentrum	Alter MW ± SD	Geschlecht w % (n) m % (n)	Cortisol- Schnellmessung	Erfolgreiche Kanülierung % (n)
<b>Berlin</b> n=53	49,4 ± 11,7	45,3 (24) 54,7 (29)	Nein	58,5 (31)
<b>Leipzig</b> n=52	54,8 ± 12,2	58,0 (30) 42,0 (22)	Nein	60,8 (31)
<b>München</b> n=400	51,8 ± 10,7	64,0 (256) 36,0 (144)	Ja	90,3 (361)
<b>Würzburg</b> n=151	56,7 ± 10,8	37,7 (57) 62,3 (94)	Ja	50,0 (35/70)* 81,5 (66/81)**
<b>Gesamt</b>	53,3 ± 11,1	36,5 (201) 63,5 (350)		79,9 (524)

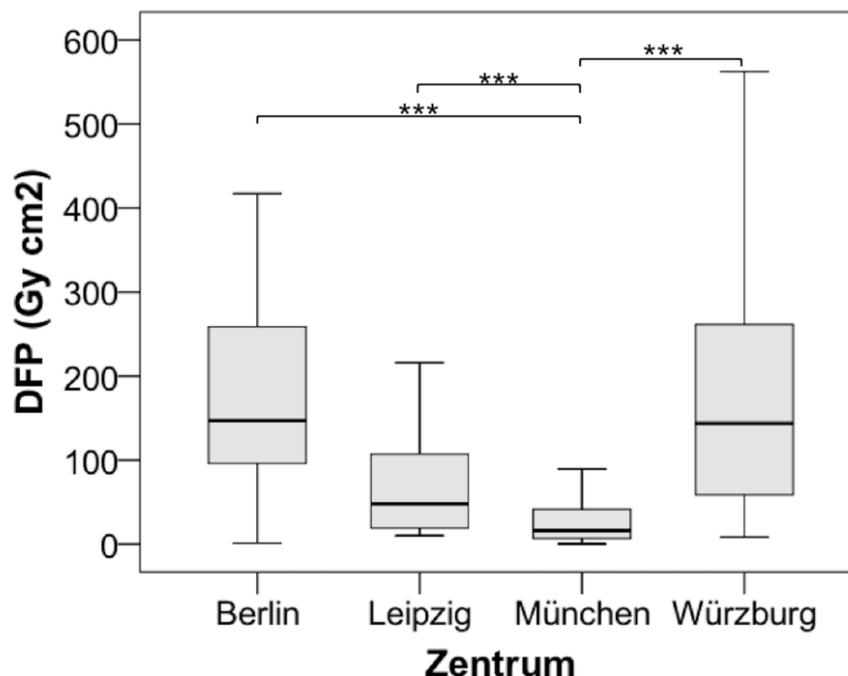
**Tabelle 12:** Allgemeine Daten zu Alter, Geschlecht, Cortisol-Schnellmessung und Erfolg der Kanülierung. Leipzig: n=51 für Erfolgreiche Kanülierung. \* AVS ohne Cortisol-Schnellmessung, \*\* AVS mit Cortisol-Schnellmessung. MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, w=weiblich, m=männlich.

#### 4.1.2 Dosisflächenprodukt, Effektive Dosis und Durchleuchtungszeit

Das mediane DFP über alle Zentren hinweg lag bei 32,5 Gy cm<sup>2</sup> [0,3 – 3180,9]. Allerdings waren deutliche Unterschiede des DFP zwischen den einzelnen Zentren zu verzeichnen (DFP<sub>Berlin</sub> = 147,0 Gy cm<sup>2</sup> [1,1 – 1185,8] vs. DFP<sub>München</sub> = 16,2 Gy cm<sup>2</sup> [0,3 – 3180,9]) (**Tabelle 13**). Insbesondere zwischen München und allen anderen beteiligten Zentren zeigten sich signifikante Unterschiede im DFP (alle p<0,001; **Abbildung 7**). Die aus dem DFP berechnete ED betrug 6,5 mSv [0,05 – 636,2] mit erneut hoher Variabilität zwischen den Zentren.

Zentrum	DFP Gy cm <sup>2</sup>	ED mSv	DLZ min
<b>Berlin</b>	147,0 [1,1 – 1185,8]	29,4 [0,2 – 237,2]	21,6 [5,3 – 40,1]
<b>Leipzig</b>	48,0 [10,0 – 609,6]	9,6 [2,0 – 121,9]	19,6 [0,8 – 50,0]
<b>München</b>	16,2 [0,3 – 3180,9]	3,2 [0,1 – 636,2]	15,8 [0,3 – 184,2]
<b>Würzburg</b>	143,7 [8,2 – 1166,1]	28,7 [1,6 – 233,2]	26,7 [4,0 – 115,7]

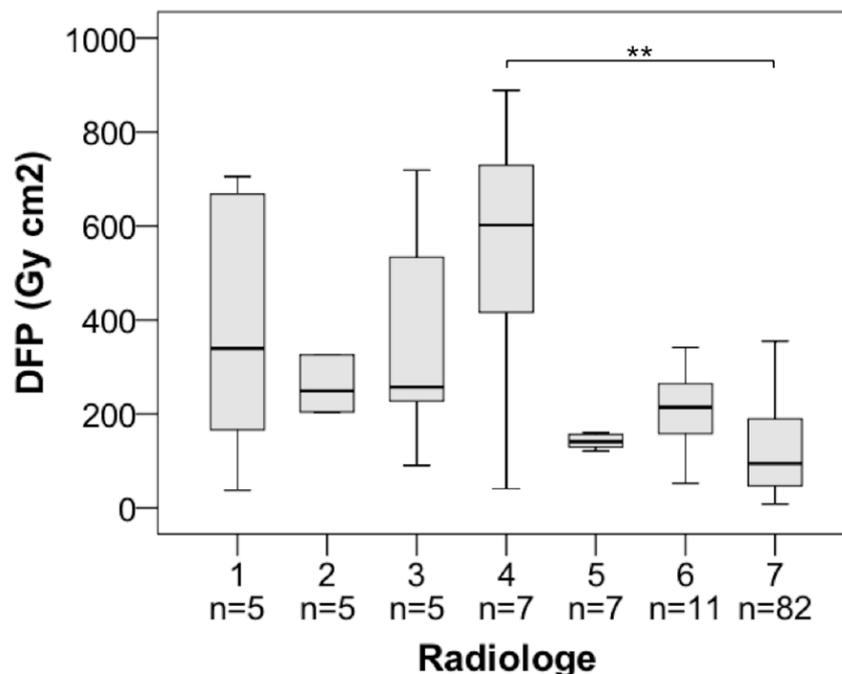
**Tabelle 13:** Dosisflächenprodukt (DFP, Gy cm<sup>2</sup>), effektive Dosis (ED, mSv) und Durchleuchtungszeit (DLZ, min) an beteiligten Zentren. Werte sind dargestellt als Median [Minimum – Maximum].



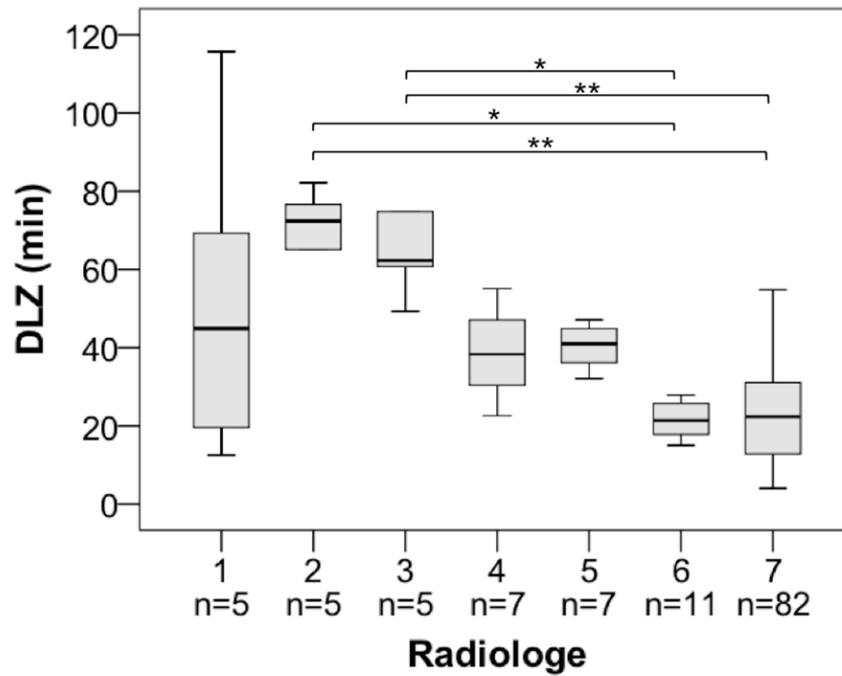
**Abbildung 7:** Dosisflächenprodukt (DFP, Gy cm<sup>2</sup>) in Berlin, Leipzig, München und Würzburg. Berlin vs. München p<0,001, Leipzig vs. München p<0,001, München vs. Würzburg p<0,001. \*\*\*p≤0,001.

Eine für Würzburg vorgenommene Analyse der einzelnen durchführenden Radiologen, zeigte eine Tendenz zur niedrigeren Strahlendosis, sowie signifikant kürzerer Durchleuchtungszeit mit steigender Erfahrung des Untersuchers (**Abbildung 8** und **Abbildung 9**). Bei insgesamt 10 Patienten erfolgte die zweimalige Durchführung des NNVK. Hierbei war eine kumulative effektive Strahlendosis von 35,6 mSv [0,92 – 114,0] zu verzeichnen.

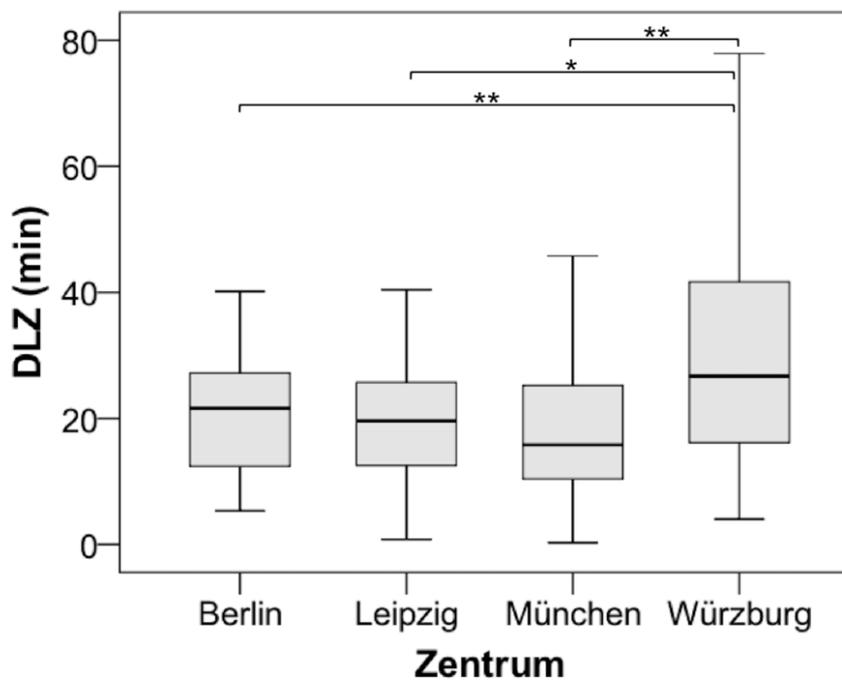
Die DLZ insgesamt lag bei 18,3 min [0,3 – 184,2]. Auch hier waren zentrumsabhängig signifikante Unterschiede erkennbar. Beispielsweise stellte sich die DLZ in München mit 15,8 min [0,3 – 184,2] im Vergleich zu Würzburg mit 26,7 min [4,0 – 115,7] signifikant niedriger dar ( $p \leq 0,001$ ) (**Tabelle 13** und **Abbildung 10**).



**Abbildung 8:** Unterschiede des Dosisflächenprodukt (DFP, Gy cm<sup>2</sup>) zwischen verschiedenen Radiologen in Würzburg, sowie Anzahl durchgeführter Nebennierenvenenkatheter (X-Achse: Radiologe Nummer 1 – 7, n=Anzahl an Untersuchungen). 4 vs. 7  $p=0,006$ . \*\*  $p \leq 0,01$ .



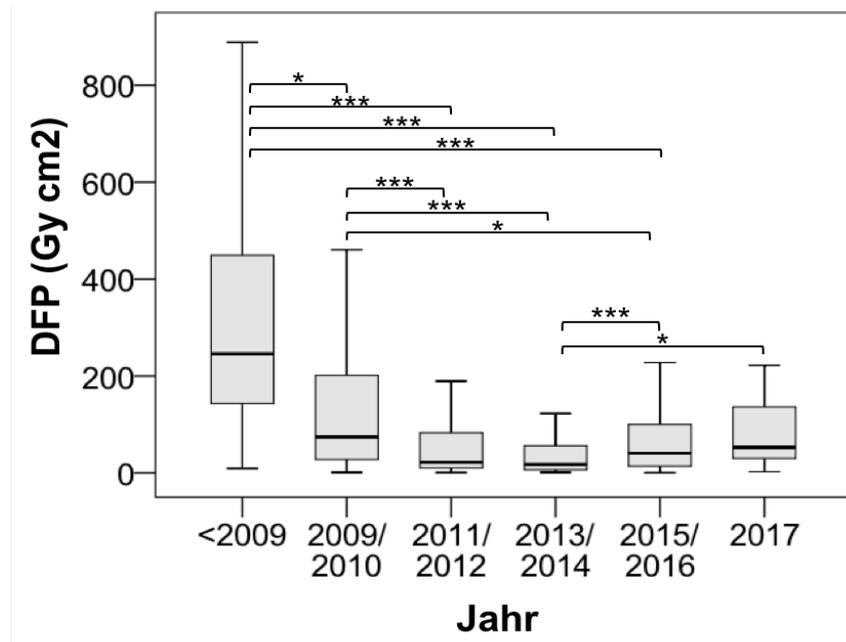
**Abbildung 9:** Unterschiede in der Durchleuchtungszeit (DLZ, min) zwischen verschiedenen Radiologen in Würzburg, sowie Anzahl durchgeführter Nebennierenvenenkatheter (X-Achse: Radiologe Nummer 1 – 7, n=Anzahl an Untersuchungen). 2 vs. 6 p= 0,036, 2 vs. 7 p=0,007, 3 vs. 6 p=0,035, 3 vs. 7 p=0,006. \* p<0,05, \*\* p<0,01.



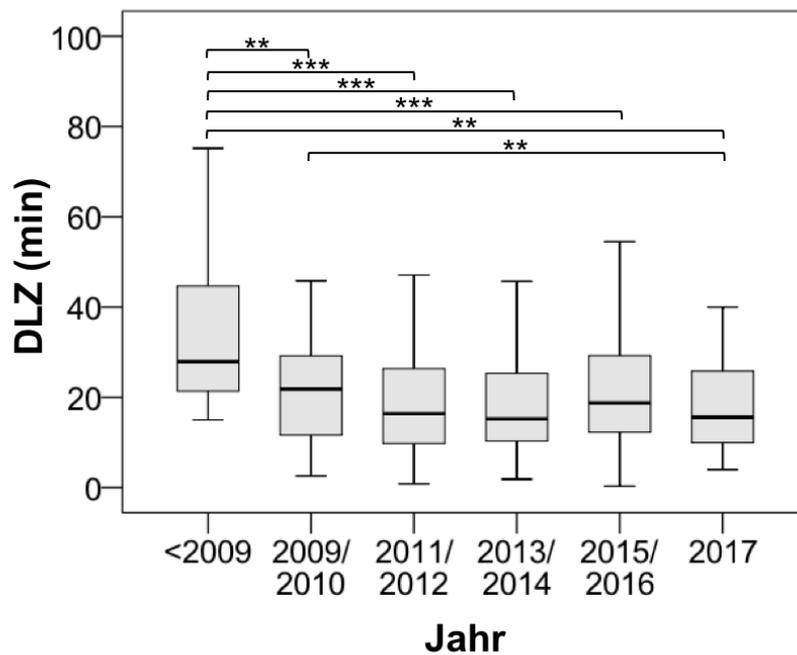
**Abbildung 10:** Durchleuchtungszeit (DLZ, min) in Berlin, Leipzig, München und Würzburg. Berlin vs. Würzburg p=0,001, Leipzig vs. Würzburg p=0,002, München vs. Würzburg p<0,001. \* p<0,05, \*\* p<0,01.

War die Durchführung des NNVK als schwierig dokumentiert (n=43/202), stiegen DFP, ED und DLZ auf 141,6 Gy cm<sup>2</sup> [14,5 – 824,0] (p=0,072), 28,3 mSv [2,9 – 164,8] (p=0,072) und 30,8 min [11,0 – 115,7] (p=0,001). Außerdem waren DFP, ED und DLZ signifikant niedriger bei NNVK mit erfolgreicher Kanülierung (DFP<sub>erfolgreich</sub>=25,2 Gy cm<sup>2</sup> [0,3 – 3180,9], DFP<sub>nicht erfolgreich</sub>=79,5 Gy cm<sup>2</sup> [1,1 – 1185,8], ED<sub>erfolgreich</sub> =5,0 mSv [0,1 – 636,2], ED<sub>nicht erfolgreich</sub>=15,9 mSv [0,2 – 237,2], DLZ<sub>erfolgreich</sub> =16,3 min [0,3 – 184,2], DLZ<sub>nicht erfolgreich</sub> =27,9 min [4,4 – 115,7]; alle p<0,001).

Eine Auswertung der Strahlenbelastung im zeitlichen Verlauf, zeigte signifikante Unterschiede für DFP, DLZ und ED. Insbesondere zwischen Kathetern, welche vor 2009 und nach 2009 durchgeführt wurden, war dies deutlich sichtbar. Insgesamt ließ sich ein weitgehend konstanter Verlauf der Strahlenexposition in den kürzer zurückliegenden Jahren verzeichnen (**Abbildung 11** und **Abbildung 12**).



**Abbildung 11:** Dosisflächenprodukt (DFP, Gy cm<sup>2</sup>) im zeitlichen Verlauf. <2009: n=39, DFP 245,7 [9,2 – 888,4]; 2009/2010: n=75, DFP 74,4 [1,1 – 705,3]; 2011/2012: n=119, DFP 21,8 [0,8 – 789,3]; 2013/2014: n=177, DFP 17,6 [1,2 – 1166,9]; 2015/2016: n=212, DFP 40,8 [0,3 – 3180,9]; 2017: n=24, DFP 52,9 [2,5 – 222,0]. \*p≤0,05, \*\*\*p≤0,001.



**Abbildung 12:** Durchleuchtungszeit (DLZ, min) im zeitlichen Verlauf. <2009: n=39, DLZ 27,9 [15,0 – 98,6]; 2009/2010: n=75, DLZ 21,8 [2,6 – 115,7]; 2011/2012: n=119, DLZ 16,4 [0,8 – 104,0]; 2013/2014: n=177, DLZ 15,2 [1,9 – 102,5]; 2015/2016: n=212, DLZ 18,8 [0,3 – 184,3]; 2017: n=24, DLZ 15,6 [4,0 – 63,0]. \*\* p≤0,01, \*\*\* p≤0,001.

