

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I**

**der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. Stefan Frantz**

***In-vitro-* und *in-vivo*-Evaluation selektiver Aldosteronsynthese-Inhibitoren als radiofluor-  
orientierte Tracer für die Nebennierenbildung beim primären Hyperaldosteronismus**

**Inaugural – Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Samario Tobias Kripp**

**aus Tübingen**

**Würzburg, Februar 2020**

**Referentin:** Prof. Dr. med. Stefanie Hahner

**Koreferent:** Prof. Dr. med. Andreas Buck

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 25.08.2020

**Der Promovend ist Arzt**

Meinen Eltern und meinen Pateneltern

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Anatomie und Embryologie der Nebennieren .....	1
1.2	Physiologie der Nebennieren .....	2
1.2.1	Katecholaminsynthese .....	2
1.2.2	Steroidhormosynthese.....	3
1.2.3	Wirkung und Regulation der Glukokortikoide .....	4
1.2.4	Wirkung und Regulation der Mineralokortikoide .....	6
1.3	Primärer Hyperaldosteronismus .....	8
1.3.1	Historie und Klassifikation .....	8
1.3.2	Epidemiologie.....	9
1.3.3	Genexpression, Symptomatik und Pathogenese .....	10
1.3.4	Diagnostik und Subtypendifferenzierung .....	11
1.3.4.1	Nebennierenvenenkatheter .....	15
1.3.4.2	Spezifische Nebennierenbildung .....	16
1.3.5	Therapie .....	18
1.3.5.1	Selektive Aldosteronsynthese-Inhibitoren .....	19
2	Fragestellung und Ziel der Dissertation .....	21
3	Materialien .....	22
3.1	Geräte.....	22
3.2	Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Antikörper, Zelllinien und Tiermodelle .....	23
3.3	Aldosteronsynthese-Inhibitoren und Tracer .....	25
3.4	Kits.....	28
3.5	Verwendete Software.....	29
4	Methoden .....	30
4.1	Zellbiologische Verfahren .....	30
4.1.1	Y1-hsCYP11B1 und Y1-hsCYP11B2-Zelllinien (adhärent).....	30
4.1.2	NCI-H295-Zelllinien (Suspension).....	30
4.1.3	V79CYP11B1 und V79CYP11B2-Zelllinien (adhärent) .....	31
4.1.4	Vergleich der selektiven Inhibition der CYP11B1- und CYP11B2-Enzyme in den vorgestellten Zelllinien .....	31
4.1.4.1	Y1- und V79-Zelllinien.....	32
4.1.4.1	NCI-H295-Zelllinie .....	33

4.2	<i>In-vivo</i> -Experimente an teilhumanisierten Mäusen .....	33
4.3	Messen der Hormonkonzentrationen .....	34
4.3.1	Kortisol und Androstendion (Immulite) .....	34
4.3.2	Aldosteron, Kortikosteron und 17-OH-Progesteron (ELISA).....	35
4.1	Histologische Verfahren .....	35
4.1.1	Gefrierschnitte von humanem Gewebe.....	35
4.1.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbungen.....	36
4.1.3	CYP11B1- und CYP11B2-Immunhistochemie .....	36
4.1.3.1	Primärantikörper der University of Mississippi .....	37
4.1.3.2	Primärantikörper der Keio Universität Tokyo.....	38
4.1.4	Bindungsstudie an Gefrierschnitten.....	38
4.1.4.1	Substanz 3 und 4 .....	39
4.1.4.2	Substanz 5 .....	39
4.1.4.3	Substanz 10 .....	39
4.1.4.4	Substanz 11 .....	40
4.1.4.5	Auswertung der Imageplatte .....	40
5	Ergebnisse .....	41
5.1	Zellbiologische Verfahren .....	41
5.1.1	Effekte der Inhibitoren auf Y1-hsCYP11B1- und Y1-hsCYP11B2-Zellen .....	41
5.1.2	Effekte der Inhibitoren auf NCI-H295-Zellen .....	45
5.1.3	Effekte der Inhibitoren auf V79CYP11B1- und V79CYP11B2-Zellen .....	51
5.2	<i>In-vivo</i> -Experimente .....	53
5.2.1	Einfluss der KCl-Stimulation auf die Steroidhormonsynthese.....	53
5.2.2	Effekte der Inhibitoren auf die Steroidhormonsynthese im Vergleich .....	54
5.3	Histologische Verfahren .....	56
5.3.1	Ergebnisse der Bindungsstudien an Gefrierschnitten .....	60
6	Diskussion.....	62
7	Zusammenfassung.....	70
8	Anhang .....	72
8.1	Literaturverzeichnis .....	72

## Abkürzungsverzeichnis

<b>17-OH-Progesteron</b>	17-Hydroxy-Progesteron
<b>ACC</b>	Adrenokortikales Karzinom
<b>ACE</b>	Angiotensin-Converting-Enzym
<b>ACTH</b>	Adrenokortikotropes Hormon
<b>ADH</b>	Antidiuretisches Hormon
<b>AK</b>	Antikörper
<b>ANP</b>	Atriales natriuretisches Peptid
<b>APA</b>	Aldosteron produzierendes Adenom
<b>ARR</b>	Aldosteron-Renin-Ratio
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>AVS</b>	Adrenal Vein Sampling
<b>CPA</b>	Kortisol produzierendes Adenom
<b>CRH</b>	Kortikotropin-Releasing-Hormon
<b>CT</b>	Computer-Tomographie
<b>CXCR4</b>	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
<b>DAB</b>	3,3'-Diaminobenzidin
<b>DHEA</b>	Dehydroepiandrosteron
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<b>ENaC</b>	Epithelial Natrium Channel (Natriumkanal)
<b>FCS</b>	Fetales Kälberserum
<b>FDG</b>	Fluordesoxyglukose
<b>H.E.</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>HRP</b>	Horseradish-Peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
<b>i.v.</b>	Intravenös
<b>IHA</b>	Idiopathischer Hyperaldosteronismus
<b>IMTO</b>	Iodmetomidat
<b>LDL</b>	Low Density Lipoprotein
<b>MRA</b>	Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten

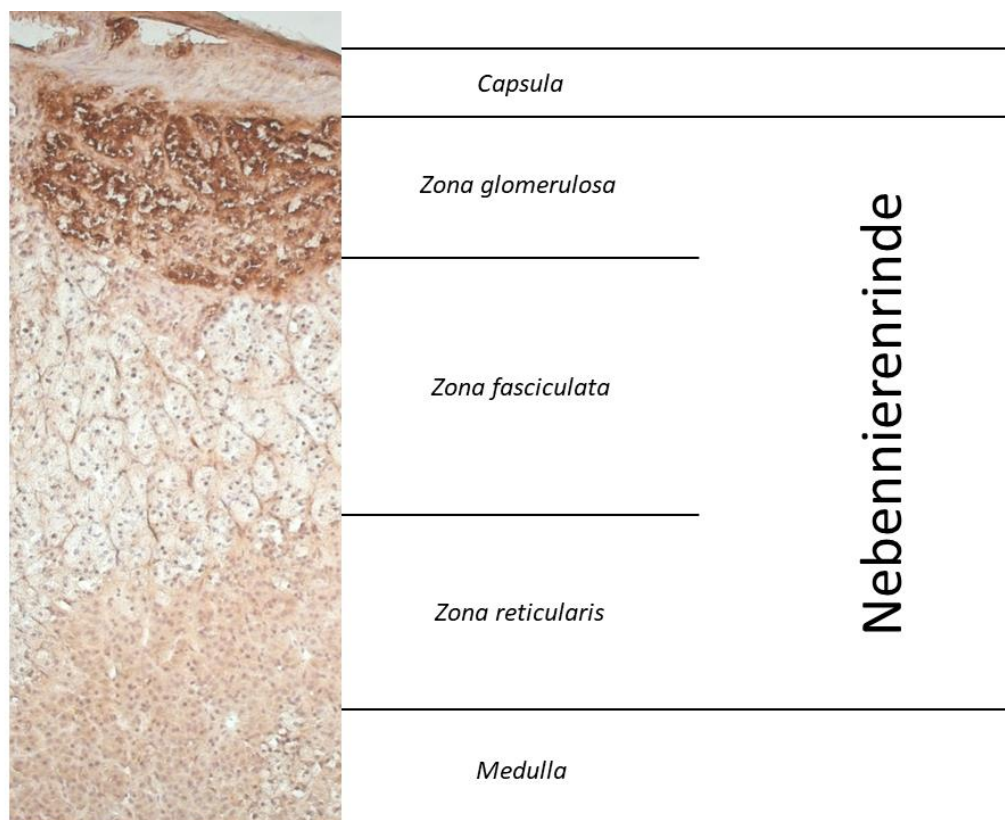
<b>MRT</b>	Magnet-Resonanz-Tomographie
<b>NN</b>	Nebenniere
<b>NNM</b>	Nebennierenmark
<b>nNN</b>	Normale (= gesunde) Nebenniere
<b>NNR</b>	Nebennierenrinde
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
<b>PET</b>	Positronen-Emissions-Tomographie
<b>PHA</b>	Primärer Hyperaldosteronismus
<b>RAAS</b>	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
<b>ROMK</b>	Renal Outer Medullary Potassium Channel (Kaliumkanal)
<b>SGK</b>	Serum- and glucocorticoid-inducible kinase
<b>SPECT</b>	Single-Photon-Emissions-Computed-Tomographie
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

## 1 Einleitung

### 1.1 Anatomie und Embryologie der Nebennieren

Für die Bildung der paarig vorliegenden Nebennieren (*Glandulae suprarenales*) zeigen sich sowohl Derivate des Ektoderms, als auch des Mesoderms verantwortlich. Während das spätere Nebennierenmark (*Medulla*) aus Zellen der Neuralleiste entsteht, entwickelt sich die Nebennierenrinde (*Kortex*) aus dem Seitenplattenmesoderm [1-3].

Die Nebennierenrinde umschließt das Mark vollständig und zeichnet sich durch eine gelbliche Farbe, bedingt durch einen hohen Lipidgehalt, aus. Sie lässt sich mikroskopisch in drei Schichten, die *Zonae glomerulosa*, *-fascicularis* und *-reticularis*, unterteilen. Der *Zona glomerulosa* liegt eine zarte fibröse Kapsel an, die wiederum die komplette Nebenniere umschließt [3-5].



**ABB. 1 HISTOLOGISCHER AUFBAU DER NEBENNIERE**

Eigene Darstellung; Beschriftung nach [3, 5, 6] CYP11B2 exprimierende Zellen wurden mittels Immunhistochemie dunkelbraun angefärbt (siehe Abschnitt 4.1.3). Normale Nebenniere.



# 1 Einleitung

Beide Nebennieren liegen retroperitoneal, jeweils auf dem apikalen Pol der Nieren, innerhalb der Capsula adiposa, die sowohl die Niere, als auch die Nebenniere umgibt. Sie haben eine Größe von jeweils ca.  $4 \times 4 \times 2 \text{ cm}^3$  und ein Gewicht von etwa 5 g. Trotz ihrer geringen Größe verfügen beide Nebennieren über eine ausgeprägte Blutversorgung, insgesamt drei Arterien bilden einen Gefäßplexus innerhalb der Kapsel, von dem feine Äste in das Organparenchym ziehen. Es handelt sich hierbei um die *Arteria suprarenalis superior*, die aus der *Arteria phrenica inferior* entspringt, die *Arteria suprarenalis media*, die direkt von der *Aorta abdominalis* abgeht und um die *Arteria suprarenalis inferior*, welche ein Ast der *Arteria renalis* ist. Zahlreiche sinusoidale Kapillaren ziehen von außen bis ins Nebennierenmark, mehrere Venen sammeln das Blut der Kapillaren und vereinigen sich zur *Vena suprarenalis*. Diese tritt am *Hilum* aus der Nebennierenkapsel und mündet auf der rechten Seite direkt in die *Vena cava inferior*, auf der linken Seite hingegen zunächst in die *Vena renalis sinistra* [1, 4, 6].

## 1.2 Physiologie der Nebennieren

Schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts erkannte man, dass die Nebennieren lebenswichtige Organe sind. Bei einseitiger Adrenalektomie hypertrophiert die verbliebene Nebenniere um den Funktionsverlust auszugleichen; eine beidseitige Entfernung ist ohne Hormonsubstitution nicht mit dem Leben vereinbar [7, 8].

### 1.2.1 Katecholaminsynthese

Das Nebennierenmark (NNM) besteht überwiegend aus modifizierten zweiten Sympathikusneuronen, den chromaffinen Zellen. In ihnen findet die Biosynthese der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin aus der gemeinsamen Vorstufe Tyrosin statt. Tyrosin wird über die Zwischenstufe L-DOPA in Dopamin umgewandelt, welches anschließend durch die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase zu Noradrenalin umgewandelt wird. Im Gegensatz zu den noradrenergen Neuronen werden im Nebennierenmark 80 % des Noradrenalins durch Methylierung zu Adrenalin umgewandelt. Adrenalin und Noradrenalin werden anschließend mit ATP in chromaffinen Granula gespeichert [1, 3, 5, 7].

Bei physischem und psychischem Stress wird im ZNS vermehrt Kortikotropin-Releasing-Hormon (CRH) sezerniert. CRH fördert über die Hypothalamus-Hypophysen-

# 1 Einleitung

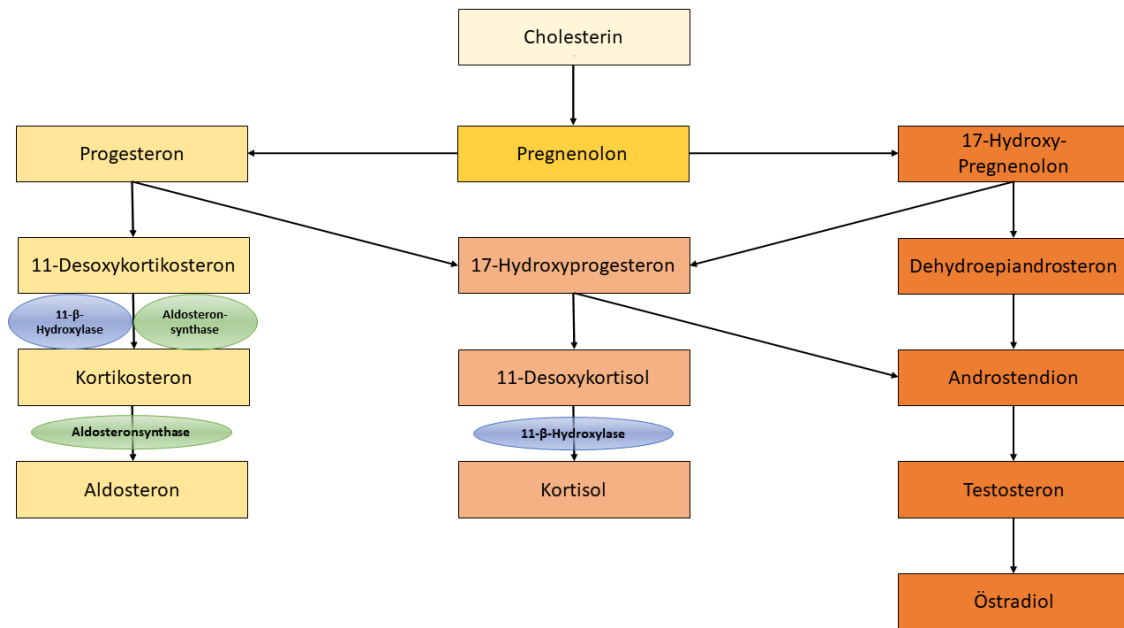
Nebennierenrinden-Achse die Ausschüttung von Kortisol und stimuliert direkt den Sympathikus. Das von den sympathischen Neuronen ausgeschüttete Acetylcholin fördert ebenso wie Kortisol die Transkription der an der Katecholaminsynthese beteiligten Enzyme. Dadurch wird insgesamt die Biosyntheseaktivität gesteigert [7, 9].