#### 4.1.3 Untersuchungsmodalitäten

Die Anzahl der verschiedenen Blutentnahmestellen lag zwischen drei (München) und sechs (Berlin, Leipzig, Würzburg). Digitale Subtraktions-Angiographien (DSA) wurden standardmäßig an drei Zentren für zwei, drei oder alle sechs Entnahmestellen durchgeführt (Berlin, Leipzig, Würzburg), ebenso wie bei unklaren anatomischen Verhältnissen der Nebennierenvenen. Dem entgegengesetzt wurden die Entnahmeorte in München mittels last-image hold und nicht mittels DSA dokumentiert. Hinsichtlich der Anzahl an Bildern pro Sekunde lagen diese an den beteiligten Zentren zwischen 7,5 und 15 (**Tabelle 14**). An allen Zentren wurden low-dose-Programme der entsprechenden Röntgenanlagen verwendet. Auch wurde die durchleuchtete Körperfläche durch alle Radiologen auf das nötige Minimum reduziert. Zudem zeigten sich zwischen den einzelnen in München verwendeten Röntgenanlagen signifikante Unterschiede im DFP (**Tabelle 15**).

Zentrum	Röntgenanlage	Entnahmestellen Anzahl (Ort)	DSA Anzahl (Ort)	Bilder pro Sekunde
<b>Berlin</b>	ALLURA Xper FD	6	3*	2
	System	(LNNV, RNNV, 2 x LNV, 2 x VCI)	(2 x RNNV, LNNV)	
<b>Leipzig</b>	Innova 4100	6	2*	15
	Axiom Artis BA	(LNNV, RNNV, 2 x VCI, RNV, LNV)	(LNNV, RNNV)	
<b>München</b>	Multistar TOP	3	0	7.5
	Artis Zee MP	(LNNV, RNNV,		
	Axiom Artis XA C	LFV oder RFV)		
	Polystar XA			
<b>Würzburg</b>	Artis Zee MP	6	6	7.5
		(LNNV, RNNV, VCI, VCS, RNV, LNV)	(LNNV, RNNV, VCI, VCS, RNV, LNV)	

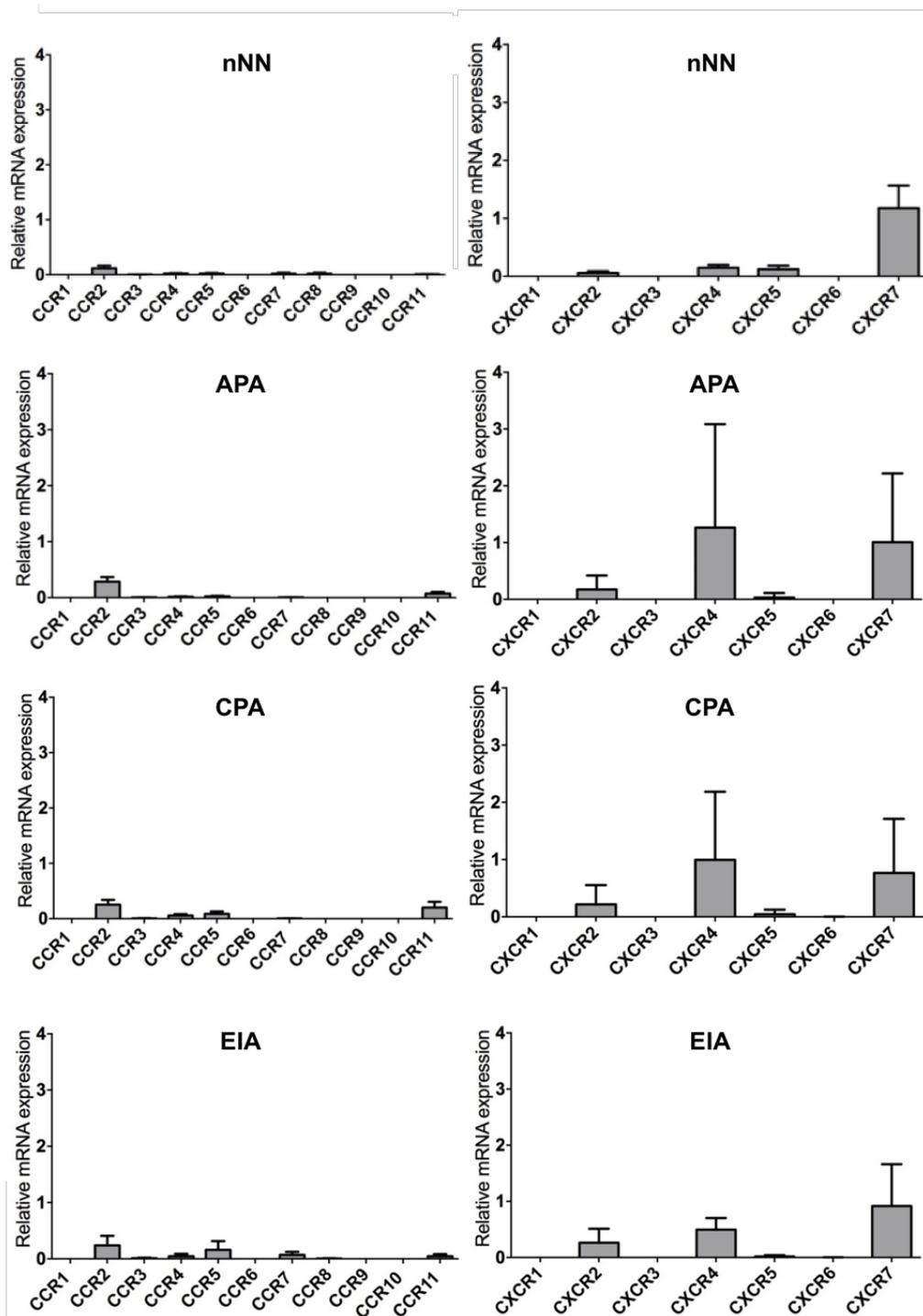
**Table 14:** Übersicht der Untersuchungsmodalitäten der teilnehmenden Zentren. DSA=Digitale-Subtraktionsangiographie, LNNV=linke Nebennierenvene, RNNV=rechte Nebennierenvene, VCI=Vena cava inferior, RNV=rechte Nierenvene, LNV=linke Nierenvene, LFV=linke Femoralvene, RFV=rechte Femoralvene, VCS=Vena cava superior. \* im Falle unklarer anatomischer Verhältnisse erfolgten weitere DSA.

Anlage München	DFP Gy cm <sup>2</sup>
Multistar TOP	12,5 [0,8 – 229,4]
Artis Zee MP	25,2 [0,26 – 3180,9]
Axiom Artis XA C	12,8 [1,3 – 42,8]
Polystar XA	24,4 [4,2 – 235,3]

**Table 15:** Übersicht des Dosisflächenproduktes (DFP, Gy cm<sup>2</sup>) an verschiedenen Röntgenanlagen in München. Werte sind angegeben als Median [Minimum – Maximum]. Multistar TOP vs. Artis Zee MP p<0,001, Multistar TOP vs. Polystar XA p=0,003, Artis Zee MP vs. Axiom Artis XA C p=0,035, Axiom Artis XA C vs. Polystar XA p=0,027.

## 4.2 Quantitative Analyse der Expression verschiedener Chemokinrezeptoren

Die Evaluation der relativen quantitativen Expression verschiedener Chemokinrezeptoren in der normalen Nebenniere (n=4) und Nebennierenadenomen (APA, n=12; CPA, n=11; EIA, n=3) erfolgte mittels qRT-PCR. Im Speziellen wurde die mRNA-Expression von insgesamt 18 Chemokinrezeptoren analysiert. Diese waren jeweils vom CC- (CCR 1 – 11) oder CXC- (CXCR1 – 7) Motiv. Hierbei zeigte sich die höchste mRNA-Expression für die Rezeptoren CXCR4 und CXCR7, welche sowohl in der nNN, als auch APA, CPA und EIA nachweisbar waren. In der nNN, sowie EIA überwog die mRNA-Expression von CXCR7. Dies verhielt sich bei APA und CPA umgekehrt. Insgesamt zeigte sich allerdings eine deutliche Variation der mRNA-Expression, sowie dementsprechend keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen adrenocorticalen Adenomen. Desweiteren waren auch andere Chemokinrezeptoren auf deutlich niedrigerem Expressionsniveau nachweisbar. Hierzu gehörten insbesondere CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR8 und CCR11, sowie CXCR2 und CXCR5 (**Abbildung 13**).



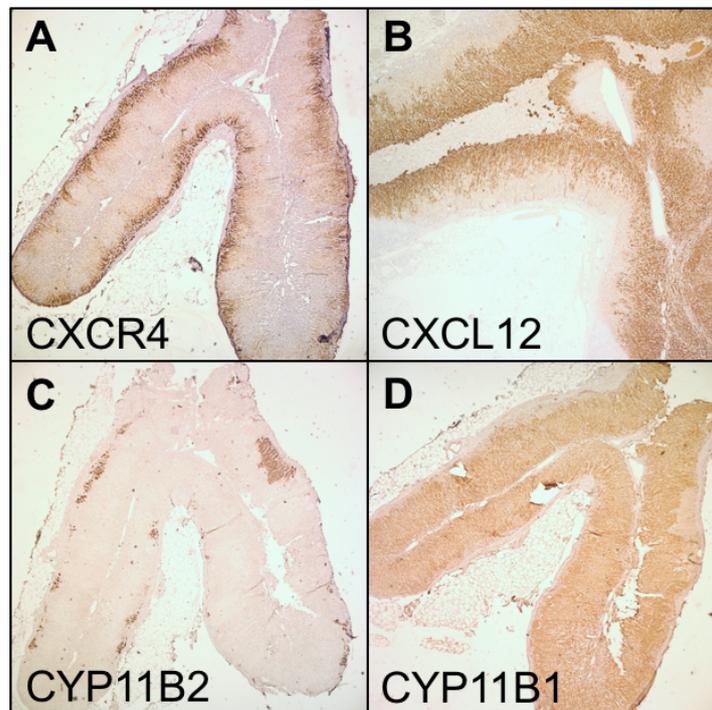
**Abbildung 13:** Chemokinrezeptor mRNA Expression in adrenocorticalen Adenomen. CC-Chemokinrezeptoren (links), CXC-Chemokinrezeptoren (rechts) in normaler Nebenniere (nNN, n=4), Aldosteron-produzierenden Adenomen (APA, n=12), Cortisol-produzierenden Adenomen (n=11) und endokrin-inaktiven Adenomen (EIA, n=3).

### 4.3 Immunhistochemie

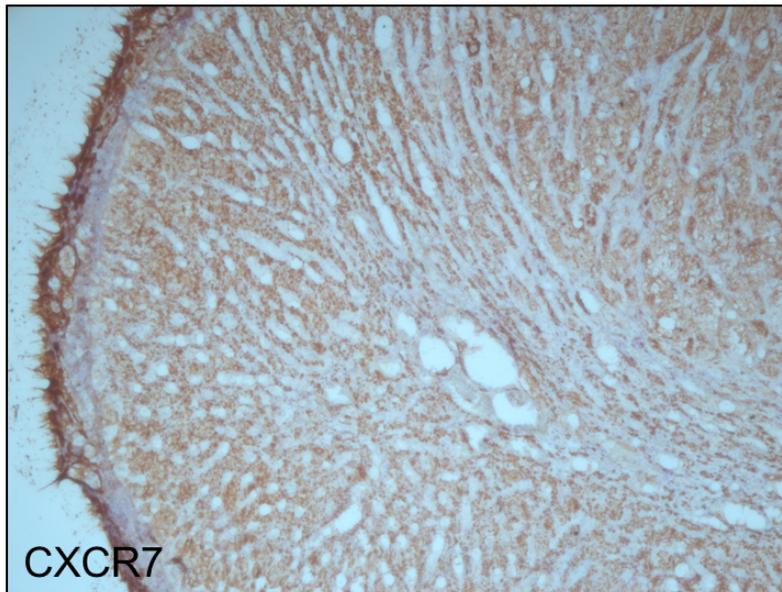
#### 4.3.1 Normale Nebenniere

Auf Grundlage der Ergebnisse der qRT-PCR erfolgte insbesondere die Beurteilung der Expression von CXCR4 auf Proteinebene mittels

Immunhistochemie. In der nNN war CXCR4 insbesondere in der subkapsulären Nebennierenrinde nachweisbar, wohingegen die Expression zu den inneren Schichten der Nebennierenrinde hin abnahm (**Abbildung 14A**). Der für CXCR4 spezifische Ligand CXCL12 zeigte ein zu CXCR4 komplementäres Expressionsmuster in der nNN mit deutlicher Positivität der inneren Schichten der Nebennierenrinde und nach außen hin abnehmender Expression (**Abbildung 14B**). Zusätzlich erfolgte die immunhistochemische Färbung der Schlüsselenzyme der Cortisol- und Aldosteronsynthese CYP11B1 und CYP11B2. CYP11B2-positive Zellen formten subkapsuläre Cluster in der Nebennierenrinde, wohingegen CYP11B1-positive Zellen ubiquitär in der Nebenniere lagen, insbesondere aber in der *Zona fasciculata* und *reticularis* (**Abbildung 14C+D**). Der für CXCR4 positive Bereich stellte sich allerdings insgesamt größer dar als derjenige für CYP11B2. Aufgrund der deutlich nachweisbaren mRNA-Expression von CXCR7 und der physiologischen Funktion als Rezeptor für CXCL12 erfolgte außerdem die immunhistochemische Evaluation von CXCR7 in der nNN. Diese ergab eine ubiquitäre, nicht zonenspezifische Expression des Rezeptors auf Proteinebene (**Abbildung 15**).



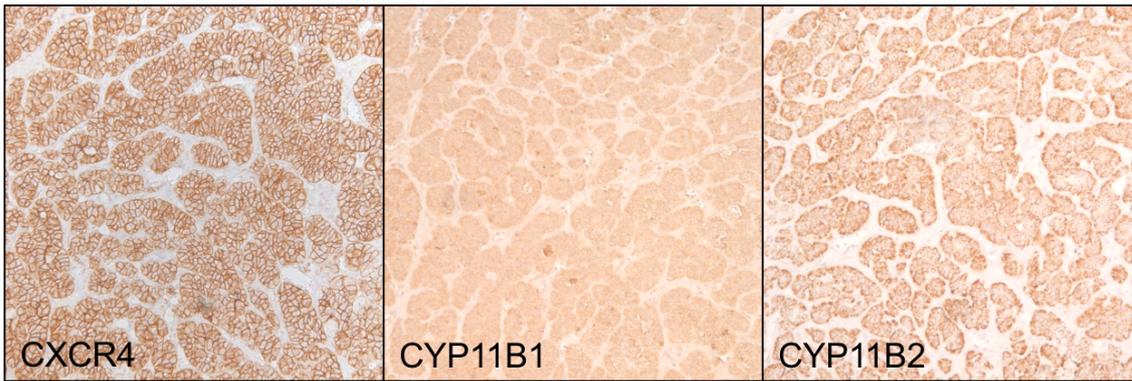
**Abbildung 14:** Repräsentative immunhistochemische Färbung für CXCR4, CXCL12, CYP11B1 und CYP11B2 der normalen Nebenniere. Vergrößerung 2,5x.



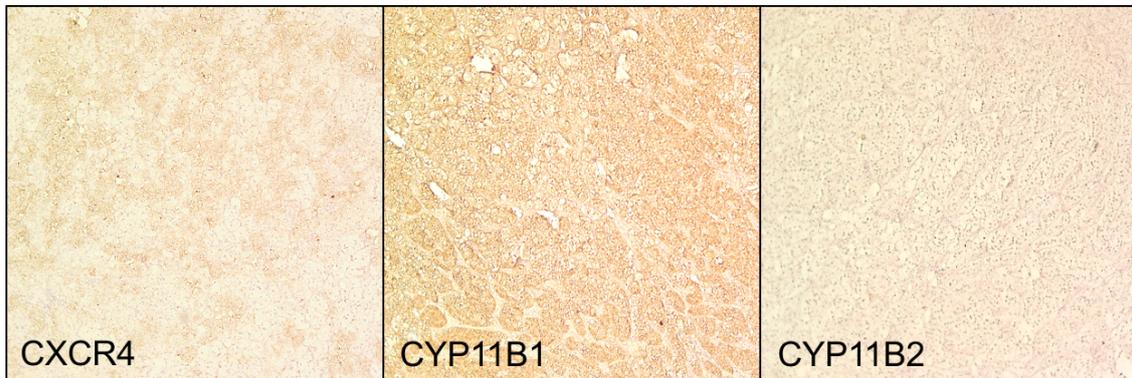
**Abbildung 15:** Repräsentative immunohistochemische Färbung für CXCR7 in der normalen Nebenniere. Vergrößerung 10x.

#### 4.3.2 Nebennierenadenome

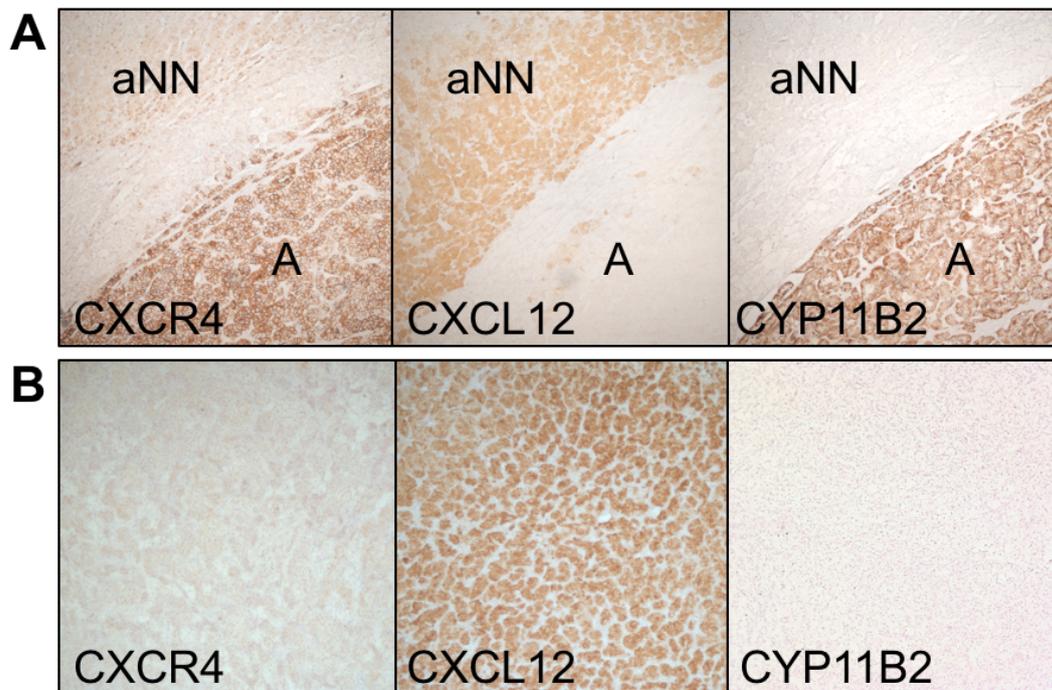
Da in der nNN vor allem Aldosteron-produzierende Zellen der *Zona glomerulosa* Positivität für CXCR4 zeigten, erfolgte im Anschluss die genauere Charakterisierung der Expression von CXCR4, CYP11B1 und CYP11B2 in APA, verglichen mit CPA und EIA. Diese wies deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Entitäten auf. Während APA sich stark positiv für CXCR4 darstellten, war der Rezeptor in EIA nur vereinzelt nachweisbar (**Abbildung 16**). In CPA war die CXCR4-Färbung weniger ausgeprägt als in APA, allerdings stärker als in EIA (**Abbildung 17** und **Abbildung 18**). Ähnlich wie für die nNN war auch in den untersuchten adrenocorticalen Adenomen (jeweils n=5 für APA, CPA und EIA) die Expression von CXCR4 und CXCL12 komplementär zueinander (**Abbildung 18**).