## 1.2.2 Steroidhormosynthese

Im Kortex der Nebennieren (NNR = Nebennierenrinde) findet die Biosynthese der Steroidhormone statt, deren gemeinsame Ausgangssubstanz Cholesterin ist. Der Großteil des Cholesterins für die Synthese stammt aus LDL (Low Density Lipoprotein), es wird aber auch teilweise vor Ort neu synthetisiert [7, 9].

Über das Enzym Cholesterin-Desmolase wird die Bindung zwischen C-20 und C-22 getrennt, es entsteht Pregnenolon. Pregnenolon ist das gemeinsame Prohormon aller Steroidhormone (siehe Abb. 2). Durch eine Vielzahl von Oxidationen und Hydroxylierungen entstehen aus Pregnenolon die verschiedenen Steroidhormone und ihre Zwischenstufen. Nahezu alle diese Reaktionen werden von Enzymen der Cytochrom P450-Familie katalysiert [7, 9]. Dabei erfolgt in den Mitochondrien die Reaktion von Desoxykortisol zu Kortisol mittels der 11 $\beta$ -Hydroxylase (CYP11B1), sowie die Umwandlung von Kortikosteron zu Aldosteron. Letztere wird ausschließlich von der Aldosteronsynthase (CYP11B2) katalysiert (vgl. Abb. 2) [9, 10]. Die histologische Schichteneinteilung der Nebennierenrinde (vgl. Abschnitt 1.1) korreliert auch mit deren Funktion. So werden in der äußersten Schicht, der *Zona glomerulosa*, die Mineralokortikoide gebildet, deren wichtigster Vertreter Aldosteron ist. Die Glukokortikoide mit dem wichtigsten Vertreter Kortisol werden hingegen hauptsächlich in der *Zona fasciculata* synthetisiert. In der innen liegenden *Zona reticularis* erfolgt dann vorwiegend die Bildung von Androgenen, insbesondere Androstendion und Dehydroepiandrosteron (DHEA) [7, 9]. In jüngeren Studien zeigte sich, dass bei erwachsenen Menschen die Aldosteron produzierenden Zellen zunehmend in Form einzelner Cluster vorliegen und nicht als kontinuierliche Zellschicht [11, 12].

# 1 Einleitung



**ABB. 2 ÜBERBLICK ÜBER DIE STEROIDHORMONSYNTHESE**

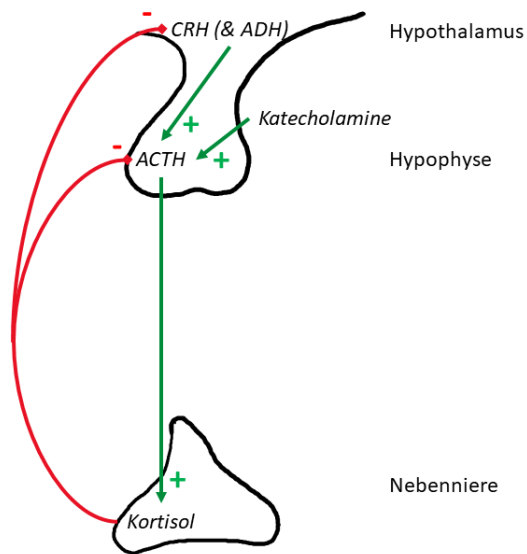
Eigene Darstellung nach [7, 9, 13]. Hervorgehoben sind die Aldosteronsynthase (CYP11B2) und die 11β-Hydroxylase (CYP11B1).

Da sich die Struktur aller Steroidhormone von Cholesterin ableitet, sind diese lipophil und können somit die Zellmembran überwinden. Intrazellulär bilden sie einen Komplex mit den passenden Rezeptoren und beeinflussen direkt im Zellkern die Transkription. Neben diesem langfristigen Effekt werden auch kurzfristige Effekte beobachtet, wie die direkte Aktivierung von Ionenkanälen und Kinasen, beispielsweise durch Aldosteron innerhalb weniger Minuten [9].

## 1.2.3 Wirkung und Regulation der Glukokortikoide

Die Biosynthese der Glukokortikoide, mit Kortisol als ihren wichtigsten Vertreter, unterliegt einer strengen Regulation über die Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenachse. Durch Ausschüttung von CRH (Kortikotropin-Releasing-Hormon) und auch ADH (Antidiuretisches Hormon) des Hypothalamus wird die Freisetzung von ACTH (Kortikotropin) aus dem Hypophysenvorderlappen stimuliert. ACTH hingegen fördert in der *Zona fasciculata* der Nebennierenrinde Synthese und Sekretion von Kortisol. Über einen negativen Feedback-Mechanismus hemmt das freigesetzte Kortisol wiederum die CRH- und ACTH-Sekretion in Hypothalamus und Hypophyse (siehe Abb. 3) [3, 7].

# 1 Einleitung



**ABB. 3 REGULATION DER KORTISOLSYNTHESE**

Eigene Darstellung nach [5, 7, 9] Die Ausschüttung von CRH stimuliert die ACTH-Sekretion, diese wiederum wirkt stimulierend auf die Kortisol-Sekretion. Über einen negativen Feedback-Mechanismus wird durch Kortisol die Ausschüttung von CRH und ACTH gehemmt. CRH = Kortikotropin-Releasing-Hormon, ADH = Antidiuretisches Hormon, ACTH = Adrenokortikotropes Hormon

CRH wird unter Stressfreiheit pulsatil ausgeschüttet, wobei in den frühen Morgenstunden die Puls-Amplitude am höchsten ist. Hierdurch variieren auch die Plasmakortisolspiegel, welche typischerweise in den frühen Morgenstunden am höchsten sind und im Laufe des Tages abnehmen. Unter körperlichen oder psychischem Stress wird die Kortisolausschüttung bis auf das Zehnfache gesteigert, u.a. durch den stimulierenden Einfluss der Katecholamine auf die ACTH-Sekretion der Hypophyse [5, 7, 9].

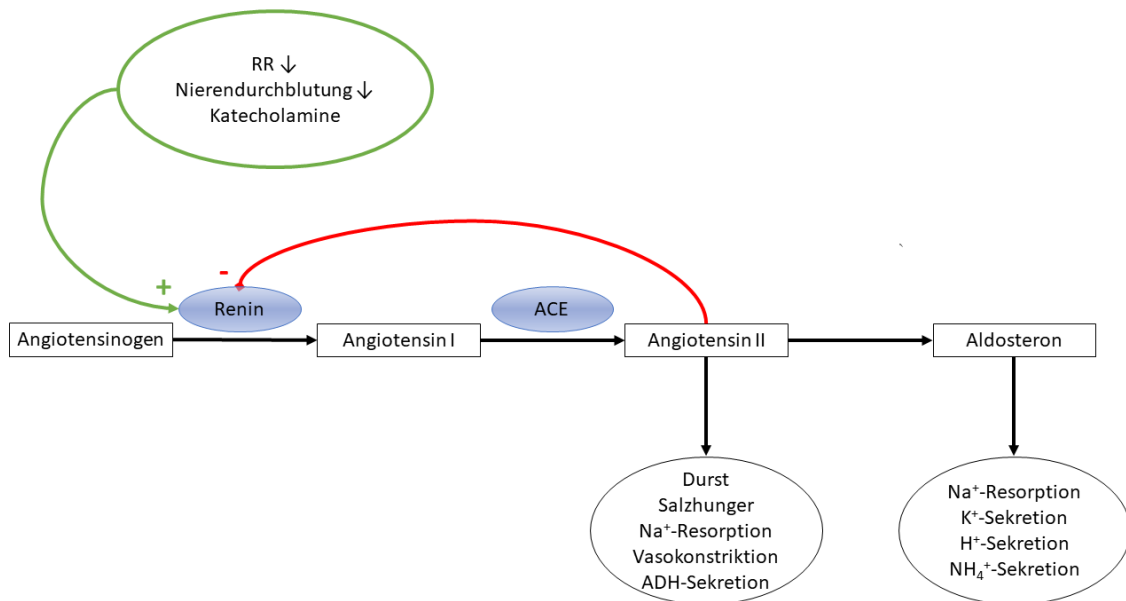
Im adulten Organismus wirkt Kortisol als „Stresshormon“, es bindet an intrazelluläre Rezeptoren (vgl. Abschnitt 1.2.2) und stimuliert oder inhibiert direkt im Zellkern die Transkription bestimmter Gene. Physiologisch wirken Glukokortikoide durch Hemmung der Proteinsynthese katabol, stimulieren die Lipolyse und die Glukoneogenese [7, 9]. Kortisol hat ebenfalls eine hohe Affinität zu Mineralokortikoidrezeptoren, wird jedoch unter physiologischen Kortisolspiegeln durch die  $11\beta$ -Dehydrogenase 2 in die inaktive Form Kortison umgewandelt, sodass die mineralokortikoide Wirkung von Kortisol vermindert ist. Bei langfristig erhöhten Kortisolspiegeln kommt es zu einer vermehrten

# 1 Einleitung

mineralokortikoiden Wirkung, sowie zu einer Umverteilung des peripheren Fettgewebes nach zentral und insgesamt zur Gewichtszunahme [7, 14, 15].

## 1.2.4 Wirkung und Regulation der Mineralokortikoide

Aldosteron ist der wichtigste Vertreter der Mineralokortikoide. Im Gegensatz zu der Kortisolsynthese wird die Aldosteronsynthese kaum über die Hypothalamus-Hypophyse-Nebennieren-Achse mittels ACTH gesteuert, sondern unterliegt hauptsächlich der Regulation durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) (siehe Abb. 4) [7, 10].



**ABB. 4 ÜBERSICHT ÜBER DAS RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEM**

Eigene Darstellung nach [7, 10, 13]. Angiotensin II wirkt inhibitorisch auf die Ausschüttung von Renin, welche durch Blutdruckabfall, geminderte Nierendurchblutung und Katecholamine stimuliert wird. RR = Blutdruck („Riva-Rocci“), ACE = Angiotensin-Converting-Enzyme, ADH = Anti-diuretisches Hormon

Renin wird in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere gebildet und fungiert als Protease, die aus Angiotensinogen das Angiotensin I abspaltet. Dieses wird durch eine weitere Protease, das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE), in Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II erhöht direkt das Extrazellulärvolumen indem es die Natrium-Resorption im proximalen Tubulus stimuliert und steigert durch Vasokonstriktion den

## 1 Einleitung

Blutdruck. Außerdem wird durch Angiotensin II die Aldosteron-Sekretion in der *Zona glomerulosa* der Nebennieren gefördert (siehe Abb. 4). Inhibiert wird die Aldosteronfreisetzung hingegen von einer niedrigen Kaliumkonzentration im Blut und durch das atriale natriuretische Peptid (ANP). ANP wird in den Vorhöfen des Herzens bei erhöhtem zentralvenösem Druck gebildet, hemmt neben der Aldosteron- auch die Renin-, ADH- und ACTH-Sekretion und wirkt gefäßerweiternd [1, 3, 5, 7].

Aldosteron wirkt als Steroidhormon über intrazelluläre Rezeptoren. Der Mineralokortikoidrezeptor bildet bei Bindung einen Komplex mit Aldosteron und diffundiert als solcher in den Zellkern, wo er als Transkriptionsfaktor wirkt. Diese „genomische Wirkung“ tritt erst nach einer Latenzzeit von etwa 30 bis 60 Minuten auf, da erst nach Beeinflussung der Transkription die veränderte Proteinsynthese erfolgt. Durch verstärkte Expression der serum- and glucocorticoide-inducible kinase (SGK) wird der Abbau der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, sowie von Natrium- (ENaC = Epithelial Natrium Channel) und Kaliumkanälen (ROMK = Renal Outer Medullary Potassium Channel) gehemmt. Zusätzlich wird die Synthese von ENaC, ROMK und der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase auch direkt durch Aldosteron gesteigert. Insgesamt führt die genomische Wirkung dadurch zu einer vermehrten Ausscheidung von Kaliumionen, während gleichzeitig die Natriumionenrückresorption gesteigert wird (vgl. Abb. 4). Die gesteigerte Resorption von  $\text{Na}^+$ -Ionen führt wiederum zu einer stärkeren Wasserresorption, wodurch das Plasmavolumen gesteigert wird. Durch eine ebenfalls vermehrte Expression und Einbau der  $\text{H}^+$ -ATPase kommt es außerdem zu einer gesteigerten Ausscheidung von Protonen und  $\text{NH}_4^+$  [7, 9, 16]. Neben der verzögerten, genomischen Wirkung von Aldosteron gibt es auch „nicht-genomische“ Mechanismen, die binnen weniger Minuten wirken. Durch vermehrte Phosphorylierung der genannten Ionentransportproteine wird auch kurzfristig die Resorption von  $\text{Na}^+$ - und Sekretion von  $\text{K}^+$ - und  $\text{H}^+$ -Ionen gesteigert [7, 9]. Aldosteronrezeptoren finden sich ebenfalls in Herz, Gefäßendothel und im ZNS. So steigert Aldosteron den Salzappetit und verstärkt das kardiale Remodeling, sprich eine Hypertrophie und Fibrose des Myokards. Im Gefäßsystem erhöht Aldosteron die Empfindlichkeit für Katecholamine, was zu einer Vasokonstriktion führt [7, 15, 17, 18].

Zusammengefasst hat Aldosteron eine blutdrucksteigernde Wirkung durch die vermehrte Resorption von Natriumionen und Wasser und die Sensibilisierung für Katecholamine.

## 1 Einleitung

Gleichzeitig wird durch Aldosteron auch die Ausscheidung von Kalium-ionen und Protonen gesteigert [7, 15].

### 1.3 Primärer Hyperaldosteronismus

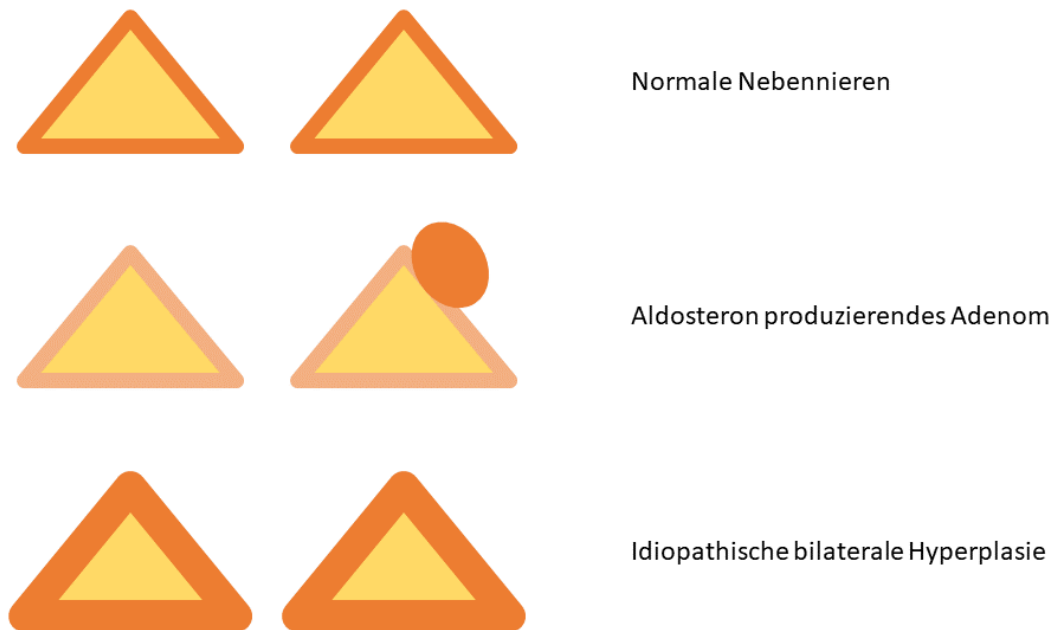
Zu den häufigsten Ursachen einer sekundären Hypertonie zählt der Hyperaldosteronismus [19]. Während der sekundäre Hyperaldosteronismus durch eine Überaktivierung des RAAS (vgl. Abb. 4), zum Beispiel im Rahmen einer Nierenarterienstenose oder chronischen Niereninsuffizienz zustande kommt, liegt beim primären Hyperaldosteronismus (PHA) eine autonome, vom RAAS entkoppelte, Aldosteronsekretion vor (vgl. Abschnitt 1.3.3) [14, 19].