**Abbildung 16:** Repräsentative immunhistochemische Färbung eines Aldosteron-produzierenden Adenoms für CXCR4, CYP11B1 und CYP11B2. Vergrößerung 10x.

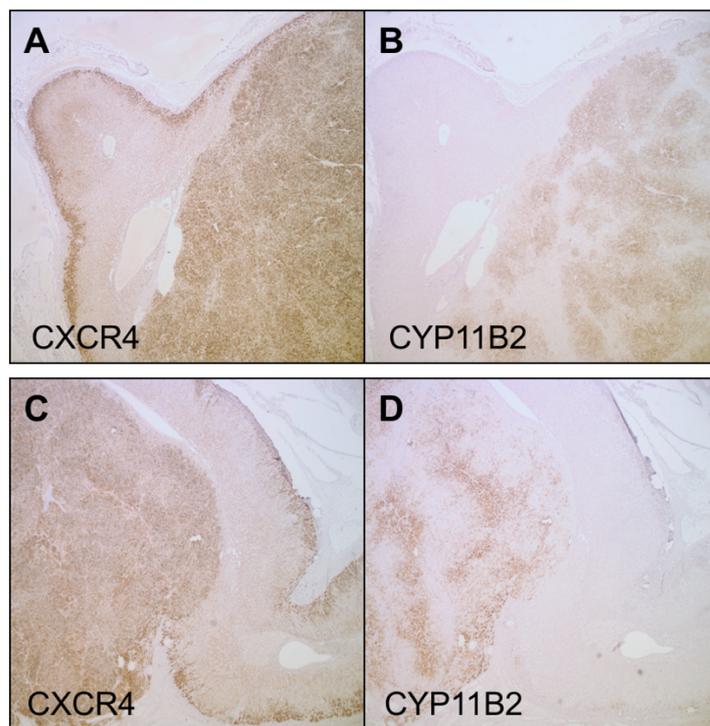


**Abbildung 17:** Repräsentative immunhistochemische Färbung eines Cortisol-produzierenden Adenoms für CXCR4, CYP11B1 und CYP11B2. Vergrößerung 10x.



**Abbildung 18:** Repräsentative immunhistochemische Färbung für CXCR4, CXCL12 und CYP11B2. **A:** Aldosteron-produzierendes Adenom, **B:** Endokrin-inaktives Adenom. aNN=anhängende Nebenniere, A=Adenom. Vergrößerung 10x.

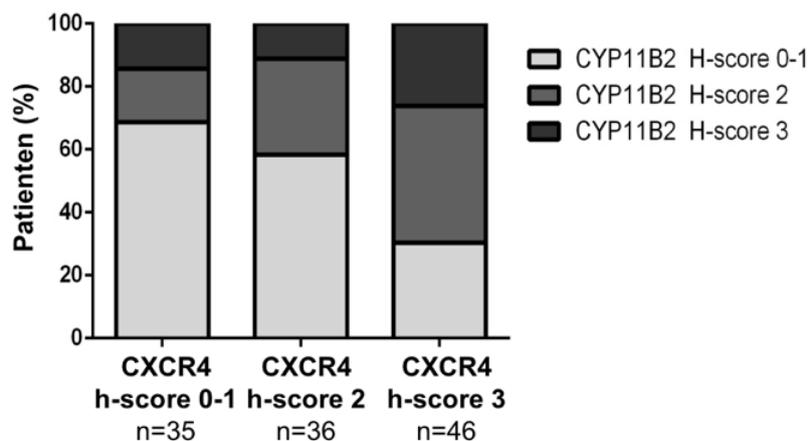
Insgesamt zeigten 71 % der APA, 26 % der CPA und 4 % der EIA eine hohe CXCR4-Expression (**Tabelle 16**). 8 EIA waren gänzlich CXCR4-negativ. Ein Vergleich der Intensität der Membranfärbung ergab signifikante Unterschiede zwischen APA und EIA ( $p < 0,001$ ), APA und CPA ( $p < 0,001$ ), ebenso wie CPA und EIA ( $p = 0,002$ ). Eine Koexpression von CYP11B1 war außerdem in 81 % der APA, 100 % der CPA und 98 % der EIA vorhanden. Des Weiteren ließ sich eine signifikante positive Korrelation der CXCR4- und CYP11B2-Expression in APA beobachten ( $r = 0,42$ ;  $p < 0,01$ ; **Abbildung 20**). Die CXCR4-Expression der dem Tumor anhängenden Nebenniere zeigte keine Unterschiede innerhalb der einzelnen Adenomtypen und war in allen Fällen nachweisbar (**Tabelle 17** und **Abbildung 19**). Innerhalb der Gruppe der APA zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf verschiedene klinische Parameter (Alter, Geschlecht, Blutdruck, Aldosteron in Plasma, Kalium im Serum) in Abhängigkeit von der CXCR4-Expression (**Tabelle 18**).



**Abbildung 19:** CXCR4 und CYP11B2 in zwei Aldosteron-produzierenden Adenomen. **A:** Adenom 1, CXCR4; **B:** Adenom 1, CYP11B2; **C:** Adenom 2, CXCR4; **D:** Adenom 2, CYP11B2. Vergrößerung 2,5x.

Tumor	n	CXCR4 h-score ≤1 n (%)	CXCR4 h-score >1 n (%)
APA	117	34 (29)	83 (71)
CPA	54	40 (74)	14 (26)
EIA	49	47 (96)	2 (4)

**Tabelle 16:** H-score der CXCR4-Membranexpression in Nebennierenadenomen. APA=Aldosteron-produzierendes Adenom, CPA=Cortisol-produzierendes Adenom, EIA=Endokrin-inaktives Adenom. APA vs. EIA p<0,001, APA vs. CPA p<0,001, CPA vs. NFA p=0,002.



**Abbildung 20:** Verhältnis zwischen CXCR4 und CYP11B2 in Aldosteron-produzierenden Adenomen. Abbildung erstellt von Dr. B. Heinze.

aNN	n	CXCR4 h-score ≤1 n (%)	CXCR4 h-score >1 n (%)
APA	108	66 (61)	42 (39)
CPA	47	31 (66)	16 (34)
EIA	36	26 (72)	10 (28)

**Tabelle 17:** H-score der CXCR4-Membranexpression in der anhängenden Nebenniere (aNN) verschiedener Nebennierenadenome. APA=Aldosteron-produzierendes Adenom, CPA=Cortisol-produzierendes Adenom, EIA=Endokrin-inaktives Adenom.

Klinische Daten	CXCR4 h-score ≤1 n=34	CXCR4 h-score >1 n=83	p-Wert
<b>Alter bei ED</b> Jahre Median [Min-Max]	49 [26 – 67]	49 [18 – 75]	0,9
<b>Geschlecht</b> m/w, %	44/56	39/61	0,6
<b>RR<sub>syst</sub></b> mmHg	170 ± 22	160 ± 26	0,1
<b>RR<sub>diast</sub></b> mmHg	100 ± 12	100 ± 15	0,2
<b>Kalium</b> mmol/l	3,0 ± 0,6	3,0 ± 0,7	0,9
<b>Aldosteron</b> ng/l Median [Min-Max]	n=23 520 [208 – 1950]	n=48 500 [57 – 1148]	0,5
<b>CYP11B1- Expression (IHC)</b> %	73	84	0,2

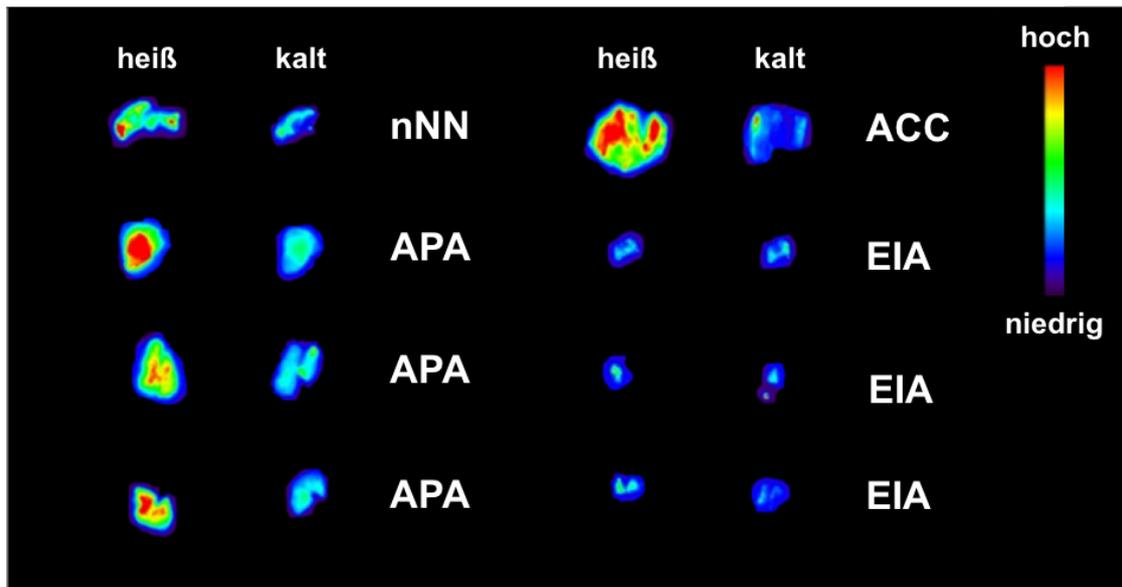
**Tabelle 18:** Klinische Daten der Patienten mit Aldosteron-produzierenden Adenomen nach CXCR4-Expression. RR<sub>syst</sub>=systolischer Blutdruck, RR<sub>diast</sub>=diastolischer Blutdruck, m=männlich, w=weiblich, IHC=Immunhistochemie.

#### 4.4 Bildgebung mit <sup>68</sup>Ga-Pentixafor

##### 4.4.1 Ex vivo Bildgebung

Nach dem immunhistochemischen Nachweis einer hohen CXCR4-Expression in APA sollte zunächst die Bindung des CXCR4-spezifischen PET-Tracers <sup>68</sup>Ga-Pentixafor an Nebennierengewebe *ex vivo* evaluiert werden. Dies erfolgte

mittels Bindungsstudien an Kryogewebe von nNN, APA, adrenocorticalen Karzinomen (ACC) und EIA. Hierbei zeigte sich eine spezifische Bindung des Tracers im Randbereich der nNN, in APA, sowie in ACC. Im Gegensatz dazu gelang kein Nachweis einer Bindung von  $^{68}\text{Ga}$ -Pentixafor an EIA (**Abbildung 21**).



**Abbildung 21:** Bindungsstudie mit  $^{68}\text{Ga}$ -Pentixafor an Kryogewebe von normaler Nebenniere (nNN), Aldosteron-produzierenden Adenomen (APA), Nebennierenkarzinom (ACC) und endokrin-inaktiven Adenomen (EIA). Heiß: 2MBq  $^{68}\text{Ga}$ -Pentixafor, Kalt: 2MBq  $^{68}\text{Ga}$ -Pentixafor + 10  $\mu\text{M}$  des nicht-radioaktiven Liganden. Rot: starke Bindung, Blau: schwache Bindung. Abbildung partiell erstellt von Dr. B. Heinze.

#### 4.4.2 Patientenbildgebung

Für eine erste Einschätzung des diagnostischen Potentials des  $^{68}\text{Ga}$ -Pentixafor-PET bei PA erhielten 9 Patienten mit diagnostiziertem PA ein  $^{68}\text{Ga}$ -Pentixafor-PET. Zur Bestimmung eines Referenzwertes für den  $^{68}\text{Ga}$ -Pentixafor-Uptake in normalen Nebennieren wurden zusätzlich die SUV-Werte der Nebennieren von Patienten mit malignen Erkrankungen ohne sichtbare Nebennierenraumforderung in der konventionellen Bildgebung (n=44) ermittelt. Weiterführende Informationen zu den untersuchten Patienten mit PA sind in **Tabelle 19, S. 51** aufgeführt. 8 der 9 untersuchten Patienten mit PA wiesen einen CT/MRT-graphisch sichtbaren Tumor mit einer Größe zwischen 6 und 37

mm auf. Der mediane  $SUV_{max}$  von 68-Ga-Pentixafor innerhalb des Tumors bei Patienten mit PA lag bei 8,6 [4,7 – 18,3]. In der kontralateralen Nebenniere von Patienten mit PA war der mediane  $SUV_{max}$  mit 4,0 [2,3 – 6,5] signifikant niedriger als innerhalb des Tumors ( $p < 0,001$ ). Nur ein Patient mit APA von 6 mm Größe zeigte auf Seite der späteren OP einen niedrigeren 68Ga-Pentixafor-Uptake. Innerhalb der Kontrollgruppe reichten die  $SUV_{max}$  –Werte von 1,0 bis 5,8 (linke Nebenniere:  $3,4 \pm 1,4$ , rechte Nebenniere:  $3,0 \pm 1,4$ , jeweils Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) (**Abbildung 22A, S. 52**).

Die Diagnose eines ACA wurde postoperativ durch einen Pathologen bestätigt. Bei 4 Patienten wurde außerdem immunhistochemisch eine hohe CXCR4-Expression im APA nachgewiesen (3 Patienten mit h-score=2, 1 Patient mit h-score=3). Alle Tumore waren außerdem CYP11B2 – positiv.

Zusätzlich wurden Quotienten der  $SUV_{max}$  –Werte in Kontrollen und Patienten mit PA berechnet. Während bei Kontrollen die Seite des höheren  $SUV_{max}$  durch die kontralaterale Seite mit niedrigerem  $SUV_{max}$  dividiert wurde, erfolgte bei Patienten mit PA die Division des  $SUV_{max}$  auf Seite des APA durch den  $SUV_{max}$  auf der Gegenseite. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Quotienten von Patienten mit PA und Kontrollen (PA:  $2,8 \pm 0,5$ ; Kontrollen:  $1,5 \pm 0,08$ ;  $p < 0,001$ ; jeweils Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

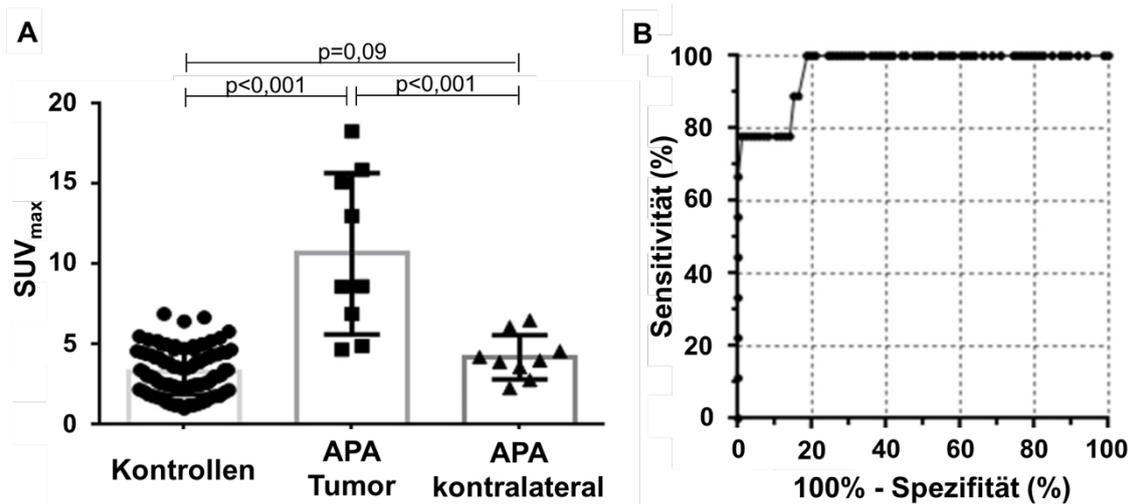
Die ROC – Analyse ergab bei einem Cutoff des  $SUV_{max}$  von 4,9 eine Sensitivität von 88,9 % (95 %-Konfidenzintervall, 51,8 – 99,7) und eine Spezifität von 87,2 % (95 %-Konfidenzintervall, 78,3 – 93,4) für die Diagnose eines APA. Bei einer Spezifität von 100 % ergab sich ein Cutoff für den  $SUV_{max}$  von 7,3 bei einer Sensitivität von 77,8 %, wohingegen eine Sensitivität von 100 % bei einem Cut-off von 4,7 (Spezifität 83,7 %) erreicht wurde (**Abbildung 22B**).

In **Abbildung 23** und **Abbildung 24** ist jeweils ein 68Ga-Pentixafor-PET/CT, in **Abbildung 25** ein 68Ga-Pentixafor PET/MRT bei APA beispielhaft dargestellt. Zusätzlich zum Tracer-Uptake im Adenom ist physiologischerweise auch eine Anreicherung in den Nieren (renale Elimination der Substanz) und der Milz, sowie dem Knochenmark zu verzeichnen. Auch ist in **Abbildung 23B** eine Speicherung in der kontralateralen, linken Nebenniere visuell abgrenzbar,

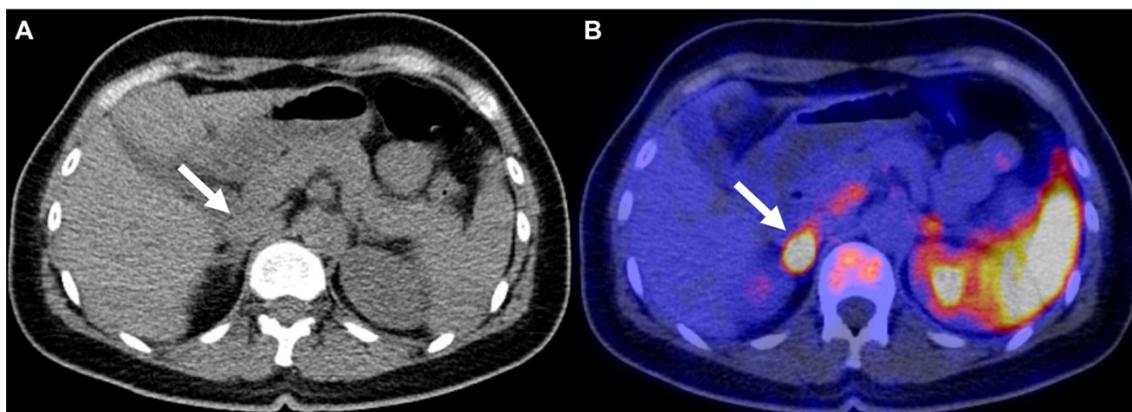
wohingegen die kontralaterale Nebenniere im  $^{68}\text{Ga}$ -Pentixafor-PET der Patientin in **Abbildung 25B** keinerlei Uptake aufweist.