#### 1.3.1 Historie und Klassifikation

Die erste Beschreibung des primären Hyperaldosteronismus stammt von dem amerikanischen Endokrinologen Jerome W. Conn, der 1955 von einer 34-jährigen Patientin berichtete, die unter einer ausgeprägten arteriellen Hypertonie, Muskelkrämpfen und Parästhesien litt. Conn gelang es, neben einer Hypernatriämie, Hypokaliämie und metabolischen Alkalose, eine erhöhte Aldosteron-Konzentration im Urin der Patientin festzustellen, weshalb er die Erkrankung als primären Hyperaldosteronismus bezeichnete. Als Ursache des erhöhten Aldosteronspiegels konnte ein Nebennierenadenom gefunden werden; später wurde dieses Krankheitsbild als Conn-Syndrom bekannt [20].

Als häufige Ursache des primären Hyperaldosteronismus kommt neben Aldosteron produzierenden Adenomen (APA) auch eine idiopathische bilaterale Hyperplasie der Nebennierenrinde (IHA = idiopathischer Hyperaldosteronismus) vor (siehe Abb. 5). Unterschieden werden weiter seltenere Ursachen, wie Aldosteron produzierende Karzinome, unilaterale Hyperplasien und der familiäre Hyperaldosteronismus. Beim familiären Hyperaldosteronismus werden drei verschiedene Typen unterschieden, die allesamt autosomal-dominant vererbt werden [10, 14, 21, 22].

# 1 Einleitung



**ABB. 5 SCHEMATISCHER VERGLEICH DER HÄUFIGEN URSACHEN EINES PHA**  
Eigene Darstellung. Aldosteron-produzierende Areale sind orange dargestellt.

Weiterhin werden normokaliämische und hypokaliämische Verläufe unterschieden. Insbesondere bei Aldosteron produzierenden Adenomen kommt es häufiger zur klassischen Conn-Trias aus Hypokaliämie, arterieller Hypertonie und metabolischer Alkalose; insgesamt sind aber normokaliämische Verläufe deutlich häufiger [10, 14, 23, 24].

## 1.3.2 Epidemiologie

Etwa jeder dritte Europäer leidet an arterieller Hypertonie. Mit zunehmendem Alter und Adipositas steigt die Prävalenz erheblich, durch die oft langjährige Symptombefreiheit gibt es zudem eine hohe Dunkelziffer an nicht-behandelten Hypertonikern [14, 15]. Circa 90 % aller Hypertoniker leiden an einer primären, „essentiellen“ Hypertonie, bei nur ca. 10 % der Betroffenen liegen der Hypertonie sekundäre Ursachen zugrunde, wie ein Schlafapnoe-Syndrom, eine renale oder endokrine Hypertonie oder auch eine Vaskulitis [14, 15]. Während die Rolle des primären Hyperaldosteronismus lange Zeit unterschätzt wurde, zeigte sich in den letzten Jahren, dass insbesondere die normokaliämische



# 1 Einleitung

Verlaufsform häufiger ist, als bisher angenommen. Aktuelle Schätzungen gehen von einer Prävalenz des normokaliämischen PHA von 5-10 % aller Hypertoniker aus. Somit ist der normokaliämische PHA die häufigste Ursache einer sekundären Hypertonie. Insbesondere bei therapierefraktärer Hypertonie, jungem Erkrankungsalter und sogenannten Non-Dippem (nächtlicher Blutdruckabfall um weniger als 10 %) sollte nach einer sekundären Hypertonieform gesucht werden [14, 25-27].

Häufigste Ursache eines primären Hyperaldosteronismus ist die idiopathische bilaterale Hyperplasie der Aldosteron-produzierenden Zellen der Nebennierenrinde (vgl. Abb. 5); sie liegt in etwa  $\frac{2}{3}$  der Fälle vor und verläuft meist milder. Bei etwa einem Drittel der Betroffenen liegt ein endokrin aktives Adenom der Nebennierenrinde vor (vgl. Abb. 5) [14, 15, 26, 27].

## 1.3.3 Genexpression, Symptomatik und Pathogenese

Die Aldosteronsynthase ist das Schlüsselenzym der Aldosteronproduktion (vgl. Abb. 2), sie wird ausschließlich in Aldosteron produzierenden Zellen exprimiert [7, 9, 11]. Eine deutlich gesteigerte Expression des für die Aldosteronsynthase codierenden CYP11B2-Gens (siehe Abschnitt 1.2.2), findet sich sowohl in Aldosteron sezernierenden Adenomen, als auch bei der idiopathischen Hyperplasie. Insbesondere beim APA findet sich meistens eine deutlich erhöhte CYP11B2-Expression, trotz dauerhaft erniedrigter Renin Spiegel. Da die kontralaterale Nebenniere beim APA weiterhin der Regulation durch das RAAS unterliegt (vgl. Abb. 4) wird die Expression der Aldosteronsynthase dort durch die kontinuierlich erhöhten Hormonspiegel supprimiert (siehe auch Abb. 5) [11, 12, 28-31].

In der ersten Beschreibung des PHA von Jerome Conn diagnostizierte dieser bei seiner 34-jährigen Patientin eine deutliche arterielle Hypertonie, Hypokaliämie und metabolische Alkalose. Die Patientin klagte über Muskelschwäche und periodische Spasmen der Hände und Parästhesien [20]. Diese Symptome und die sogenannte „Conn-Trias“, aus arterieller Hypertonie, Hypokaliämie und Hypernatriämie, lassen sich durch die Wirkung von Aldosteron erklären (siehe Abschnitt 1.2.4). Aldosteron erhöht den Blutdruck durch Erhöhung des Plasmavolumens und gesteigerte Katecholaminempfindlichkeit. Die Steigerung der Sekretion von Kalium und Protonen in den Urin führt wiederum zu

## 1 Einleitung

Hypokaliämie und zur metabolischen Alkalose. Typische Symptome einer Hypokaliämie sind Muskelschwäche und Adynamie, aber auch EKG-Veränderungen, Polyurie und Polydipsie. Durch den Verlust von Protonen steigt der pH-Wert, was zu Parästhesien, Muskelzittern und Tetanie führen kann [14, 15].

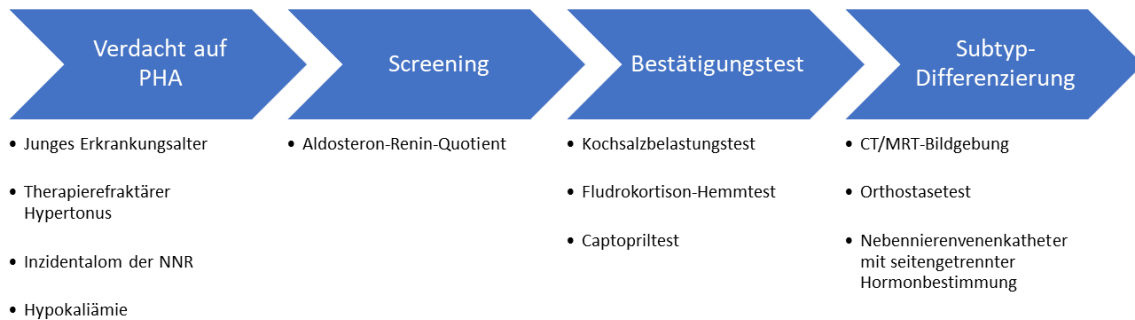
Patienten, die an einem primären Hyperaldosteronismus leiden, zeigen eine stärkere Morbidität als Vergleichsgruppen mit ähnlichen Blutdruckwerten, gleichem Alter und Geschlecht. Dies betrifft vor allem hypokaliämische PHA-Fälle, deren kardiovaskuläre Morbidität noch über der der normokaliämischen Patienten liegt [17, 32, 33]. Die Prävalenz kardiovaskulärer Komplikationen, wie Angina pectoris, Vorhofflimmern und Myokardinfarkte, lag in einer Studie des deutschen Conn-Registers bei hypokaliämischen PHA-Patienten bei 30,5 %, bei normokaliämischen hingegen bei 20,6 % [17]. Neben den kardiovaskulären Komplikationen ist bei PHA-Patienten auch die zerebrovaskuläre Morbidität erhöht, bei essenziellen Hypertonikern liegt die Prävalenz bei 3,4 %, während sie bei PHA-Patienten auf 12,9 % ansteigt [34]. Interessanterweise korrelieren hohe Aldosteronspiegel auch mit Auftreten und Schweregrad einer Schlafapnoe und Niereninsuffizienz [17, 34, 35]. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass unter gezielter Therapie des primären Hyperaldosteronismus (siehe Abschnitt 1.3.5) das kardiovaskuläre Risiko wieder auf das Niveau essentieller Hypertoniker sinkt [17, 32, 36].

### 1.3.4 Diagnostik und Subtypendifferenzierung

Insbesondere therapierefraktäre Verläufe und ein junges Erkrankungsalter sollten bei Hypertonikern an sekundäre Hypertonieformen denken lassen. Da der PHA eine der häufigsten Ursachen einer sekundären Hypertonie darstellt (siehe oben), sollte ein Screening stets auch die Bestimmung des Aldosteron-Renin-Quotienten umfassen (siehe unten). Weitere Indikationen für ein Screening auf PHA sind bekannte „Inzidentalome“ der Nebenniere, die bei ca. 3 % der 50-Jährigen vorliegen [37, 38] (siehe auch Abschnitt 1.3.4.2) und das Auftreten von arterieller Hypertonie oder Schlaganfällen bei nahen Verwandten vor dem 50. Lebensjahr [27, 39, 40]. Die früher häufig praktizierte Bestimmung des Serum-Kaliums hat eine zu geringe Sensitivität, da meist die normokaliämische Variante des PHA vorliegt [23, 26]. Dennoch sollte eine Hypokaliämie bei Patienten mit Bluthochdruck natürlich stets an einen Hyperaldosteronismus denken lassen [27, 39-41]. Aufgrund

# 1 Einleitung

der hohen Prävalenz des PHA bei Hypertonikern und der erhöhten Morbidität (siehe Abschnitt 1.3.3) wird teilweise schon gefordert, alle Patienten mit Bluthochdruck auf das Vorliegen eines primären Hyperaldosteronismus zu screenen [42].



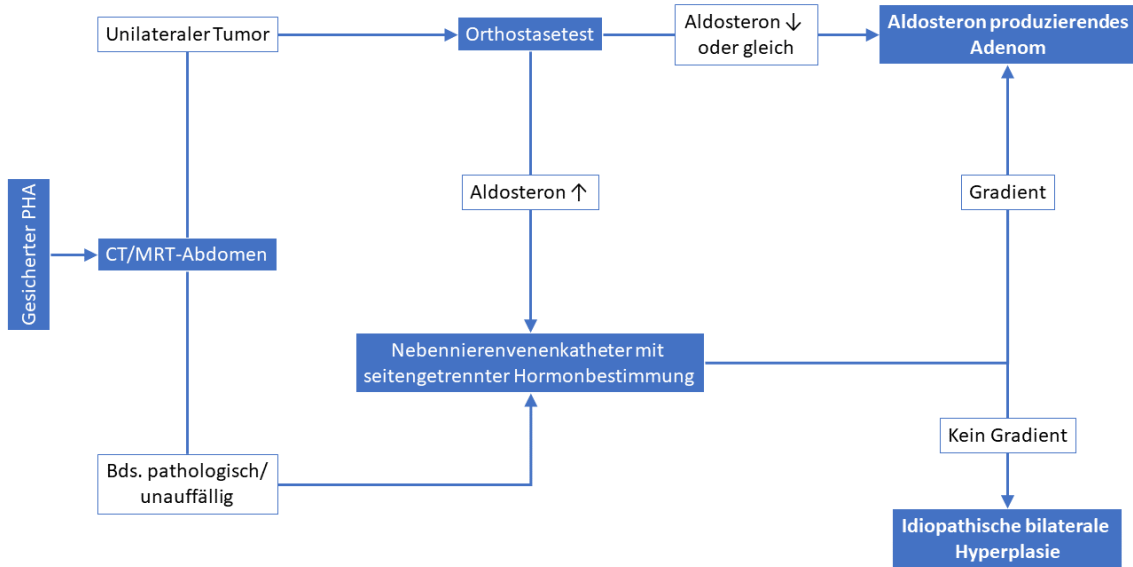
**ABB. 6 ÜBERSICHT ÜBER DAS DIAGNOSTISCHE VORGEHEN BEI VERDACHT AUF EINEN PHA**  
Eigene Darstellung nach [14, 24, 33] PHA = primärer Hyperaldosteronismus, NNR = Nebennierenrinde

Für die Bestimmung der Aldosteron-Renin-Ratio (ARR) wird der Quotient aus der Aldosteronkonzentration in Plasma oder Serum und der Reninkonzentration im Plasma gebildet. Vor dem Screening mittels ARR sollten Medikamente, die das RAAS beeinflussen, abgesetzt werden, sofern der Zustand der Patienten dies zulässt. Dazu zählen Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten, wie Spironolacton und Eplerenon, Kalium-sparende Diuretika, wie Triamteren und Amilorid,  $\beta$ -Blocker, sowie Serotonin-Reuptake-Inhibitoren. Ebenso sollte auf den Verzehr von Lakritz verzichtet werden, da übermäßiger Lakritz-Konsum durch die Inhibition der  $11\beta$ -Dehydrogenase eine vermehrte Stimulation der Aldosteronrezeptoren durch Kortisol bewirken kann (vgl. Abschnitt 1.2.3) [14, 43]. Die Abnahme muss morgens in sitzender Position und in Ruhe erfolgen. Zur Interpretation der Aldosteron-Renin-Quotienten müssen stets die spezifischen Normwerte des analysierenden Labors genutzt werden. Auffällige Screening-Untersuchungen werden zunächst wiederholt; zeigt sich auch hier ein erhöhter Quotient, so muss die Diagnose mittels