Geschlecht	Alter Jahre	Seite Tumor	Größe mm	NNVK	SUV <sub>max</sub> rechts	SUV <sub>max</sub> links	OP	Outcome
W	47	Rechts	23	Kanülierung rechts nicht erfolgreich, Suppression links	13,0	3,6	Rechts	KBR
W	57	Rechts	17	Lateralisation nach rechts, keine Suppression links	15,1	2,8	Rechts	KBR
W	55	Rechts	37	Keine Lateralisation	8,6	4,0	Rechts	KBR
M	50	Rechts	6	Lateralisation nach rechts	4,9	6,1	Rechts	KBR
W	47	Rechts	14	nicht durchgeführt	18,3	4,2	Rechts	KBR
M	63	Links	18	Lateralisation nach links	2,3	4,7	Links	KBR
M	57	Links	28	Keine Lateralisation	3,9	15,9	Links	KBR
M	44	Kein Tumor	Kein Tumor	Lateralisation nach rechts	6,9	6,5	Keine OP	Keine OP
M	65	Links	12	Lateralisation nach links	4,6	8,6	Keine OP	Keine OP

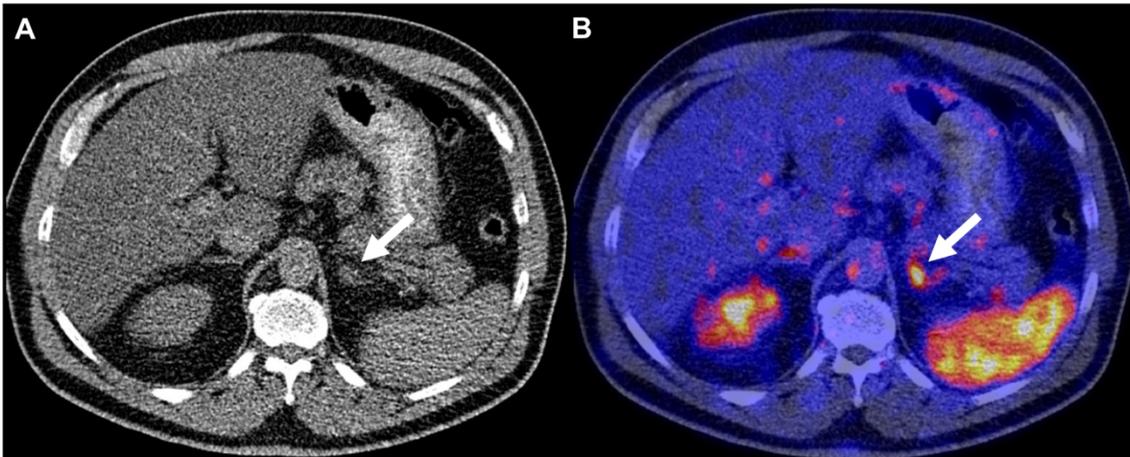
**Tabelle 19:** Klinische Daten der mit <sup>68</sup>Ga-Pentixafor untersuchten Patienten. W=weiblich, M=männlich, NNVK=Nebennierenvenenkatheter, SUV<sub>max</sub> rechts=maximum standardized uptake values der rechten Nebenniere, SUV<sub>max</sub> links=maximum standardized uptake values der linken Nebenniere, OP=Adrenalektomie, KBR=Klinische Besserung und biochemische Remission.



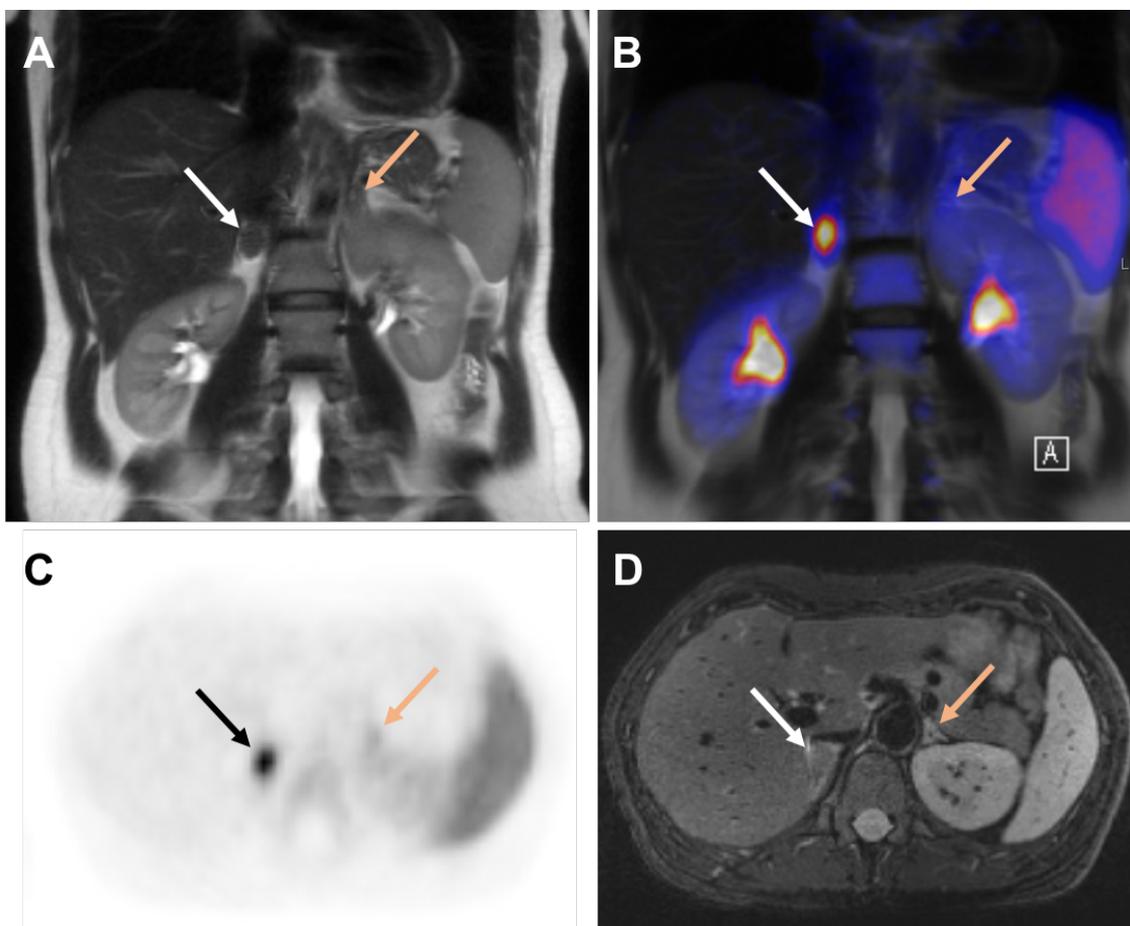
**Abbildung 22:** A: Maximum standardized uptake values (SUV<sub>max</sub>) für 68Ga-Pentixafor in normalen Nebennieren (Kontrollen), verglichen mit Patienten mit Aldosteron-produzierenden Adenomen sowohl im Tumor (APA Tumor) als auch in der kontralateralen Nebenniere (APA kontralateral). SUV<sub>max</sub> – Werte der Kontrollgruppe sind gepoolt dargestellt (rechte und linke Nebennieren). B: Receiver Operating Characteristic Analyse der SUV<sub>max</sub> – Werte von Kontrollen (n=44; 86 Werte von Messungen in der rechten und linken Nebenniere; bei 2 Patienten nur Messung der linken Nebenniere möglich) und Aldosteron-produzierenden Adenomen (n=9). Area under the curve, 0,964 (95 % CI, 0,92–1,01).



**Abbildung 23:** 68Ga-Pentixafor-PET/CT einer Patientin mit Aldosteron-produzierendem Adenom. A: CT axial, B: PET/CT axial. Weiße Pfeile: Adenom.



**Abbildung 24:**  $^{68}\text{Ga}$ -Pentixafor-PET/CT eines Patienten mit Aldosteron-produzierendem Adenom. **A:** CT axial, **B:** PET/CT axial. Weiße Pfeile: Adenom.



**Abbildung 25:**  $^{68}\text{Ga}$ -Pentixafor-PET/MRT einer Patientin mit Aldosteron-produzierendem Adenom. **A:** MRT T2 koronar, **B:** PET/MRT koronar, **C:** PET axial, **D:** MRT T2 spät axial. Pfeile weiß und schwarz: Adenom; Pfeile orange: kontralaterale Nebenniere.

## 5. Diskussion

### 5.1 Strahlenbelastung durch Nebennierenvenenkatheter

Während verschiedene Arbeiten zu beispielsweise der Qualität der bilateralen Katheterisierung, zur Komplikationsrate und zum Einfluss der Cortisol-Schnellmessung existieren, wurde bis dato keine systematische Analyse der Strahlenbelastung bei NNVK durchgeführt. Im Rahmen dieser ersten multizentrischen, deutschlandweiten, retrospektiven Studie konnte gezeigt werden, dass die Durchführung eines NNVK mit einer hohen Strahlenbelastung behaftet ist. Die ED über alle Zentren hinweg lag bei 6,5 mSv, zeigte allerdings eine deutliche Variabilität innerhalb der einzelnen Zentren und Untersuchungen (0,1 – 636 mSv). Die höchste mediane ED an einem teilnehmenden Zentrum lag bei 29,4 mSv. Legt man eine Strahlendosis von 0,02 mSv für eine Röntgen-Thorax-Aufnahme zugrunde, entspräche dies 1470 Aufnahmen, oder auch dem 12fachen der natürlichen Strahlenbelastung von ca. 2,4 mSv pro Jahr [156,157]. Betrachtet man nun die Referenzwerte des Bundesamtes für Strahlenschutz und zieht zum Vergleich beispielsweise die Koronarangiographie heran, so wäre dieser Grenzwert von 53 % der untersuchten NNVK überschritten worden (vgl. **Tabelle 2, S. 17**).

Ein klinisch relevantes Ergebnis dieser Studie liegt in der unterschiedlichen Strahlenexposition zwischen den teilnehmenden Zentren. Insbesondere in München konnte eine signifikant niedrigere Strahlenbelastung im Vergleich zu allen anderen Zentren verzeichnet werden. Dieser Unterschied ist durch die Untersuchungsmodalitäten an den einzelnen Zentren erklärbar. Im Gegensatz zu allen anderen Zentren wurden in München keinerlei DSA zur Darstellung der Gefäße verwendet. Stattdessen erfolgte die Dokumentation der Katheterisierung der Nebennierenvenen ausschließlich mittels dynamischer Fluoroskopie oder last image hold, das eine Speicherung des letzten Bildes auf dem Bildschirm auch nach Beendigung der Fluoroskopie ermöglicht. Die alleinige Verwendung von DSA verursacht bereits eine ca. 10fach höhere Strahlenbelastung. Somit stellt dieser technische Unterschied nicht nur eine plausible, sondern auch eine behebbare Ursache der erhöhten Strahlenexposition dar. Außerdem sind weitere Faktoren mit Einfluss auf die Strahlendosis denkbar. Hierzu zählen der Abstand des Patienten zur

Röntgenanlage und zum Röntgendetektor, der korrekte Einsatz des Kollimators, die Geräteeinstellung mit jeweiligem verwendetem Organprogramm des Herstellers und die Anzahl an Bildern pro Sekunde. Keines der beteiligten Zentren nutzte 30 Bilder pro Sekunde, sodass dieser Faktor bereits als weitgehend optimiert anzusehen ist.

Ein interessantes Detail dieser Analyse liegt in den Unterschieden der Erfolgsrate bilateraler Katheterisierungen zwischen Zentren mit und ohne Cortisol-Schnellmessung. Dies unterstreicht den bereits vorbeschriebenen Nutzen dieser Technik zur Kontrolle und Verbesserung der Katheterlage, ohne zu einer höheren Strahlenbelastung zu führen [51,158].

Basierend auf diesen Ergebnissen wird deutlich, dass Optimierungsbedarf hinsichtlich der technischen Durchführung des NNVK zur Einsparung von Strahlung besteht. Mögliche Ansatzpunkte liegen in der Beschränkung von DSA auf ein Minimum und stattdessen häufigerer Nutzung von last image hold zur Dokumentation der Nebennierenvenen. Auch könnte eine Reduktion der Entnahmeorte (zwischen 3 und 6 an den beteiligten Zentren) die Strahlenbelastung vermindern. Zwar existiert keine Aufschlüsselung der Strahlenbelastung pro Entnahmeort, dennoch ist an Zentren, die an jeder Entnahmestelle DSA-Aufnahmen anfertigen, bereits durch eine geringere Anzahl an Entnahmeorten ein deutlicher Effekt auf die Strahlenexposition zu erwarten. Dies sollte möglich sein, ohne die Aussagekraft der Untersuchung zu kompromittieren. Derartige Anpassungen der Untersuchungsprotokolle sollten außerdem nicht nur in Bezug auf die Exposition der Patienten, sondern auch auf die des Untersuchers in Betracht gezogen werden [159,160].

Während einerseits die Verbesserung der Untersuchungsmodalitäten zur Reduktion der Strahlendosis eine Notwendigkeit darstellen, sollte diese Belastung auch bedacht werden, wenn Patienten zum NNVK überwiesen werden. Insbesondere bei jungen Patienten sollte darauf geachtet werden, die Möglichkeit des leitliniengerechten Überspringens des NNVK im diagnostischen Algorithmus zu nutzen. In der Clinical Practice Guideline von 2016 ist explizit die Möglichkeit genannt, bei Patienten unter 35 Jahre mit ausgeprägtem Aldosteron-Exzess, Hypokaliämie und zu einem APA passender Nebennierenraumforderung im CT ohne Lokalisationsdiagnostik mittels NNVK eine unilaterale Adrenalektomie durchzuführen [40].

Lang et al. konnten in einer Arbeit zum Auftreten maligner Erkrankungen bei PA zeigen, dass die Lebenszeitprävalenz bei PA 9,6 % betrug, wohingegen sie in einer Kohorte hypertensiver Kontrollen bei 6,0 % lag. Dieser Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant ( $p=0,08$ ). Insbesondere konnte eine hohe Prävalenz an Nierenzellkarzinomen beobachtet werden. In einigen Fällen traten maligne Erkrankungen bereits vor Durchführung des NNVK auf. Langzeitdaten zum Auftreten maligner Neoplasien nach NNVK fehlen ebenfalls. Dennoch sollte auch vor diesem Hintergrund eine Reduktion der Strahlenbelastung durch den NNVK angestrebt werden [161].

## **5.2 Chemokinrezeptoren in der Nebenniere und adrenocorticalen Adenomen**

### *5.2.1 Normale Nebenniere*

Mittels qRT-PCR normaler Nebennieren erfolgte eine erste quantitative Einschätzung der Expression von Chemokinrezeptoren des CXC- und CC-Motives. Hier wurde erstmals das Vorhandensein von Chemokinrezeptoren auf mRNA-Ebene gezeigt. Grundsätzlich konnten die Chemokinrezeptoren CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR8, CCR11, CXCR2, CXCR5 und in höherem Maße CXCR4 und CXCR7 nachgewiesen werden. Aufgrund der im Gegensatz zu den restlichen Rezeptoren hohen Expression von CXCR4 und CXCR7 wurden diese beiden Chemokinrezeptoren weiterführend immunhistochemisch evaluiert. Interessanterweise war eine charakteristische Verteilung von CXCR4 in der nNN zu verzeichnen. CXCR4-positive Zellen saßen vor allem subkapsulär in den äußeren Schichten der Nebennierenrinde, wohingegen CXCL12 als solitärer Ligand von CXCR4 eine hierzu komplementäre Expression aufwies. Dem entgegengesetzt war CXCR7 ubiquitär in der Nebennierenrinde nachweisbar.

Diverse Arbeiten sprechen dafür, dass undifferenzierte, subkapsuläre Progenitorzellen in der Nebennierenrinde den Ausgangspunkt für die Differenzierung zu Glomerulosa-Zellen bilden, die anschließend eine zentripetale Wanderung in Richtung des Nebennierenmarkes vollziehen und hierbei eine Transdifferenzierung zu Glucocorticoid- und Androgenproduzierenden Zellen der *Zona fasciculata* bzw. *Zona reticularis* durchlaufen [162]. Dieses Modell der zentripetalen Zellmigration als zentralen Mechanismus

der postnatalen Zonierung der Nebennierenrinde wurde bereits in den 1940er Jahren von Salmon und Zwemer vorgeschlagen [163]. Freedman et al. konnten mittels Lineage-Tracing-Studien im Tiermodell zeigen, dass postnatal die einzelnen Zonen der Nebennierenrinde durch Konversion von Glomerulosa- in Fasciculata-Zellen entstehen, dieser Mechanismus erneut auftritt im Rahmen einer adrenalen Regeneration nach Behandlung mit Dexamethason und diese Differenzierung maßgeblich vom Vorhandensein des Steroidogenic Factor 1 (SF-1) abhängt. Interessanterweise konnte, obwohl SF-1-defiziente Glomerulosa-Zellen nicht mehr zur Differenzierung in Fasciculata-Zellen fähig waren, in diesem Fall dennoch eine langfristige Aufrechterhaltung einer intakten *Zona fasciculata* beobachtet werden, was das Vorhandensein weiterer, alternativer Mechanismen der zentripetalen Migration nahelegt [164]. Im Rahmen verschiedener Studien konnte bereits eine Migration CXCR4-positiver Zellen anhand eines Gradienten des Liganden CXCL12 nachgewiesen werden, weshalb es grundsätzlich möglich scheint, dass die CXCR4/CXCL12-Achse in der Nebenniere einen dieser alternativen Mechanismen darstellt [89,165].

Eine weitere Hypothese hinsichtlich der physiologischen Rolle von CXCR4 in der Nebennierenrinde liegt in deren ultrastruktureller Organisation. Dies konnte beispielsweise, ebenfalls am Tiermodell, unter anderem für die Ausbildung von Glomeruli und Podozyten der Niere gezeigt werden [166].

Sowohl CXCR4 als auch CXCR7 sind in der Lage, über  $\beta$ -Arrestin 2, welches die Aktivität G-Protein-gekoppelter Rezeptore reguliert, Signale zu übertragen. Coggins et al. haben die Signaltransduktion über  $\beta$ -Arrestin 2 in einer Mammakarzinom-Zelllinie, abhängig von der Expression von entweder nur CXCR4 oder CXCR7, oder CXCR4 und CXCR7 genauer untersucht. Hierbei zeigte sich, dass im Falle einer Coexpression von CXCR4 und CXCR7, das Vorhandensein von CXCR7 das Recruitment von  $\beta$ -Arrestin 2 vermindert und eine erhöhte Konzentration von CXCL12 zur Auslösung eines Signales nötig ist und somit CXCR7 modulierend auf die Aktivierung von CXCR4 wirkt [167].

Die genaue physiologische Rolle von CXCR4, CXCL12 und CXCR7 in der nNN ist allerdings bisher nicht abschließend geklärt und Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

Des Weiteren waren immunhistochemisch positive Zellen für CYP11B2 insbesondere in Clustern in der *Zona glomerulosa* auffindbar, wohingegen

CYP11B1 hauptsächlich eine Expression in der *Zona fasciculata* aufwies. Während CXCR4 durchgehend im Randbereich der Nebennierenrinde vorhanden war, stellten sich die CYP11B2-positiven Zonen schmäler dar. Die Expressionsmuster der beiden Enzyme im Rahmen dieser Arbeit decken sich ebenfalls mit vorherigen Untersuchungen. Eine Publikation von Aiba und Fujibayashi aus dem Jahr 2011 beschreibt bereits eine Veränderung der Enzymausstattung und Morphologie der Nebennierenrinde mit zunehmendem Alter. Während die CYP11B2-positiven Glomerulosa-Zellen bei Säuglingen, Kindern und jungen Patienten eine dünne, kontinuierliche Schicht bilden, nimmt mit steigendem Alter das Vorkommen CYP11B2-positiver Zellcluster zu, wohingegen eine durchgehende *Zona glomerulosa* nicht mehr abzugrenzen ist [168,169].