## 1 Einleitung

Bestätigungstests verifiziert werden. Als Goldstandard für die Diagnosesicherung gilt der Fludrokortison-Hemmtest, welcher jedoch sehr aufwendig ist und unter stationären Bedingungen durchgeführt werden sollte [14, 33, 44]. Beim Fludrokortison-Hemmtest wird der negative Feedback-Mechanismus des RAAS ausgenutzt (siehe Abb. 4). Beim Gesunden sinkt nach wiederholter Gabe von Fludrokortison die Aldosteronkonzentration auf weniger als 50 ng/l, Werte über 60 ng/l bestätigen den PHA [14]. Häufiger erfolgt die Diagnosesicherung in der Praxis über den Kochsalzbelastungstest. Hierbei erhält der Patient über 4 Stunden 2 Liter 0,9 %iger NaCl-Lösung intravenös, liegt die Aldosteronkonzentration danach über 50 ng/l, so gilt die Diagnose als gesichert. Herz- und Niereninsuffizienz oder Herzrhythmusstörungen sind relative Kontraindikationen für den Kochsalzbelastungstest [14, 15]. Als weitere Alternative kann ein Captopriltest durchgeführt werden, bei dem zur Diagnostik versuchsweise ein ACE-Hemmer gegeben wird. Nach Sicherung der Diagnose PHA sollte immer eine Subtypendifferenzierung (vgl. Abb. 5) erfolgen, da sich die Therapie von Aldosteron produzierenden Adenomen und der idiopathischen bilateralen Hyperplasie grundlegend unterscheidet (siehe Abschnitt 1.3.5) [14, 33, 44]. Hierfür wird zunächst eine Schnittbildgebung mittels Dünnschicht-CT oder MRT vorgenommen. Aufgrund der hohen Rate von Inzidentalomen der Nebennierenrinde reicht die CT- oder MRT-Diagnostik allerdings nicht alleine zur Subtypendifferenzierung aus. Erschwerend kommt hinzu, dass die Adenome der Nebennierenrinde oftmals weniger als 5 mm Durchmesser haben und somit auch von modernen Geräten leicht übersehen werden können [24, 33, 40]. Daher folgt einem Nachweis eines unilateralen Nebennierentumors stets die weitere Abklärung mittels Orthostasetest und/oder seitengetreonter Katheterisierung der Nebennierenvenen (siehe Abb. 7 und Abschnitt 1.3.4.1) [33, 37].

# 1 Einleitung



**ABB. 7 ÜBERBLICK ÜBER DIE SUBTYPENDIFFERENZIERUNG BEI GESICHERTEM PHA**  
Eigene Darstellung nach [33, 37, 41, 45]

Bei Nachweis einer einseitigen Raumforderung wird zunächst ein Orthostasetest durchgeführt. Hierfür wird bei dem Patienten zunächst morgens in Ruhe die Renin-, Aldosteron- und Kortisol-Konzentration bestimmt und erneut nach zwei- bis vierstündiger Orthostase. Physiologisch kommt es durch die Orthostase zu einer Aktivierung des RAAS und somit zu einer Angiotensin-II-vermittelten Aldosteronsekretion. Während bei der idiopathischen bilateralen Hyperplasie meist noch ein Anstieg über mindestens 30 % des Ausgangswertes messbar ist, ist die Mehrzahl der Aldosteron produzierenden Adenome völlig von der RAAS-Regulation entkoppelt – es kommt zu keinem relevanten Anstieg der Aldosteronkonzentration oder sogar zu einem Abfall. Die Bestimmung der Kortisol-Konzentration dient dem Ausschluss einer ACTH-vermittelten Stimulation der Aldosteronsekretion. Da aber auch etwa jedes dritte Conn-Adenom noch auf Angiotensin II reagiert, kann ein Anstieg des Aldosterons im Orthostasetest ein APA nicht ausschließen, sondern nur bestätigen [14, 32, 33]. Goldstandard zur Subtypendifferenzierung des primären Hyperaldosteronismus ist die selektive Katheterisierung der Nebennierenvenen mit seitengetrennter Messung von Aldosteron und Kortisol (siehe Abschnitt 1.3.4.1); sie sollte bei allen unklaren Fällen erfolgen, sofern eine operative Therapie prinzipiell möglich und gewünscht ist [24, 32, 33].

# 1 Einleitung

## 1.3.4.1 Nebennierenvenenkatheter

Die selektive Blutentnahme aus beiden Nebennierenvenen (AVS = Adrenal Vein Sampling) stellt derzeit den Goldstandard der Subtypendiagnostik dar. Über einen venösen Zugang, zum Beispiel der *Vena femoralis*, wird unter Durchleuchtung ein Katheter in beide Nebennierenvenen vorgeschoben und Blut aus beiden *Venae suprarenalis*, der *Vena cava superior* und der *Vena cava inferior* entnommen. Im Anschluss erfolgt aus allen Blutproben die Bestimmung der Aldosteron- und Kortisolkonzentration. Liegt der Kortisolspiegel der Nebennierenvenen 2-3fach über dem der *Vena cava*, so kann von einer korrekten Platzierung des Katheters ausgegangen werden. Diese gestaltet sich insbesondere bei der rechten *Vena suprarenalis* sehr schwierig, da sie direkt in die *Vena cava inferior* mündet (siehe Abschnitt 1.1) [46]. Im Anschluss wird für alle vier Lokalisationen der Quotient aus Aldosteron und Kortisol gebildet. Zeigt sich zwischen den beiden Nebennierenvenen ein Gradient über 3, so liegt eine einseitige Erhöhung vor und es kann von einem APA ausgegangen werden. Ein Gradient unter 3 spricht hingegen für eine bilaterale Hyperplasie der Aldosteron produzierenden Zellen. Gelingt nur die einseitige Katheterisierung einer Nebennierenvene, so kann von einem kontralateralen APA ausgegangen werden, wenn der Aldosteron-Kortisol-Quotienten der katheterisierten Nebennierenvene unter dem der *Vena cava inferior* liegt [32, 33, 40, 47].

Die Katheterisierung der Nebennierenvenen zur Subtypendifferenzierung ist ein äußerst komplexes Verfahren, das zudem mit einer teilweise hohen Strahlenbelastung für Patienten und Untersucher einhergeht[48]. Maßnahmen wie standardisierte Untersuchungsabläufe und die Einführung schneller Kortisolassays können die Rate an erfolgreichen Durchführungen zwar erhöhen [32, 46], wichtigster Faktor ist jedoch die Erfahrung des Untersuchers. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Erfolgsrate deutlich steigt, sondern auch die Rate an Komplikationen drastisch abnimmt, wenn das Verfahren in Zentren mit großen Fallzahlen durchgeführt wird. Dies hat allerdings zur Folge, dass es aktuell nur wenige Zentren gibt, in denen die Diagnostik via AVS angeboten wird. Wichtigste Komplikation bei der Katheterisierung der Nebennierenvenen ist eine Ruptur der katheterisierten Vene. Als Folge kann es zu Einblutungen der Nebenniere kommen und die Durchführung späterer Operationen erschwert werden [32, 49-51]. Interessanterweise verhält sich die Rate an Nebennierenvenenrupturen

## 1 Einleitung

antiproportional zur Anzahl durchgeführter AVS des Untersuchers [49]. Uneinigkeit besteht nach wie vor darüber, ob die Durchführung einer ACTH-Stimulation sinnvoll ist und falls ja, welche Dosierung und Applikationsform genutzt werden sollte [46, 49, 51].

### 1.3.4.2 Spezifische Nebennierenbildgebung

Trotz der Nachteile des Nebennierenvenenkatheters gilt dieser nach wie vor als Goldstandard in der Subtypendifferenzierung des primären Hyperaldosteronismus. Die starke Untersucherabhängigkeit, die Strahlenbelastung [48], die Invasivität und die seltene Verfügbarkeit des selektiven Nebennierenvenenkatheters wecken aber den Wunsch nach einer Alternative für die Subtypendifferenzierung. Die klassische Schnittbildgebung mittels CT oder MRT ist zwar Teil der diagnostischen Kaskade des PHA, reicht aber zur sicheren Differenzierung zwischen Aldosteron produzierenden Adenomen und der idiopathischen bilateralen Hyperplasie nicht aus. Hormonproduzierende Adenome können bildmorphologisch nicht von häufig auftretenden, endokrin inaktiven Inzidentalomen unterschieden werden, kleine Adenome können übersehen werden [32, 50, 52]. Zur Unterscheidung zwischen benignen und malignen Nebennierentumoren kann ergänzend zur Schnittbildgebung ein [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET (Fluoresoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie) durchgeführt werden. FDG reichert sich als Struktur analogon von Glukose in Geweben mit hoher metabolischer Aktivität an und kann somit Neoplasien detektieren. Da es aber nicht gewebespezifisch bindet, kann mittels [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET nicht zwischen Metastasen anderer Tumore und adrenalen Herden unterschieden werden [53].