### 5.2.2 Nebennierenadenome

In einem nächsten Schritt sollten auch benigne Nebennierentumore hinsichtlich ihres Chemokinrezeptorprofils untersucht werden. Aufgrund des Expressionsmusters von CXCR4 in der *Zona glomerulosa* als Ort der Aldosteronproduktion war der Vergleich zwischen APA und anderen ACA von besonderem Interesse. Mittels qRT-PCR konnten in APA, CPA und EIA dieselben Chemokinrezeptoren gefunden werden, welche bereits in der nNN detektierbar waren, allerdings mit höherer mRNA-Expression von CCR2, CCR5, CCR11 und CXCR2. Wiederum zeigte sich eine hohe Expression der Rezeptoren CXCR4 und CXCR7, wobei diese in APA am ausgeprägtesten war. In EIA war auf mRNA-Ebene ebenfalls CXCR4 detektierbar, allerdings in niedrigerem Maße als CXCR7. Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich nicht, was auf die hohe Variabilität innerhalb der einzelnen untersuchten Tumore zurückgeführt werden kann. Als weiterer beeinflussender Faktor kann auch die Möglichkeit einer nicht vollständig selektiven RNA-Isolation aus dem Tumorgewebe, sondern beispielsweise kleiner Teile noch anhängenden Fett- oder Nebennierengewebes, nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Immunhistochemisch zeigten sich zur qRT-PCR kongruente Ergebnisse in Bezug auf die CXCR4-Expression in APA, CPA und EIA. Auch waren die Unterschiede zwischen den einzelnen ACA deutlicher ausgeprägt. Passend zur Hypothese, dass Aldosteron-produzierende Zellen hoch positiv für CXCR4 sein

könnten, zeigten 71 % der untersuchten APA hohe h-scores für CXCR4, wohingegen nur 29 % eine niedrige Expression aufwiesen. Die Korrelation zwischen CXCR4-Expression und Expression von CYP11B2 im Tumor unterstreicht ebenfalls die außergewöhnlich hohe Expression von CXCR4 in Aldosteron-produzierendem Gewebe. Bemerkenswert ist weiterhin der signifikante Unterschied zu EIA und CPA. Während nur 4 % der EIA eine hohe CXCR4-Expression zeigten, nahmen CPA hinsichtlich ihrer CXCR4-Expression auf Proteinebene eine Mittelstellung zwischen EIA und APA ein. 8 EIA waren komplett CXCR4-negativ, wohingegen bei beiden Tumoren mit hoher CXCR4-Expression im zeitlichen Verlauf ein Größenwachstum dokumentiert war und zur Entscheidung für eine operative Entfernung führte. Die CXCR4-Expression in APA war weiterhin unabhängig von klinischen Parametern wie Geschlecht, Alter, Blutdruck, Aldosteron, oder Kaliumwerten.

In den bezüglich ihrer CXCL12-Expression untersuchten ACA war interessanterweise ebenfalls ein komplementäres Expressionsmuster von CXCR4 und CXCL12 nachweisbar, ebenso zeigte das anhängende Nebennierengewebe eine der nNN entsprechende Verteilung für CXCR4. Während bereits beschrieben wurde, dass Nebennierenkarzinome eine hohe CXCR4-Expression aufweisen, ist dies für APA bisher nicht bekannt. Hinsichtlich der pathophysiologischen Rolle sind allerdings Unterschiede zwischen Nebennierenkarzinomen und APA anzunehmen. Im Gegensatz zu APA, stellt eine Aldosteronproduktion durch Nebennierenkarzinome eine Seltenheit dar [170,171]. Während bei Nebennierenkarzinomen die CXCR4-Expression am ehesten auf die Malignität und die Bedeutung von CXCR4 in der Tumormetastasierung zurückzuführen ist, erscheint bei PA die Entwicklung von APA aus Zellen der *Zona glomerulosa*, die ihrerseits Positivität für CXCR4 aufweisen, plausibel [74].

Die Expression von CYP11B2 in den untersuchten APA stellte sich unterschiedlich dar: Manche APA wiesen eine recht gleichmäßige CYP11B2-Expression auf, andere zeigten wiederum eine deutlich höhere Inhomogenität, bis hin zu einer CYP11B2-Positivität einzelner Zellcluster innerhalb des APA. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass unter anderem das Vorliegen somatischer Mutationen (KCNJ5, ATP1A1, ATP2B3, CACNA1D) das Expressionsmuster von CYP11B1 und CYP11B2 beeinflusst. Beispielsweise

konnten Monticone et al. an einer Gruppe von 71 Patienten mit PA zeigen, dass APA mit KCNJ5-Mutationen histopathologisch Zellen der *Zona fasciculata* ähneln und eher CYP11B1 exprimieren, wohingegen APA mit ATP1A1-, ATP2B3-, oder CACNA1D-Mutation morphologisch eher Glomerulosa-artige Zellen mit hoher CYP11B2-Expression aufweisen [172].

### **5.3 Funktionelle Bildgebung bei primärem Hyperaldosteronismus**

Die korrekte Subtypdifferenzierung zwischen APA und BAH ist von essentieller Bedeutung für die weitere Therapieplanung (Adrenalektomie vs. Mineralokortikoidrezeptor-Antagonist) bei PA. Als aktueller Goldstandard in der Lokalisationsdiagnostik gilt der Nebennierenvenenkatheter. Wie bereits einleitend erwähnt, ist diese Untersuchung allerdings mit Nachteilen behaftet, wozu unter anderem die mangelnde Standardisierung der Durchführung und Interpretation, die Schwierigkeit einer bilateral korrekten Katheterisierung, die Invasivität und nicht zuletzt auch die hohen Kosten, die mit der Untersuchung und einem stationären Aufenthalt verbunden sind, gehören [40,48,50,51]. Daher existieren bereits diverse Arbeiten zur Etablierung klinischer Algorithmen, welche die konventionelle Bildgebung, klinische Daten, Laborchemie und weitere Verfahren (Kochsalzbelastungstest, Orthostasetest) mit einbeziehen [57,173,174]. Ziel der Weiterentwicklung solcher Algorithmen sollte in der Limitation der Durchführung des NNVK auf ein selektiertes Patientengut liegen. Während die konventionelle Bildgebung (CT oder MRT) alleine nur eingeschränkt zur Lokalisationsdiagnostik verwendbar ist, erscheint die Applikation einer funktionellen Bildgebungsmethode (PET oder SPECT) zur Differenzierung zwischen unilateraler und bilateraler Erkrankung vielversprechender [48]. Hinsichtlich der funktionellen Beurteilung von Nebennierenraumforderungen existieren diverse eingesetzte Substanzen. Zur Einschätzung der Stoffwechselaktivität einer Raumforderung insbesondere vor dem Hintergrund der Malignität kann grundsätzlich auch bei Nebennierentumoren ein <sup>18</sup>F-Fluorodeoxyglucose-PET zur Anwendung kommen. Allerdings ist hierbei keine weiterführende Aussage möglich, ob es sich um nebenniereneigenes Gewebe handelt [175]. Um dies genauer zu beurteilen erfolgte die Entwicklung von Radiotracer, die spezifisch an die Schlüsselenzyme der Steroidbiosynthese CYP11B1 und CYP11B2 binden.

Hierzu gehören beispielsweise die Substanzen 11C-Metomidat und 123I-Iodmetomidat. Während durch den Einsatz eines 123I-Iodmetomidat-SPECT/CT bei kurzer Untersuchungsdauer und niedriger Strahlenbelastung eine Sensitivität von 89 % und Spezifität von 85 % hinsichtlich der Differenzierung von Läsionen adrenocorticalen und nicht-adrenocorticalen Ursprungs erzielt werden konnte, war in allen untersuchten ACA (APA n=3, EIA n=5, CPA n=4) ein Uptake von 123I-Iodmetomidat nachweisbar [176]. In einer Serie von 212 11C-Metomidate-PET-Bildgebungen (hiervon 26 histologisch gesicherte ACA) bei 173 Patienten zeigte sich ebenfalls eine gute Eignung zur Detektion adrenocorticaler Läsionen (Sensitivität 0,98, Spezifität 0,96). Auch war in allen ACA ein Uptake von 11C-Metomidat sichtbar, allerdings mit einer Tendenz zu höheren SUV-Werten bei Patienten mit APA [177]. Die Eignung von 11C-Metomidat in der Lokalisationsdiagnostik des PA wurde von Burton et al. an 35 Patienten mit PA und 5 Patienten mit EIA näher untersucht. Hierbei zeigte sich eine Sensitivität von 76 % und Spezifität von 87 % für die Detektion von APA. Eine grundsätzliche Problematik an der Verwendung von 11C-Metomidat liegt allerdings in der Notwendigkeit eines am Untersuchungsort vorhandenen Zyklotrons bei sehr kurzer Halbwertszeit der Substanz (ca. 20 Minuten) [70]. Ein neuer Ansatz in der Entwicklung von Tracern für den Einsatz bei PA besteht in einer Erhöhung der Selektivität für CYP11B2 vor dem Hintergrund, hierdurch hauptsächlich Aldosteron-produzierendes Gewebe darstellen zu können [71]. Eine klinische Studie bei Patienten mit PA steht allerdings noch aus.

Der Einsatz der ältesten für den Einsatz bei PA vorgeschlagenen Substanz NP-59 ist aufgrund der zeitintensiven Untersuchung (mehrere Tage), der relativ hohen Strahlenbelastung und der eingeschränkten Sensitivität klinisch nicht mehr von Relevanz [40,64].

#### **5.4 Evaluation von 68Ga-Pentixafor in Aldosteron-produzierenden Adenomen**

Auf Basis der immunhistochemischen Untersuchungen in ACA und der signifikant höheren CXCR4-Expression in APA erfolgte die Evaluation einer möglichen klinischen Anwendung dieser Ergebnisse in der Subtypdifferenzierung bei PA. 68Ga-Pentixafor als CXCR4-spezifischer PET-

Tracer ist bereits im Rahmen maligner Erkrankungen, wie beispielsweise dem Multiplen Myelom und anderen lymphoproliferativen Erkrankungen an Patienten etabliert [134,139]. Das Bindungsverhalten von  $^{68}\text{Ga}$ -Pentixafor an nNN und Nebennierentumore wurde zunächst an Kryogewebe untersucht. Hierbei zeigte sich, passend zu den Ergebnissen der Immunhistochemie und bereits publizierten Daten zu CXCR4 in Nebennierenkarzinomen, eine Anreicherung des Tracers in den äußeren Schichten der nNN, den untersuchten APA, ebenso wie an Nebennierenkarzinomen [110-112]. Demgegenüber war, ebenfalls in Einklang mit der Immunhistochemie, keine Bindung an EIA nachweisbar.

Während die PET-basierte Bildgebung mit  $^{11}\text{C}$ -Metomidat bei PA zwar in der Lage ist, Patienten mit APA mit hoher Bildqualität zu identifizieren, bindet diese Substanz mit hoher Affinität sowohl an CYP11B1 als auch CYP11B2. Dies ist durch die auch im Rahmen dieser Arbeit gesehene Expression beider Enzyme in der Mehrzahl an APA gut erklärt. Allerdings exprimierten auch 98 % der EIA immunhistochemisch CYP11B1. Dies spiegelt sich in der Bindung von sowohl  $^{11}\text{C}$ -Metomidat als auch  $^{123}\text{I}$ -Iodmetomidat an EIA im Rahmen vorheriger klinischer Studien wider [176,177]. Es scheint zwar möglich, eine Down-Regulation in normalem umgebenden Nebennierengewebe durch Vorbehandlung mit Dexamethason erzielen zu können und somit die Hintergrundaktivität durch Bindung der Substanz an CYP11B1 einzudämmen; Ob sich dies allerdings in ACA ähnlich verhält, ist aufgrund der bereits 1999 vorgeschriebenen niedrigen Expression des ACTH-Rezeptors in ACA unklar [178]. Eine CXCR4-gerichtete PET-Bildgebung könnte somit eine vielversprechende Alternative darstellen.

Eine erste Anwendung des  $^{68}\text{Ga}$ -Pentixafor-PET erbrachte bei 9 Patienten mit PA vielversprechende Ergebnisse. Bei allen untersuchten Patienten war ein fokaler  $^{68}\text{Ga}$ -Pentixafor-Uptake in der Nebennierenraumforderung mit einem  $\text{SUV}_{\text{max}}$  zwischen 4,7 und 18,3 (Mittelwert: 10,7) nachweisbar, wohingegen der mittlere  $\text{SUV}_{\text{max}}$  in Kontrollen 3,3 betrug. Der  $^{68}\text{Ga}$ -Pentixafor-Uptake in APA zeigte sowohl verglichen mit der kontralateralen Nebenniere als auch mit Kontrollen signifikant höhere Werte. In einem einzigen Fall wurde durch das  $^{68}\text{Ga}$ -Pentixafor-PET ein Tumor nicht identifiziert. Hier betrug die Größe des Tumors nur 6 mm. Dies weist auf eine erschwerte Identifikation kleiner Tumore bedingt durch eine limitierte räumliche Auflösung hin. Im Gegensatz hierzu

konnte bei 2 Patienten mittels <sup>68</sup>Ga-Pentixafor-PET ein Tumor lokalisiert werden, bei denen dies mittels NNVK nicht möglich war.

Zukünftig wäre beispielsweise eine Kombination aus initialer Steroidanalytik mit Bestimmung von 18-Oxocortisol und 18-Hydroxycortisol zur Identifikation von Patienten mit APA und KCNJ5-Mutation und anschließender funktioneller Bildgebung mittels <sup>68</sup>Ga-Pentixafor-PET als nicht-invasive Diagnostik bei einem Teil der Patienten mit PA denkbar [61-63]. Es bliebe einzig die Untergruppe der Patienten mit APA und niedriger CXCR4-Expression übrig (29 %), welche weiterhin eine Lokalisationsdiagnostik mittels NNVK benötigen würden. 96 % der EIA zeigten eine schwache bis gar keine Färbung für CXCR4, sodass kein Uptake von <sup>68</sup>Ga-Pentixafor *in vivo* zu erwarten wäre, was ebenfalls einen Vorteil gegenüber des <sup>11</sup>C-Metomidate-PET darstellen könnte. Allerdings ist eine geringe Rate an falsch-positiven Ergebnissen bei Patienten mit EIA zu erwarten, da in unserer Analyse 4 % der EIA eine hohe CXCR4-Expression aufwiesen. Da allerdings auch Nebennierenkarzinome mit einer erhöhten CXCR4-Expression einhergehen, könnte in einem derartigen Fall eher die Entscheidung zur Adrenalektomie getroffen werden. Dies bedarf allerdings genauerer Betrachtung im Rahmen einer klinischen Studie mit höherer Patientenzahl.

## **5.5 Limitationen**

### *5.5.1 Evaluation der Strahlenbelastung bei Nebennierenvenenkathetern*

In Bezug auf die Analyse der Strahlenbelastung von NNVK sind mögliche Einschränkungen der Arbeit zu nennen: Die erfassten NNVK erfolgten nicht nach einem standardisierten Untersuchungsprotokoll, weshalb ein Bias grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden kann. Aufgrund des retrospektiven Studiendesigns war es außerdem nicht möglich, vollständige Informationen hinsichtlich der Umstände des NNVK zu erlangen, die über den radiologischen Befund hinausgingen (z. B. Schwierigkeit der Untersuchung, Anzahl der Kanülierungsversuche der rechten Nebennierenvene). Des Weiteren wurde der Body-Mass-Index (BMI), der beispielsweise in einer Publikation zur Strahlenbelastung bei Pulmonalvenenisolationen einen Einfluss auf das DFP hatte, nicht erfasst [179]. Dass die große Variabilität der Strahlenbelastung

zwischen den einzelnen Zentren hauptsächlich auf einer ungleichmäßigen Verteilung des BMI beruht, ist allerdings nicht anzunehmen.

Hinsichtlich der Unterschiede in DFP, ED und DLZ innerhalb der verschiedenen Jahre, ist zu berücksichtigen, dass die Datensammlung an den einzelnen Zentren zu unterschiedlichen Zeiten begonnen wurde (Berlin: 2008, Leipzig: 1999, München: 2009, Würzburg: 2005). Die signifikant höheren Werte für NNVK zwischen 1999 und 2008 (n=39) und 2009 verglichen mit den folgenden Jahren können zu einem kleineren Teil auf im zeitlichen Verlauf verbesserte Werte (z. B. aufgrund zunehmender Erfahrung) an zwei Zentren und hauptsächlich auf das Fehlen von Daten aus München zurückgeführt werden (<2009: n=0, 2009: n=2).

Abschließend ist auch zu bedenken, dass diese Auswertung an Referenzzentren für NNVK durchgeführt wurde, an denen die Prävalenz des PA deutlich höher ist im Vergleich zu weniger spezialisierten Zentren. Es ist davon auszugehen, dass diese Untersuchung auch an kleineren Zentren mit weniger Expertise vorgenommen wird, was eine weitere Erhöhung der Strahlenbelastung bedingen könnte.

#### *5.5.2 <sup>68</sup>Ga-Pentixafor-PET bei primärem Hyperaldosteronismus*

Während das <sup>68</sup>Ga-Pentixafor-PET zwar ein vielversprechendes neues diagnostisches Tool bei PA darstellt, ist dies dennoch mit Limitationen verbunden: Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte keine standardisierte klinische Studie hinsichtlich des Speicherverhaltens von <sup>68</sup>Ga-Pentixafor an gesunden Personen. Stattdessen wurden als Kontrollgruppe Daten einer Patientenkohorte mit malignen Grunderkrankungen genutzt, die diese Bildgebung aus anderen klinischen Gründen erhalten hatten. Nach aktuellem Stand ist unklar, ob eine begleitende Chemotherapie eine Alteration der CXCR4-Expression insbesondere in der Nebenniere zur Folge hat. Eine Subgruppenanalyse der 3 Patientengruppen, die nach verschiedenen Therapieregimen behandelt wurden, zeigte allerdings keine Unterschiede hinsichtlich der SUV<sub>max</sub>-Werte. Außerdem kann, trotz unauffälliger Nebennierenmorphologie in der konventionellen Bildgebung, das Vorliegen einzelner CXCR4-positiver Mikrometastasen nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Ein Grundproblem der funktionellen Bildgebung bei PA liegt in der Größe der zu erwartenden Nebennierenraumforderungen. Zahlreiche APA überschreiten eine

Größe von 1 cm nicht, was generell die Sensitivität eines PET-basierten Verfahrens aufgrund der räumlichen Auflösung einschränkt [180]. Die Expression von CXCR4 in der normalen Nebenniere und die entsprechende Tracerbindung im Rahmen der Diagnostik kann die Sensitivität der Detektion insbesondere kleinerer APA reduzieren. Außerdem ist die Anzahl der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten zu gering, um eine endgültige Aussage hinsichtlich der diagnostischen Performance des <sup>68</sup>Ga-Pentixafor-PET bei PA treffen zu können. Aufgrund der Anzahl an APA, die eine immunhistochemisch niedrige CXCR4-Expression aufwiesen, ist nicht zu erwarten, dass das <sup>68</sup>Ga-Pentixafor den NNVK zur Subtyppendifferenzierung bei PA gänzlich ersetzen kann, weshalb eine kleine selektierte Untergruppe an Patienten diese Untersuchung weiterhin benötigen wird.

## **5.6 Ausblick**

Auf der Basis dieser Arbeit ergeben sich weitere interessante Fragestellungen: Hinsichtlich der Strahlenbelastung bei NNVK ergeben sich, wie bereits erwähnt, verschiedene Implikationen für die klinische Praxis (z. B. Standardisierung der Untersuchungsprotokolle, Verzicht auf DSA, Reduktion der Entnahmeorte). Hier bleibt abzuwarten, ob diese umsetzbar sein werden und tatsächlich zu einer Reduktion der Strahlenexposition führen. Außerdem wäre ein Vergleich zwischen kleineren und zusätzlichen großen Zentren, sowie zwischen verschiedenen Ländern, perspektivisch ebenfalls interessant.

Die genaue Rolle der CXCR4/CXCL12/CXCR7-Achse in der normalen Nebennierenphysiologie ist bisher gänzlich unbekannt. Im Rahmen funktioneller Analysen kann diese in Zukunft näher beleuchtet werden.

Bereits jetzt ist mit <sup>68</sup>Ga-Pentixafor ein Tracer verfügbar, der potentiell bei Patienten, die den NNVK ablehnen, bei denen ein NNVK nicht aussagekräftig war und/oder eine Nebennierenraumforderung > 1 cm aufweisen, im Einzelfall diagnostisch eingesetzt werden könnte. Zur endgültigen Beurteilung des diagnostischen Potentials des <sup>68</sup>Ga-Pentixafor-PET im Vergleich zum NNVK ist eine prospektive klinische Studie nötig.

## 6. Zusammenfassung

Der erste Teil dieser Arbeit widmet sich der Einschätzung der Strahlenbelastung durch den Nebennierenvenenkatheter, die bis dato keiner systematischen Evaluation unterzogen wurde. Dies erfolgte in einer multizentrischen, deutschlandweiten, retrospektiven Studie. Hauptergebnis ist der Nachweis einer hohen Strahlenexposition durch den Nebennierenvenenkatheter, welche eine deutliche Variabilität innerhalb der beteiligten Zentren aufwies. Diese war insbesondere durch unterschiedliche Untersuchungsbedingungen und –protokolle an den jeweiligen Zentren bedingt, sowie abhängig von der Erfahrung des Radiologen. Auch konnte gezeigt werden, dass sich die Rate bilateral erfolgreicher Katheter in Zentren mit standardmäßiger Cortisolschnellmessung zur Überprüfung der korrekten Katheterlage deutlich höher darstellte und ihrerseits nicht mit einer Erhöhung der Strahlendosis verknüpft war. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass es für die Durchführung des Nebennierenvenenkatheters eines erfahrenen Radiologen bedarf, allerdings zentrumsabhängig deutliche Möglichkeiten der Verbesserung zu Reduktion der Strahlenexposition von Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus bestehen. Außerdem sollte einerseits die Strahlenbelastung, der Patienten im Rahmen dieser Untersuchung ausgesetzt werden, bedacht werden, wenn Patienten zum Nebennierenvenenkatheter überwiesen werden, andererseits aber auch ein einheitliches Protokoll zur Reduktion vermeidbarer Strahlenbelastung etabliert werden.

Aufgrund der vielfältigen Nachteile der aktuellen Lokalisationsdiagnostik mittels Nebennierenvenenkatheter bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus, sind Alternativen zu dieser Untersuchungsmethode klinisch von hoher Relevanz. Vor diesem Hintergrund erfolgte im zweiten Teil dieser Arbeit die Analyse verschiedener Chemokinrezeptoren. Chemokine sind kleine sekretorische Peptide, die an der gerichteten Migration von Zellen im Rahmen physiologischer Prozesse beteiligt sind. Die vorliegende Arbeit beschreibt zum ersten Mal das Vorhandensein verschiedener Chemokinrezeptoren in der Nebenniere. Speziell zeigte sich in immunhistochemischen Untersuchungen eine charakteristische Expression von CXCR4 und dem dazugehörigen Liganden CXCL12 innerhalb der normalen Nebenniere. Während CXCR4

insbesondere in den subcorticalen, äußeren Schichten der Nebenniere vorzufinden war, war für CXCL12 ein hierzu komplementäres Expressionsmuster insbesondere in den inneren Schichten der Nebenniere nachweisbar. Da vor allem die Aldosteron-produzierenden Zellen der *Zona glomerulosa* Positivität für CXCR4 zeigten, stellte sich anschließend die Frage, ob dementsprechend auch Aldosteron-produzierende Adenome eine hohe CXCR4-Expression aufweisen. Dem wurde durch weitere immunhistochemische Untersuchungen von CXCR4, CYP11B1 und CYP11B2 in Aldosteron-produzierenden, Cortisol-produzierenden und endokrin-inaktiven Nebennierenadenomen weiter nachgegangen. Hier ließ sich eine signifikant höhere CXCR4-Expression in Aldosteron-produzierenden Adenomen, verglichen mit Cortisol-produzierenden ( $p < 0,001$ ) und insbesondere endokrin inaktiven Adenomen ( $p < 0,001$ ), nachweisen.

Auf Basis dieser Ergebnisse erfolgte im nächsten Schritt eine erste Evaluation der Bindung des bereits etablierten CXCR4-spezifischen PET-Tracers <sup>68</sup>Ga-Pentixafor als mögliches neues differentialdiagnostisches Tool. *Ex vivo* zeigte sich, passend zu den Ergebnissen der Immunhistochemie, eine deutliche Bindung des Tracers an die Randzone der normalen Nebenniere, aber auch an Aldosteron-produzierende Adenome und Nebennierenkarzinome, wohingegen keine Anreicherung des Tracers in endokrin-inaktiven Adenomen detektierbar war. Erste Versuche der diagnostischen Anwendung von <sup>68</sup>Ga-Pentixafor-Bildgebung bei 9 Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus zeigten eine deutliche Speicherung des Tracers in den jeweiligen Nebennierentumoren, sowohl verglichen mit der kontralateralen Nebenniere als auch mit Kontrollen, die auf Grund anderer Tumorerkrankung eine <sup>68</sup>Ga-Pentixafor-Bildgebung erhalten hatten. Auf Basis dieser Ergebnisse stellt die CXCR4-spezifische PET-Bildgebung einen vielversprechenden Ansatz in der Lokalisationsdiagnostik des primären Hyperaldosteronismus dar, deren diagnostisches Potential im Vergleich zum Nebennierenvenenkatheter im Rahmen einer klinischen Studie prospektiv evaluiert werden wird.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009.
2. Benninghoff A, Drenckhahn D, Waschke J. *Taschenlehrbuch Anatomie*. München: Elsevier Urban & Fischer; 2008.
3. Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine reviews*. 2004;25(6):947-970.
4. Kühnel W. *Taschenatlas Histologie*. 12 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2008.
5. Schiebler TH. *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. 9 ed. Berlin: Springer Medizin; 2005.
6. Ulfing N. *Kurzlehrbuch Histologie*. 4 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2015.
7. Ross IL, Louw GJ. Embryological and molecular development of the adrenal glands. *Clinical anatomy (New York, NY)*. 2015;28(2):235-242.
8. Sadler TW. *Medizinische Embryologie*. 11 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2008.
9. Behrends JCB, Josef; Deutzmann,Rainer; Ehmke,Heimo; Frings,Stephan; Grissmer,Stephan; Hoth,Markus; Kurtz,Armin; Leipziger,Jens; Müller,Frank; Pedain,Claudia; Rettig,Jens; Wagner,Charlotte; Wischmeyer,Erhard. *Duale Reihe Physiologie*. 3 ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2017.
10. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. *Duale Reihe Biochemie*. 3 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012.
11. Silbernagl S, Despopoulos A. *Taschenatlas Physiologie*. 8 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012.
12. Löffler G, Petrides PE. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9 ed. Berlin Heidelberg: Springer; 2014.
13. Curnow KM, Tusie-Luna MT, Pascoe L, Natarajan R, Gu JL, Nadler JL, White PC. The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone

- biosynthesis in the human adrenal cortex. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 1991;5(10):1513-1522.
14. Miller WL. Steroidogenic enzymes. *Endocrine development*. 2008;13:1-18.
  15. Gekle MW, Erhard; Gründer, Stefan; Petersen, Marlen; Schwab, Albrecht; Markwardt, Fritz; Klöcker, Nikolaj; Pape, Hans-Christian; Baumann, Rosemarie; Marti, Hugo. *Taschenlehrbuch Physiologie*. 2 ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2015.
  16. Papadimitriou A, Priftis KN. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16(5):265-271.
  17. Williams GH. Aldosterone biosynthesis, regulation, and classical mechanism of action. *Heart failure reviews*. 2005;10(1):7-13.
  18. Stowasser M. Primary aldosteronism in 2011: Towards a better understanding of causation and consequences. *Nature reviews Endocrinology*. 2012;8(2):70-72.
  19. Rossi GP, Bernini G, Caliumi C, Desideri G, Fabris B, Ferri C, Ganzaroli C, Giacchetti G, Letizia C, Maccario M, Mallamaci F, Mannelli M, Mattarello MJ, Moretti A, Palumbo G, Parenti G, Porteri E, Semplicini A, Rizzoni D, Rossi E, Boscaro M, Pessina AC, Mantero F. A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(11):2293-2300.
  20. Conn JW, Louis LH. Primary aldosteronism, a new clinical entity. *Annals of internal medicine*. 1956;44(1):1-15.
  21. Rossi GP, Seccia TM, Pessina AC. Primary aldosteronism: part II: subtype differentiation and treatment. *Journal of nephrology*. 2008;21(4):455-462.
  22. Schirpenbach C, Segmiller F, Diederich S, Hahner S, Lorenz R, Rump LC, Seufert J, Quinkler M, Bidlingmaier M, Beuschlein F, Endres S, Reincke M. The diagnosis and treatment of primary hyperaldosteronism in Germany: results on 555 patients from the German Conn Registry. *Deutsches Arzteblatt international*. 2009;106(18):305-311.
  23. Reincke M, Seiler L, Rump LC. Normokaliämischer primärer Hyperaldosteronismus. *Dtsch Arztebl International*. 2003;100(4):A-184.

24. Born-Frontsberg E, Quinkler M. Conn-Syndrom. *Der Internist*. 2009;50(1):17-26.
25. Beuschlein F, Boulkroun S, Osswald A, Wieland T, Nielsen HN, Lichtenauer UD, Penton D, Schack VR, Amar L, Fischer E, Walther A, Tauber P, Schwarzmayer T, Diener S, Graf E, Allolio B, Samson-Couterie B, Benecke A, Quinkler M, Fallo F, Plouin PF, Mantero F, Meitinger T, Mulatero P, Jeunemaitre X, Warth R, Vilsen B, Zennaro MC, Strom TM, Reincke M. Somatic mutations in ATP1A1 and ATP2B3 lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension. *Nature genetics*. 2013;45(4):440-444, 444e441-442.
26. Azizan EA, Poulsen H, Tuluc P, Zhou J, Clausen MV, Lieb A, Maniero C, Garg S, Bochukova EG, Zhao W, Shaikh LH, Brighton CA, Teo AE, Davenport AP, Dekkers T, Tops B, Kusters B, Ceral J, Yeo GS, Neogi SG, McFarlane I, Rosenfeld N, Marass F, Hadfield J, Margas W, Chaggar K, Solar M, Deinum J, Dolphin AC, Farooqi IS, Striessnig J, Nissen P, Brown MJ. Somatic mutations in ATP1A1 and CACNA1D underlie a common subtype of adrenal hypertension. *Nature genetics*. 2013;45(9):1055-1060.
27. Schulte HMA, B. (Hrsg.). *Praktische Endokrinologie*. 2 ed. München: Elsevier; 2010.
28. Thomas RM, Ruel E, Shantavasinkul PC, Corsino L. Endocrine hypertension: An overview on the current etiopathogenesis and management options. *World journal of hypertension*. 2015;5(2):14-27.
29. Monticone S, D'Ascenzo F, Moretti C, Williams TA, Veglio F, Gaita F, Mulatero P. Cardiovascular events and target organ damage in primary aldosteronism compared with essential hypertension: a systematic review and meta-analysis. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2018;6(1):41-50.
30. Born-Frontsberg E, Reincke M, Rump LC, Hahner S, Diederich S, Lorenz R, Allolio B, Seufert J, Schirpenbach C, Beuschlein F, Bidlingmaier M, Endres S, Quinkler M. Cardiovascular and cerebrovascular comorbidities of hypokalemic and normokalemic primary aldosteronism: results of the German Conn's Registry. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(4):1125-1130.

31. Rossi GP, Sacchetto A, Visentin P, Canali C, Graniero GR, Palatini P, Pessina AC. Changes in left ventricular anatomy and function in hypertension and primary aldosteronism. *Hypertension*. 1996;27(5):1039-1045.
32. Rossi GP, Cesari M, Cuspidi C, Maiolino G, Cicala MV, Bisogni V, Mantero F, Pessina AC. Long-term control of arterial hypertension and regression of left ventricular hypertrophy with treatment of primary aldosteronism. *Hypertension*. 2013;62(1):62-69.
33. Rossi GP, Maiolino G, Flego A, Belfiore A, Bernini G, Fabris B, Ferri C, Giacchetti G, Letizia C, Maccario M, Mallamaci F, Muiesan ML, Mannelli M, Negro A, Palumbo G, Parenti G, Rossi E, Mantero F. Adrenalectomy Lowers Incident Atrial Fibrillation in Primary Aldosteronism Patients at Long Term. *Hypertension*. 2018;71(4):585-591.
34. Rossi GP, Bernini G, Desideri G, Fabris B, Ferri C, Giacchetti G, Letizia C, Maccario M, Mannelli M, Matterello MJ, Montemurro D, Palumbo G, Rizzoni D, Rossi E, Pessina AC, Mantero F. Renal damage in primary aldosteronism: results of the PAPY Study. *Hypertension*. 2006;48(2):232-238.
35. Reincke M, Rump LC, Quinkler M, Hahner S, Diederich S, Lorenz R, Seufert J, Schirpenbach C, Beuschlein F, Bidlingmaier M, Meisinger C, Holle R, Endres S. Risk factors associated with a low glomerular filtration rate in primary aldosteronism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(3):869-875.
36. Hanslik G, Wallaschofski H, Dietz A, Riester A, Reincke M, Allolio B, Lang K, Quack I, Rump LC, Willenberg HS, Beuschlein F, Quinkler M, Hannemann A. Increased prevalence of diabetes mellitus and the metabolic syndrome in patients with primary aldosteronism of the German Conn's Registry. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2015;173(5):665-675.
37. Reincke M, Meisinger C, Holle R, Quinkler M, Hahner S, Beuschlein F, Bidlingmaier M, Seissler J, Endres S. Is primary aldosteronism associated with diabetes mellitus? Results of the German Conn's Registry. *Hormone and metabolic research = Hormon- und*

- Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2010;42(6):435-439.
38. Fallo F, Veglio F, Bertello C, Sonino N, Della Mea P, Ermani M, Rabbia F, Federspil G, Mulatero P. Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in primary aldosteronism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(2):454-459.
  39. Sonino N, Fallo F, Fava GA. Psychological aspects of primary aldosteronism. *Psychotherapy and psychosomatics*. 2006;75(5):327-330.
  40. Funder JW, Carey RM, Mantero F, Murad MH, Reincke M, Shibata H, Stowasser M, Young WF, Jr. The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2016;101(5):1889-1916.
  41. Fernandes-Rosa FL, Williams TA, Riester A, Steichen O, Beuschlein F, Boulkroun S, Strom TM, Monticone S, Amar L, Meatchi T, Mantero F, Cicala M-V, Quinkler M, Fallo F, Allolio B, Bernini G, Maccario M, Giacchetti G, Jeunemaitre X, Mulatero P, Reincke M, Zennaro M-C. Genetic Spectrum and Clinical Correlates of Somatic Mutations in Aldosterone-Producing Adenoma - Novelty and Significance. *Hypertension*. 2014;64(2):354-361.
  42. Monticone S, Buffolo F, Tetti M, Veglio F, Pasini B, Mulatero P. GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: The expanding genetic horizon of primary aldosteronism. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2018;178(3):R101-r111.
  43. Mulatero P, Dluhy RG, Giacchetti G, Boscaro M, Veglio F, Stewart PM. Diagnosis of primary aldosteronism: from screening to subtype differentiation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2005;16(3):114-119.
  44. Kloos RT, Gross MD, Francis IR, Korobkin M, Shapiro B. Incidentally discovered adrenal masses. *Endocrine reviews*. 1995;16(4):460-484.
  45. Stewart PM, Allolio B. Adrenal vein sampling for Primary Aldosteronism: time for a reality check. *Clinical endocrinology*. 2010;72(2):146-148.
  46. Lim V, Guo Q, Grant CS, Thompson GB, Richards ML, Farley DR, Young WF, Jr. Accuracy of adrenal imaging and adrenal venous

- sampling in predicting surgical cure of primary aldosteronism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(8):2712-2719.
47. Dekkers T, Prejbisz A, Kool LJ, Groenewoud HJ, Velema M, Spiering W, Kolodziejczyk-Kruk S, Arntz M, Kadziela J, Langenhuijsen JF, Kerstens MN, van den Meiracker AH, van den Born BJ, Sweep FC, Hermus AR, Januszewicz A, Ligthart-Naber AF, Makai P, van der Wilt GJ, Lenders JW, Deinum J. Adrenal vein sampling versus CT scan to determine treatment in primary aldosteronism: an outcome-based randomised diagnostic trial. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2016;4(9):739-746.
  48. Kempers MJ, Lenders JW, van Outheusden L, van der Wilt GJ, Schultze Kool LJ, Hermus AR, Deinum J. Systematic review: diagnostic procedures to differentiate unilateral from bilateral adrenal abnormality in primary aldosteronism. *Annals of internal medicine*. 2009;151(5):329-337.
  49. Daunt N. Adrenal vein sampling: how to make it quick, easy, and successful. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*. 2005;25 Suppl 1:S143-158.
  50. Vonend O, Ockenfels N, Gao X, Allolio B, Lang K, Mai K, Quack I, Saleh A, Degenhart C, Seufert J, Seiler L, Beuschlein F, Quinkler M, Podrabsky P, Bidlingmaier M, Lorenz R, Reincke M, Rump LC. Adrenal venous sampling: evaluation of the German Conn's registry. *Hypertension*. 2011;57(5):990-995.
  51. Betz MJ, Degenhart C, Fischer E, Pallauf A, Brand V, Linsenmaier U, Beuschlein F, Bidlingmaier M, Reincke M. Adrenal vein sampling using rapid cortisol assays in primary aldosteronism is useful in centers with low success rates. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2011;165(2):301-306.
  52. Rossi GP, Funder JW. Adrenal Venous Sampling Versus Computed Tomographic Scan to Determine Treatment in Primary Aldosteronism (The SPARTACUS Trial): A Critique. *Hypertension*. 2017;69(3):396-397.
  53. Beuschlein F, Mulatero P, Asbach E, Monticone S, Catena C, Sechi LA, Stowasser M. The SPARTACUS Trial: Controversies and Unresolved Issues. *Hormone and metabolic research = Hormon- und*

- Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2017;49(12):936-942.
54. Williams TA, Lenders JWM, Mulatero P, Burrello J, Rottenkolber M, Adolf C, Satoh F, Amar L, Quinkler M, Deinum J, Beuschlein F, Kitamoto KK, Pham U, Morimoto R, Umakoshi H, Prejbisz A, Kocjan T, Naruse M, Stowasser M, Nishikawa T, Young WF, Jr., Gomez-Sanchez CE, Funder JW, Reincke M. Outcomes after adrenalectomy for unilateral primary aldosteronism: an international consensus on outcome measures and analysis of remission rates in an international cohort. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2017;5(9):689-699.
  55. Rossi GP, Funder JW. Adrenal Vein Sampling Is the Preferred Method to Select Patients With Primary Aldosteronism for Adrenalectomy: Pro Side of the Argument. *Hypertension*. 2018;71(1):5-9.
  56. Riester A, Fischer E, Degenhart C, Reiser MF, Bidlingmaier M, Beuschlein F, Reincke M, Quinkler M. Age below 40 or a recently proposed clinical prediction score cannot bypass adrenal venous sampling in primary aldosteronism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(6):E1035-1039.
  57. Mulatero P, Bertello C, Rossato D, Mengozzi G, Milan A, Garrone C, Giraud G, Passarino G, Garabello D, Verhovez A, Rabbia F, Veglio F. Roles of clinical criteria, computed tomography scan, and adrenal vein sampling in differential diagnosis of primary aldosteronism subtypes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(4):1366-1371.
  58. Venos ES, So B, Dias VC, Harvey A, Pasiaka JL, Kline GA. A clinical prediction score for diagnosing unilateral primary aldosteronism may not be generalizable. *BMC endocrine disorders*. 2014;14:94.
  59. Sze WC, Soh LM, Lau JH, Reznik R, Sahdev A, Matson M, Riddoch F, Carpenter R, Berney D, Grossman AB, Chew SL, Akker SA, Druce MR, Waterhouse M, Monson JP, Drake WM. Diagnosing unilateral primary aldosteronism - comparison of a clinical prediction score, computed tomography and adrenal venous sampling. *Clinical endocrinology*. 2014;81(1):25-30.
  60. Kupers EM, Amar L, Raynaud A, Plouin PF, Steichen O. A clinical prediction score to diagnose unilateral primary aldosteronism. *The*

- Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2012;97(10):3530-3537.
61. Williams TA, Peitzsch M, Dietz AS, Dekkers T, Bidlingmaier M, Riester A, Treitl M, Rhayem Y, Beuschlein F, Lenders JW, Deinum J, Eisenhofer G, Reincke M. Genotype-Specific Steroid Profiles Associated With Aldosterone-Producing Adenomas. *Hypertension.* 2016;67(1):139-145.
  62. Eisenhofer G, Dekkers T, Peitzsch M, Dietz AS, Bidlingmaier M, Treitl M, Williams TA, Bornstein SR, Haase M, Rump LC, Willenberg HS, Beuschlein F, Deinum J, Lenders JW, Reincke M. Mass Spectrometry-Based Adrenal and Peripheral Venous Steroid Profiling for Subtyping Primary Aldosteronism. *Clinical chemistry.* 2016;62(3):514-524.
  63. Mulatero P, di Cella SM, Monticone S, Schiavone D, Manzo M, Mengozzi G, Rabbia F, Terzolo M, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE, Veglio F. 18-hydroxycorticosterone, 18-hydroxycortisol, and 18-oxocortisol in the diagnosis of primary aldosteronism and its subtypes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2012;97(3):881-889.
  64. Sarkar SD, Cohen EL, Beierwaltes WH, Ice RD, Cooper R, Gold EN. A new and superior adrenal imaging agent, 131I-6beta-iodomethyl-19-norcholesterol (NP-59): evaluation in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 1977;45(2):353-362.
  65. Hogan MJ, McRae J, Schambelan M, Biglieri EG. Location of aldosterone-producing adenomas with 131I-19-iodocholesterol. *The New England journal of medicine.* 1976;294(8):410-414.
  66. Nomura K, Kusakabe K, Maki M, Ito Y, Aiba M, Demura H. Iodomethylnorcholesterol uptake in an aldosteronoma shown by dexamethasone-suppression scintigraphy: relationship to adenoma size and functional activity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 1990;71(4):825-830.
  67. Mansoor GA, Malchoff CD, Arici MH, Karimeddini MK, Whalen GF. Unilateral adrenal hyperplasia causing primary aldosteronism: limitations of I-131 norcholesterol scanning. *American journal of hypertension.* 2002;15(5):459-464.

68. Hahner S, Stuermer A, Kreissl M, Reiners C, Fassnacht M, Haenscheid H, Beuschlein F, Zink M, Lang K, Allolio B, Schirbel A. [123 I]Iodometomidate for molecular imaging of adrenocortical cytochrome P450 family 11B enzymes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(6):2358-2365.
69. Powlson AS, Gurnell M, Brown MJ. Nuclear imaging in the diagnosis of primary aldosteronism. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2015;22(3):150-156.
70. Burton TJ, Mackenzie IS, Balan K, Koo B, Bird N, Soloviev DV, Azizan EA, Aigbirhio F, Gurnell M, Brown MJ. Evaluation of the sensitivity and specificity of (11)C-metomidate positron emission tomography (PET)-CT for lateralizing aldosterone secretion by Conn's adenomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(1):100-109.
71. Abe T, Naruse M, Young WF, Jr., Kobashi N, Doi Y, Izawa A, Akama K, Okumura Y, Ikenaga M, Kimura H, Saji H, Mukai K, Matsumoto H. A Novel CYP11B2-Specific Imaging Agent for Detection of Unilateral Subtypes of Primary Aldosteronism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2016;101(3):1008-1015.
72. Parthasarathy HK, Menard J, White WB, Young WF, Jr., Williams GH, Williams B, Ruilope LM, McInnes GT, Connell JM, MacDonald TM. A double-blind, randomized study comparing the antihypertensive effect of eplerenone and spironolactone in patients with hypertension and evidence of primary aldosteronism. *Journal of hypertension*. 2011;29(5):980-990.
73. Hundemer GL, Curhan GC, Yozamp N, Wang M, Vaidya A. Cardiometabolic outcomes and mortality in medically treated primary aldosteronism: a retrospective cohort study. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2018;6(1):51-59.
74. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(7):540-550.
75. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annual review of immunology*. 2000;18:217-242.

76. Bachelierie F, Graham GJ, Locati M, Mantovani A, Murphy PM, Nibbs R, Rot A, Sozzani S, Thelen M. New nomenclature for atypical chemokine receptors. *Nature immunology*. 2014;15(3):207-208.
77. Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends in immunology*. 2004;25(2):75-84.
78. Schluger NW, Rom WN. Early responses to infection: chemokines as mediators of inflammation. *Current opinion in immunology*. 1997;9(4):504-508.
79. Daniel D, Rossel M, Seki T, Konig N. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) expression in embryonic mouse cerebral cortex starts in the intermediate zone close to the pallial-subpallial boundary and extends progressively towards the cortical hem. *Gene expression patterns : GEP*. 2005;5(3):317-322.
80. Stumm RK, Zhou C, Ara T, Lazarini F, Dubois-Dalcq M, Nagasawa T, Holtt V, Schulz S. CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(12):5123-5130.
81. Stumm R, Kolodziej A, Schulz S, Kohtz JD, Holtt V. Patterns of SDF-1alpha and SDF-1gamma mRNAs, migration pathways, and phenotypes of CXCR4-expressing neurons in the developing rat telencephalon. *The Journal of comparative neurology*. 2007;502(3):382-399.
82. Ding L, Morrison SJ. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*. 2013;495(7440):231-235.
83. Greenbaum A, Hsu YM, Day RB, Schuettpelz LG, Christopher MJ, Borgerding JN, Nagasawa T, Link DC. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature*. 2013;495(7440):227-230.
84. Strieter RM, Poverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(45):27348-27357.

85. Li DW, Liu ZQ, Wei J, Liu Y, Hu LS. Contribution of endothelial progenitor cells to neovascularization (Review). *International journal of molecular medicine*. 2012;30(5):1000-1006.
86. Moschetta M, Mishima Y, Sahin I, Manier S, Glavey S, Vacca A, Rocco AM, Ghobrial IM. Role of endothelial progenitor cells in cancer progression. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1846(1):26-39.
87. Schmidt A, Brixius K, Bloch W. Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis. *Circulation research*. 2007;101(2):125-136.
88. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001;410(6824):50-56.
89. Wang J, Knaut H. Chemokine signaling in development and disease. *Development*. 2014;141(22):4199-4205.
90. Nibbs RJ, Graham GJ. Immune regulation by atypical chemokine receptors. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(11):815-829.
91. Busillo JM, Benovic JL. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1768(4):952-963.
92. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(11):2927-2931.
93. Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Reza R, Wojakowski W, Ratajczak J. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia*. 2006;20(11):1915-1924.
94. Horuk R. Chemokine receptors. *Cytokine & growth factor reviews*. 2001;12(4):313-335.
95. Lazarini F, Tham TN, Casanova P, Arenzana-Seisdedos F, Dubois-Dalcq M. Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. *Glia*. 2003;42(2):139-148.
96. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*. 1998;393(6685):595-599.

97. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*. 1998;393(6685):591-594.
98. Mohle R, Failenschmid C, Bautz F, Kanz L. Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia*. 1999;13(12):1954-1959.
99. Barretina J, Junca J, Llano A, Gutierrez A, Flores A, Blanco J, Clotet B, Este JA. CXCR4 and SDF-1 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and stage of the disease. *Annals of hematology*. 2003;82(8):500-505.
100. Mohle R, Schittenhelm M, Failenschmid C, Bautz F, Kratz-Albers K, Serve H, Brugger W, Kanz L. Functional response of leukaemic blasts to stromal cell-derived factor-1 correlates with preferential expression of the chemokine receptor CXCR4 in acute myelomonocytic and lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology*. 2000;110(3):563-572.
101. Crazzolaro R, Kreczy A, Mann G, Heitger A, Eibl G, Fink FM, Mohle R, Meister B. High expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology*. 2001;115(3):545-553.
102. Weng AP, Shahsafaei A, Dorfman DM. CXCR4/CD184 immunoreactivity in T-cell non-Hodgkin lymphomas with an overall Th1- Th2+ immunophenotype. *American journal of clinical pathology*. 2003;119(3):424-430.
103. Peled A, Hardan I, Trakhtenbrot L, Gur E, Magid M, Darash-Yahana M, Cohen N, Grabovsky V, Franitza S, Kollet O, Lider O, Alon R, Rechavi G, Lapidot T. Immature leukemic CD34+CXCR4+ cells from CML patients have lower integrin-dependent migration and adhesion in response to the chemokine SDF-1. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2002;20(3):259-266.
104. Moller C, Stromberg T, Juremalm M, Nilsson K, Nilsson G. Expression and function of chemokine receptors in human multiple myeloma. *Leukemia*. 2003;17(1):203-210.

105. Geminder H, Sagi-Assif O, Goldberg L, Meshel T, Rechavi G, Witz IP, Ben-Baruch A. A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001;167(8):4747-4757.
106. Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer research*. 2002;62(24):7203-7206.
107. Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, Ida J, Tsuji S, Nakajima S, Kawaguchi M, Kobayashi H, Doi R, Hori T, Fujii N, Imamura M. Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(9):3530-3535.
108. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer research*. 2002;62(6):1832-1837.
109. Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer research*. 2003;63(13):3833-3839.
110. Bluemel C, Hahner S, Heinze B, Fassnacht M, Kroiss M, Bley TA, Wester HJ, Kropf S, Lapa C, Schirbel A, Buck AK, Herrmann K. Investigating the Chemokine Receptor 4 as Potential Theranostic Target in Adrenocortical Cancer Patients. *Clinical nuclear medicine*. 2017;42(1):e29-e34.
111. Chifu I, Fuss CT, Ronchi C, Marienfeld K, Fassnacht M, Hahner S, Heinze B. Impact of the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 on metastatic potential and survival in adrenocortical carcinoma. *Endocrine Abstracts* 2016;41 EP 15.
112. Weiss ID, Huff LM, Evbuomwan MO, Xu X, Dang HD, Velez DS, Singh SP, Zhang HH, Gardina PJ, Lee JH, Lindenberg L, Myers TG, Paik CH, Schrupp DS, Pittaluga S, Choyke PL, Fojo T, Farber JM. Screening of cancer tissue arrays identifies CXCR4 on adrenocortical carcinoma:

- correlates with expression and quantification on metastases using (64)Cu-plerixafor PET. *Oncotarget*. 2017;8(43):73387-73406.
113. Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Seminars in cancer biology*. 2004;14(3):171-179.
  114. Scotton CJ, Wilson JL, Milliken D, Stamp G, Balkwill FR. Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors? *Cancer research*. 2001;61(13):4961-4965.
  115. Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, Bridger G, Balkwill FR. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer research*. 2002;62(20):5930-5938.
  116. Hwang JH, Hwang JH, Chung HK, Kim DW, Hwang ES, Suh JM, Kim H, You KH, Kwon OY, Ro HK, Jo DY, Shong M. CXC chemokine receptor 4 expression and function in human anaplastic thyroid cancer cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(1):408-416.
  117. Corcione A, Ottonello L, Tortolina G, Facchetti P, Airoidi I, Guglielmino R, Dadati P, Truini M, Sozzani S, Dallegri F, Pistoia V. Stromal cell-derived factor-1 as a chemoattractant for follicular center lymphoma B cells. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92(8):628-635.
  118. Zhou Y, Larsen PH, Hao C, Yong VW. CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(51):49481-49487.
  119. Barbero S, Bonavia R, Bajetto A, Porcile C, Pirani P, Ravetti JL, Zona GL, Spaziante R, Florio T, Schettini G. Stromal cell-derived factor 1alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. *Cancer research*. 2003;63(8):1969-1974.
  120. Kijima T, Maulik G, Ma PC, Tibaldi EV, Turner RE, Rollins B, Sattler M, Johnson BE, Salgia R. Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function, and signal transduction through CXCR4 and c-Kit in small cell lung cancer cells. *Cancer research*. 2002;62(21):6304-6311.
  121. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KYC, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F. The Chemokine SDF-1/CXCL12 Binds to and Signals through the Orphan Receptor

- RDC1 in T Lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(42):35760-35766.
122. Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(9):2201-2213.
  123. Abe P, Mueller W, Schutz D, MacKay F, Thelen M, Zhang P, Stumm R. CXCR7 prevents excessive CXCL12-mediated downregulation of CXCR4 in migrating cortical interneurons. *Development*. 2014;141(9):1857-1863.
  124. Thelen M, Thelen S. CXCR7, CXCR4 and CXCL12: An eccentric trio? *Journal of Neuroimmunology*. 2008;198(1):9-13.
  125. Luker KE, Gupta M, Steele JM, Foerster BR, Luker GD. Imaging ligand-dependent activation of CXCR7. *Neoplasia (New York, NY)*. 2009;11(10):1022-1035.
  126. Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleshwar H, Raz E, Zerwes HG, Rot A, Thelen M. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PloS one*. 2010;5(2):e9175.
  127. Hoffmann F, Muller W, Schutz D, Penfold ME, Wong YH, Schulz S, Stumm R. Rapid uptake and degradation of CXCL12 depend on CXCR7 carboxyl-terminal serine/threonine residues. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(34):28362-28377.
  128. Memi F, Abe P, Cariboni A, MacKay F, Parnavelas JG, Stumm R. CXC chemokine receptor 7 (CXCR7) affects the migration of GnRH neurons by regulating CXCL12 availability. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013;33(44):17527-17537.
  129. Weiss ID, Jacobson O. Molecular imaging of chemokine receptor CXCR4. *Theranostics*. 2013;3(1):76-84.
  130. Herrmann K, Lapa C, Wester HJ, Schottelius M, Schiepers C, Eberlein U, Bluemel C, Keller U, Knop S, Kropf S, Schirbel A, Buck AK, Lassmann M. Biodistribution and radiation dosimetry for the chemokine receptor

- CXCR4-targeting probe <sup>68</sup>Ga-pentixafor. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2015;56(3):410-416.
131. Gourni E, Demmer O, Schottelius M, D'Alessandria C, Schulz S, Dijkgraaf I, Schumacher U, Schwaiger M, Kessler H, Wester HJ. PET of CXCR4 expression by a (<sup>68</sup>Ga)-labeled highly specific targeted contrast agent. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2011;52(11):1803-1810.
  132. Demmer O, Dijkgraaf I, Schumacher U, Marinelli L, Cosconati S, Gourni E, Wester HJ, Kessler H. Design, synthesis, and functionalization of dimeric peptides targeting chemokine receptor CXCR4. *Journal of medicinal chemistry*. 2011;54(21):7648-7662.
  133. Demmer O, Gourni E, Schumacher U, Kessler H, Wester HJ. PET imaging of CXCR4 receptors in cancer by a new optimized ligand. *ChemMedChem*. 2011;6(10):1789-1791.
  134. Wester HJ, Keller U, Schottelius M, Beer A, Philipp-Abbrederis K, Hoffmann F, Simecek J, Gerngross C, Lassmann M, Herrmann K, Pellegata N, Rudelius M, Kessler H, Schwaiger M. Disclosing the CXCR4 expression in lymphoproliferative diseases by targeted molecular imaging. *Theranostics*. 2015;5(6):618-630.
  135. Lapa C, Kircher S, Schirbel A, Rosenwald A, Kropf S, Pelzer T, Walles T, Buck AK, Weber WA, Wester HJ, Herrmann K, Luckerath K. Targeting CXCR4 with [<sup>68</sup>Ga]Pentixafor: a suitable theranostic approach in pleural mesothelioma? *Oncotarget*. 2017;8(57):96732-96737.
  136. Li X, Heber D, Leike T, Beitzke D, Lu X, Zhang X, Wei Y, Mitterhauser M, Wadsak W, Kropf S, Wester HJ, Loewe C, Hacker M, Haug AR. [<sup>68</sup>Ga]Pentixafor-PET/MRI for the detection of Chemokine receptor 4 expression in atherosclerotic plaques. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2018;45(4):558-566.
  137. Reiter T, Kircher M, Schirbel A, Werner RA, Kropf S, Ertl G, Buck AK, Wester HJ, Bauer WR, Lapa C. Imaging of C-X-C Motif Chemokine Receptor CXCR4 Expression After Myocardial Infarction With [<sup>68</sup>Ga]Pentixafor-PET/CT in Correlation With Cardiac MRI. *JACC Cardiovascular imaging*. 2018.

138. Lapa C, Herrmann K, Schirbel A, Hanscheid H, Luckerath K, Schottelius M, Kircher M, Werner RA, Schreder M, Samnick S, Kropf S, Knop S, Buck AK, Einsele H, Wester HJ, Kortum KM. CXCR4-directed endoradiotherapy induces high response rates in extramedullary relapsed Multiple Myeloma. *Theranostics*. 2017;7(6):1589-1597.
139. Herrmann K, Schottelius M, Lapa C, Osl T, Poschenrieder A, Hanscheid H, Luckerath K, Schreder M, Bluemel C, Knott M, Keller U, Schirbel A, Samnick S, Lassmann M, Kropf S, Buck AK, Einsele H, Wester HJ, Knop S. First-in-Human Experience of CXCR4-Directed Endoradiotherapy with <sup>177</sup>Lu- and <sup>90</sup>Y-Labeled Pentixather in Advanced-Stage Multiple Myeloma with Extensive Intra- and Extramedullary Disease. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2016;57(2):248-251.
140. Philipp-Abbrederis K, Herrmann K, Knop S, Schottelius M, Eiber M, Luckerath K, Pietschmann E, Habringer S, Gerngross C, Franke K, Rudelius M, Schirbel A, Lapa C, Schwamborn K, Steidle S, Hartmann E, Rosenwald A, Kropf S, Beer AJ, Peschel C, Einsele H, Buck AK, Schwaiger M, Gotze K, Wester HJ, Keller U. In vivo molecular imaging of chemokine receptor CXCR4 expression in patients with advanced multiple myeloma. *EMBO molecular medicine*. 2015;7(4):477-487.
141. Stewart FA, Akleyev AV, Hauer-Jensen M, Hendry JH, Kleiman NJ, Macvittie TJ, Aleman BM, Edgar AB, Mabuchi K, Muirhead CR, Shore RE, Wallace WH. ICRP publication 118: ICRP statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs--threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. *Annals of the ICRP*. 2012;41(1-2):1-322.
142. Stecker MS, Balter S, Towbin RB, Miller DL, Vano E, Bartal G, Angle JF, Chao CP, Cohen AM, Dixon RG, Gross K, Hartnell GG, Schueler B, Statler JD, de Baere T, Cardella JF. Guidelines for patient radiation dose management. *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR*. 2009;20(7 Suppl):S263-273.
143. Brenner DJ, Doll R, Goodhead DT, Hall EJ, Land CE, Little JB, Lubin JH, Preston DL, Preston RJ, Puskin JS, Ron E, Sachs RK, Samet JM, Setlow RB, Zaider M. Cancer risks attributable to low doses of ionizing

- radiation: assessing what we really know. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(24):13761-13766.
144. Pierce DA, Preston DL. Radiation-related cancer risks at low doses among atomic bomb survivors. *Radiation research*. 2000;154(2):178-186.
  145. Brenner DJ, Hall EJ. Computed tomography--an increasing source of radiation exposure. *The New England journal of medicine*. 2007;357(22):2277-2284.
  146. Hendee WR, O'Connor MK. Radiation Risks of Medical Imaging: Separating Fact from Fantasy. *Radiology*. 2012;264(2):312-321.
  147. Strahlenschutz Bf. Diagnostische Referenzwerte für diagnostische und interventionelle Röntgenanwendungen. 2016.
  148. Funder JW, Carey RM, Fardella C, Gomez-Sanchez CE, Mantero F, Stowasser M, Young WF, Jr., Montori VM. Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(9):3266-3281.
  149. Le Heron JC. Estimation of effective dose to the patient during medical x-ray examinations from measurements of the dose-area product. *Physics in medicine and biology*. 1992;37(11):2117-2126.
  150. Mühlhardt C. *Der Experimentator - Molekularbiologie/Genomics*. 7 ed.
  151. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR methods and applications*. 1995;4(6):357-362.
  152. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001;29(9):e45.
  153. Ronchi CL, Sbiera S, Altieri B, Steinhauer S, Wild V, Bekteshi M, Kroiss M, Fassnacht M, Allolio B. Notch1 pathway in adrenocortical carcinomas: correlations with clinical outcome. *Endocrine-related cancer*. 2015;22(4):531-543.

154. Martin R, Juttler S, Muller M, Wester HJ. Cationic eluate pretreatment for automated synthesis of [(6)(8)Ga]CPCR4.2. *Nuclear medicine and biology*. 2014;41(1):84-89.
155. Loening AM, Gambhir SS. AMIDE: a free software tool for multimodality medical image analysis. *Molecular imaging*. 2003;2(3):131-137.
156. Mettler FA, Jr., Huda W, Yoshizumi TT, Mahesh M. Effective doses in radiology and diagnostic nuclear medicine: a catalog. *Radiology*. 2008;248(1):254-263.
157. Mettler FA, Jr., Bhargavan M, Faulkner K, Gilley DB, Gray JE, Ibbott GS, Lipoti JA, Mahesh M, McCrohan JL, Stabin MG, Thomadsen BR, Yoshizumi TT. Radiologic and nuclear medicine studies in the United States and worldwide: frequency, radiation dose, and comparison with other radiation sources--1950-2007. *Radiology*. 2009;253(2):520-531.
158. Page MM, Taranto M, Ramsay D, van Schie G, Glendenning P, Gillett MJ, Vasikaran SD. Improved technical success and radiation safety of adrenal vein sampling using rapid, semi-quantitative point-of-care cortisol measurement. *Annals of clinical biochemistry*. 2018;4563218760352.
159. Kim KP, Miller DL, Balter S, Kleinerman RA, Linet MS, Kwon D, Simon SL. Occupational radiation doses to operators performing cardiac catheterization procedures. *Health physics*. 2008;94(3):211-227.
160. Miller DL, Vano E, Bartal G, Balter S, Dixon R, Padovani R, Schueler B, Cardella JF, de Baere T. Occupational radiation protection in interventional radiology: a joint guideline of the Cardiovascular and Interventional Radiology Society of Europe and the Society of Interventional Radiology. *Cardiovascular and interventional radiology*. 2010;33(2):230-239.
161. Lang K, Weber K, Quinkler M, Dietz AS, Wallaschofski H, Hannemann A, Friedrichs N, Rump LC, Heinze B, Fuss CT, Quack I, Willenberg HS, Reincke M, Allolio B, Hahner S. Prevalence of Malignancies in Patients With Primary Aldosteronism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2016;101(4):1656-1663.
162. Xing Y, Lerario AM, Rainey W, Hammer GD. Development of adrenal cortex zonation. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2015;44(2):243-274.

163. Salmon TN, Zwemer RL. A study of the life history of cortico-adrenal gland cells of the rat by means of trypan blue injections. *The Anatomical Record*. 1941;80(4):421-429.
164. Freedman BD, Kempna PB, Carlone DL, Shah M, Guagliardo NA, Barrett PQ, Gomez-Sanchez CE, Majzoub JA, Breault DT. Adrenocortical zonation results from lineage conversion of differentiated zona glomerulosa cells. *Developmental cell*. 2013;26(6):666-673.
165. Zlotnik A, Burkhardt AM, Homey B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(9):597-606.
166. Haegel S, Einer C, Thiele S, Mueller W, Nietzsche S, Lupp A, Mackay F, Schulz S, Stumm R. CXC chemokine receptor 7 (CXCR7) regulates CXCR4 protein expression and capillary tuft development in mouse kidney. *PloS one*. 2012;7(8):e42814.
167. Coggins NL, Trakimas D, Chang SL, Ehrlich A, Ray P, Luker KE, Linderman JJ, Luker GD. CXCR7 Controls Competition for Recruitment of  $\beta$ -Arrestin 2 in Cells Expressing Both CXCR4 and CXCR7. *PloS one*. 2014;9(6):e98328.
168. Gomez-Sanchez CE, Qi X, Velarde-Miranda C, Plonczynski MW, Parker CR, Rainey W, Satoh F, Maekawa T, Nakamura Y, Sasano H, Gomez-Sanchez EP. Development of Monoclonal Antibodies against Human CYP11B1 and CYP11B2. *Molecular and cellular endocrinology*. 2014;383(0):111-117.
169. Aiba M, Fujibayashi M. Alteration of Subcapsular Adrenocortical Zonation in Humans with Aging: The Progenitor Zone Predominates over the Previously Well-Developed Zona Glomerulosa after 40 Years of Age. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2011;59(5):557-564.
170. Seccia TM, Fassina A, Nussdorfer GG, Pessina AC, Rossi GP. Aldosterone-producing adrenocortical carcinoma: an unusual cause of Conn's syndrome with an ominous clinical course. *Endocrine-related cancer*. 2005;12(1):149-159.
171. Abiven G, Coste J, Groussin L, Anract P, Tissier F, Legmann P, Dousset B, Bertagna X, Bertherat J. Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting

- tumors in a series of 202 consecutive patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(7):2650-2655.
172. Monticone S, Castellano I, Versace K, Lucatello B, Veglio F, Gomez-Sanchez CE, Williams TA, Mulatero P. Immunohistochemical, genetic and clinical characterization of sporadic aldosterone-producing adenomas. *Molecular and cellular endocrinology*. 2015;411:146-154.
  173. Weickert MO, Schofl-Siegert B, Arafat AM, Pfeiffer AF, Mohlig M, Schofl C. A reverse postural test as a screening tool for aldosterone-producing adenoma: a pilot study. *Endocrine*. 2009;36(1):75-82.
  174. Lau JH, Sze WC, Reznek RH, Matson M, Sahdev A, Carpenter R, Berney DM, Akker SA, Chew SL, Grossman AB, Monson JP, Drake WM. A prospective evaluation of postural stimulation testing, computed tomography and adrenal vein sampling in the differential diagnosis of primary aldosteronism. *Clinical endocrinology*. 2012;76(2):182-188.
  175. Metser U, Miller E, Lerman H, Lievshitz G, Avital S, Even-Sapir E. 18F-FDG PET/CT in the evaluation of adrenal masses. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2006;47(1):32-37.
  176. Hahner S, Kreissl MC, Fassnacht M, Haenscheid H, Bock S, Verburg FA, Knoedler P, Lang K, Reiners C, Buck AK, Allolio B, Schirbel A. Functional characterization of adrenal lesions using [123I]IMTO-SPECT/CT. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(4):1508-1518.
  177. Hennings J, Lindhe O, Bergstrom M, Langstrom B, Sundin A, Hellman P. [11C]metomidate positron emission tomography of adrenocortical tumors in correlation with histopathological findings. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(4):1410-1414.
  178. Reincke M, Beuschlein F, Latronico AC, Arlt W, Chrousos GP, Allolio B. Expression of adrenocorticotrophic hormone receptor mRNA in human adrenocortical neoplasms: correlation with P450scc expression. *Clinical endocrinology*. 1997;46(5):619-626.
  179. Ector J, Dragusin O, Adriaenssens B, Huybrechts W, Willems R, Ector H, Heidbüchel H. Obesity Is a Major Determinant of Radiation Dose in

- Patients Undergoing Pulmonary Vein Isolation for Atrial Fibrillation.  
*Journal of the American College of Cardiology*. 2007;50(3):234-242.
180. Soret M, Bacharach SL, Buvat I. Partial-volume effect in PET tumor imaging. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2007;48(6):932-945.

## 8. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> HE-Färbung der Nebennierenrinde .....	2
<b>Abbildung 2:</b> Steroidhormonbiosynthese .....	4
<b>Abbildung 3:</b> Renin-Angiotensin-Aldosteron-System .....	5
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung der häufigsten Entitäten des primären Hyperaldosteronismus .....	7
<b>Abbildung 5:</b> Grundzüge des diagnostischen und therapeutischen Algorithmus bei primärem Hyperaldosteronismus .....	13
<b>Abbildung 6:</b> Übersicht über Funktionen von Chemokinen .....	14
<b>Abbildung 7:</b> Dosisflächenprodukt in Berlin, Leipzig, München und Würzburg. .....	34
<b>Abbildung 8:</b> Unterschiede des Dosisflächenprodukt zwischen verschiedenen Radiologen in Würzburg, sowie Anzahl durchgeführter Nebennierenvenenkatheter .....	35
<b>Abbildung 9:</b> Unterschiede in der Durchleuchtungszeit zwischen verschiedenen Radiologen in Würzburg, sowie Anzahl durchgeführter Nebennierenvenenkatheter .....	36
<b>Abbildung 10:</b> Durchleuchtungszeit in Berlin, Leipzig, München und Würzburg. .....	36
<b>Abbildung 11:</b> Dosisflächenprodukt im zeitlichen Verlauf.....	37
<b>Abbildung 12:</b> Durchleuchtungszeit im zeitlichen Verlauf.....	38
<b>Abbildung 13:</b> Chemokinrezeptor mRNA Expression in adrenocorticalen Adenomen .....	41
<b>Abbildung 14:</b> Repräsentative immunhistochemische Färbung für CXCR4, CXCL12, CYP11B1 und CYP11B2 der normalen Nebenniere .....	42
<b>Abbildung 15:</b> Repräsentative immunhistochemische Färbung für CXCR7 in der normalen Nebenniere .....	43
<b>Abbildung 16:</b> Repräsentative immunhistochemische Färbung eines Aldosteron-produzierenden Adenoms für CXCR4, CYP11B1 und CYP11B2 .....	44
<b>Abbildung 17:</b> Repräsentative immunhistochemische Färbung eines Cortisol- produzierenden Adenoms für CXCR4, CYP11B1 und CYP11B2 .....	44

<b>Abbildung 18:</b> Repräsentative immunhistochemische Färbung für CXCR4, CXCL12 und CYP11B2 .....	44
<b>Abbildung 19:</b> CXCR4 und CYP11B2 in zwei Aldosteron-produzierenden Adenomen .....	45
<b>Abbildung 20:</b> Verhältnis zwischen CXCR4 und CYP11B2 in Aldosteron-produzierenden Adenomen .....	46
<b>Abbildung 21:</b> Bindungsstudie mit <sup>68</sup> Ga-Pentixafor an Kryogewebe von normaler Nebenniere, Aldosteron-produzierenden Adenomen, Nebennierenkarzinom und endokrin-inaktiven Adenomen .....	48
<b>Abbildung 22:</b> A: Maximum standardized uptake values für <sup>68</sup> Ga-Pentixafor in normalen Nebennieren, verglichen mit Patienten mit Aldosteron-produzierenden Adenomen. B: Receiver Operating Characteristic Analyse der SUVmax – Werte von Kontrollen und Aldosteron-produzierenden Adenomen .....	52
<b>Abbildung 23:</b> <sup>68</sup> Ga-Pentixafor-PET/CT einer Patientin mit Aldosteron-produzierendem Adenom .....	52
<b>Abbildung 24:</b> <sup>68</sup> Ga-Pentixafor-PET/CT eines Patienten mit Aldosteron-produzierendem Adenom .....	53
<b>Abbildung 25:</b> <sup>68</sup> Ga-Pentixafor-PET/MRT einer Patientin mit Aldosteron-produzierendem Adenom .....	53

## 9. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Übersicht häufiger Mutationen in sporadischen Aldosteron- produzierenden Adenomen .....	7
<b>Tabelle 2:</b> Referenzwerte des Bundesamtes für Strahlenschutz für ausgewählte radiologische Untersuchungen in cGy cm <sup>2</sup> .....	17
<b>Tabelle 3:</b> Geräte .....	22
<b>Tabelle 4:</b> Verbrauchsmaterialien .....	22
<b>Tabelle 5:</b> Puffer, Lösungen und Reagenzien .....	23
<b>Tabelle 6:</b> Kits .....	23
<b>Tabelle 7:</b> Röntgenanlagen der teilnehmenden Zentren .....	24
<b>Tabelle 8:</b> Ansatz qRT-PCR pro Well .....	26
<b>Tabelle 9:</b> Spezifische Taqman Genexpression-Assays .....	27
<b>Tabelle 10:</b> Programmierung des Thermocyclers .....	27
<b>Tabelle 11:</b> Auflistung der zur Immunhistochemie verwendeten Antikörper und Verdünnungen .....	28
<b>Tabelle 12:</b> Allgemeine Daten zu Alter, Geschlecht, Cortisol-Schnellmessung und Erfolg der Kanülierung .....	33
<b>Tabelle 13:</b> Dosisflächenprodukt, effektive Dosis und Durchleuchtungszeit an beteiligten Zentren .....	34
<b>Tabelle 14:</b> Übersicht der Untersuchungsmodalitäten der teilnehmenden Zentren .....	39
<b>Tabelle 15:</b> Übersicht des Dosisflächenproduktes an verschiedenen Röntgenanlagen in München .....	39
<b>Tabelle 16:</b> H-score der CXCR4-Membranexpression in Nebennierenadenomen .....	46
<b>Tabelle 17:</b> H-score der CXCR4-Membranexpression in der anhängenden Nebenniere verschiedener Nebennierenadenome .....	46
<b>Tabelle 18:</b> Klinische Daten der Patienten mit Aldosteron-produzierenden Adenomen nach CXCR4-Expression .....	47
<b>Tabelle 19:</b> Klinische Daten der mit 68Ga-Pentixafor untersuchten Patienten.. .....	51

## 10. Abkürzungsverzeichnis

A./Aa.	Arteria/Arteriae
ACA	Adrenocorticales Adenom
ACE	Angiotensin-converting Enzym
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
APA	Aldosteron-produzierendes Adenom
ARQ	Aldosteron-Renin-Quotient
aNN	anhängende Nebenniere
BAH	Bilaterale Hyperplasie
CPA	Cortisol-produzierendes Adenom
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CT	Computertomographie
CYP11B1	11 $\beta$ -Hydroxylase
CYP11B2	Aldosteronsynthase
CXCL12	Chemokinligand 12 (C-X-C Motif)
CXCR4	C-X-C Chemokinrezeptor 4
DFP	Dosisflächenprodukt
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DLZ	Durchleuchtungszeit
DSA	Digitale Subtraktions-Angiographie
ED	Effektive Dosis
EIA	Endokrin-inaktives Adenom
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
Min	Minuten
MRT	Magnetresonanztomographie
MSH	Melanozytenstimulierendes Hormon
nNN	normale Nebenniere
NNVK	Nebennierenvenenkatheter
PA	Primärer Hyperaldosteronismus
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
POMC	Proopiomelanocortin

qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROC	Receiver Operating Characteristic
ROI	region of interest
Sec	Sekunden
SD	Standardabweichung
SDF	Stromal cell derived factor
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
StAR	steroidogenic acute regulatory protein
SUV <sub>max</sub>	maximum standardized uptake values
u.a.	unter anderem
V./Vv.	Vena/Venae
vs.	versus

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle Frau Prof. Dr. S. Hahner. Ich möchte mich für die Möglichkeit der Erstellung einer Doktorarbeit auf dem Gebiet der Endokrinologie, die exzellente Betreuung, die intensive Zusammenarbeit und die spannenden Diskussionen bedanken. Vor allem aber bin ich dankbar für meine weitere Förderung und ihre Vorbildfunktion über die Doktorarbeit hinaus.

Desweiteren danke ich herzlich dem gesamten Team des endokrinologischen Forschungslabors, vor allem Dr. B. Heinze, K. Marienfeld und M. Zink für die sehr gute Einarbeitung und Unterstützung in experimentellen Fragen.

Ein großer Dank geht auch an die Kollegen der Nuklearmedizin, insbesondere Dr. A. Schirbel und Dr. C. Blümel für die Synthese des Radiotracers und die Befundung der Bildgebungen.

Mein Dank gilt außerdem den zahlreichen Kollaborationspartnern in Berlin, Essen, Hamburg, Leipzig, München, Mississippi und Turin, ohne deren Beitrag diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. M. Fassnacht und dem Team der endokrinologischen Ambulanz, für die angenehme Atmosphäre, gute Laune und die spürbare Begeisterung für das Fach.

Abschließend danke ich meinen Eltern für die uneingeschränkte Unterstützung, konstruktive Kritik und weisen Ratschläge bei all meinen Vorhaben.