In den 80er Jahren wurde bei der Gabe des Hypnotikums Etomidat eine Inhibition von Nebennierenrindenenzymen beobachtet [54-56]. Aufgrund dieser Erfahrung wurden auf Basis von Etomidat Tracer synthetisiert, die spezifisch an die adrenalen Enzyme CYP11A1, CYP11B1 und CYP11B2 binden und somit sehr gut zwischen Tumoren der Nebennierenrinde, Phäochromozytomen und Metastasen eines anderen Organs differenzieren können [53, 57]. Es konnte gezeigt werden, dass mittels [ $^{11}\text{C}$ ]Metomidat-PET auch kleine APAs nachgewiesen werden konnten. Prinzipiell ist der Uptake von [ $^{11}\text{C}$ ]Metomidat in Conn-Adenomen größer als in inaktiven Inzidentalomen, sodass es als ergänzende Diagnostik in Betracht gezogen werden kann. Ein großer Nachteil am [ $^{11}\text{C}$ ]Metomidat-PET ist jedoch die geringe Halbwertszeit von [ $^{11}\text{C}$ ] von nur ca. 20 Minuten. Ein Transport

## 1 Einleitung

des Tracers in andere Kliniken ist somit unmöglich, weshalb die Technik nur in Kliniken mit eigenem Zyklotron durchgeführt werden kann [53, 58, 59]. [<sup>123</sup>I]Iodmetomidat ([<sup>123</sup>I]IMTO), ein weiteres Etomidat-Derivat löst dieses Problem. Es bindet ebenfalls spezifisch an die Aldosteronsynthase und die 11 $\beta$ -Hydroxylase, [<sup>123</sup>I] hat aber eine Halbwertszeit von ca. 13 Stunden, wodurch der Tracer auch gut transportiert werden kann. Nachteil des [<sup>123</sup>I]IMTO-SPECT ist die schlechtere Auflösung im Vergleich zum PET, wodurch kleinere Läsionen übersehen werden können [53, 60, 61]. Zur Zeit wird außerdem an [<sup>124</sup>I]IMTO geforscht, einem weiteren möglichen PET-Tracer mit einer nochmals längeren Halbwertszeit von etwa zwei Tagen [62]. Außerdem wurde ein weiteres Derivat, [<sup>131</sup>I]IMTO im Rahmen von Studien bereits erfolgreich in der Therapie von Nebennierenkarzinomen (ACC = Adrenokortikales Karzinom) eingesetzt [63].

Allen auf Metomidat-basierenden Bildgebungen ist jedoch gemein, dass ihre Einsatzmöglichkeiten beim primären Hyperaldosteronismus begrenzt sind. Durch die Bindung sowohl an die 11 $\beta$ -Hydroxylase als auch an die Aldosteronsynthase kann zwar zwischen adrenokortikalem und anderem Gewebe differenziert werden, es ist aber nicht möglich, zwischen der Expression von CYP11B1 und CYP11B2 zu unterscheiden. Da sich gezeigt hat, dass viele hormoninaktive Inzidentalome eine 11 $\beta$ -Hydroxylase-Expression aufweisen, ist es somit nicht möglich, ein APA mit Tracern aus Metomidat-Derivaten sicher nachzuweisen [59, 64-67]. Hierfür wäre beispielsweise ein Tracer notwendig, der ausschließlich an die Aldosteronsynthase bindet und somit lediglich Aldosteron produzierende Zellen nachweist. Ein potenter Inhibitor der Aldosteronsynthase zeigte hier bereits vielversprechende Ergebnisse [68]. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit von CYP11B1 und CYP11B2 ist die Entwicklung eines selektiven Aldosteronsynthase-Inhibitors (siehe auch Abschnitt 1.3.5.1) jedoch sehr schwierig und Gegenstand aktueller Forschung [69-72]. Ein weiterer interessanter Ansatz ist die Nutzung eines [<sup>68</sup>Ga]Pentixafor-PET. [<sup>68</sup>Ga]Pentixafor bindet spezifisch an dem CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4), dieser wird in vielen Gewebearten exprimiert und findet sich insbesondere auch in vielen Tumoren. Es konnte nachgewiesen werden, dass APA eine hohe Expression an CXCR4 aufweisen, während endokrin inaktive Nebennieren-Tumoren allenfalls eine schwache Expression zeigten. Erste Versuche einer Bildgebung mit [<sup>68</sup>Ga]Pentixafor bei APA-Patienten waren bereits erfolgreich, sodass es sich hierbei um ein gutes



## 1 Einleitung

diagnostisches Mittel in der PHA-Diagnostik handeln könnte. Da jedoch auch die normale Nebenniere eine hohe CXCR4-Expression aufweist, könnte die Sensitivität der [<sup>68</sup>Ga]Pentixafor-PET Bildgebung eingeschränkt sein [65].

### 1.3.5 Therapie

Die zielgerichtete Therapie des PHA ist von großer Bedeutung, da PHA-Patienten einerseits oftmals nur schlecht auf die klassische antihypertensive Therapie ansprechen (vgl. Abschnitt 1.3.4), und andererseits unter einer erhöhten Morbidität im Vergleich zu essenziellen Hypertonikern leiden (vgl. Abschnitt 1.3.3) [17, 32, 33]. Die Therapieansätze sind dabei abhängig vom jeweiligen Subtyp [14].

Bei Aldosteron produzierenden Adenomen ist insbesondere bei jüngeren Patienten eine laparoskopische Adrenalektomie der langfristig erfolgreichere therapeutische Ansatz. Hierdurch kann in bis zu 80 % der Fälle der Blutdruck normalisiert werden und auch eine bestehende Hypokaliämie (die bei APA gehäuft auftritt) bessert sich in der Regel. Durch eine Suppression der kontralateralen Aldosteronproduktion wegen der durch das Adenom erhöhten Hormonspiegel kann es postoperativ zu einem passageren Hypoaldosteronismus kommen, der durch Substitution mit Fludrocortison therapiert wird. Durch präoperative Behandlung mit Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten (MRA), wie z.B. Spironolacton, wird das Auftreten eines postoperativen Hypoaldosteronismus verringert [14, 24, 32, 33].

Patienten mit einer idiopathischen bilateralen Hyperplasie der *Zona glomerulosa* sollten medikamentös therapiert werden, da eine einseitige Adrenalektomie kaum erfolgversprechend ist. Als wichtigste Substanzklasse gelten hierbei die Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten, wie Spironolacton. MRA lindern die rezeptorvermittelten Symptome des Aldosteronexzesses, haben aber keinen Einfluss auf die nicht-rezeptorvermittelten Effekte. In bis zu 10 % der Fälle tritt unter Behandlung mit Spironolacton eine Gynäkomastie auf, es kommt außerdem zu erektiler Dysfunktion bei männlichen und Zyklusstörungen bei weiblichen Patienten. Als Alternative kann Eplerenon verabreicht werden, dieses ist aber teurer, benötigt höhere Dosierungen und ist derzeit noch nicht für die Therapie des PHA zugelassen [14, 24, 32, 33, 40, 73]. Reicht die Therapie mit MRA nicht

## 1 Einleitung

aus, so kann die Gabe von ACE-Inhibitoren sinnvoll sein. Unter MRA-Therapie entfällt das negative Feedback auf das RAAS (siehe Abschnitt 1.2.4 und Abb. 4), wodurch es zu einer gesteigerten Konzentration von Angiotensin II kommen kann. ACE-Inhibitoren hemmen die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II [19, 32, 40, 73]. Weiterhin können zur Behandlung einer Hypokaliämie kaliumsparende Diuretika und zur ergänzenden antihypertensiven Therapie Nifedipin eingesetzt werden [14, 32].

Derzeit wird intensiv an der Entwicklung von direkten Inhibitoren der Aldosteronsynthese geforscht (siehe Abschnitt 1.3.5.1), die durch eine Hemmung der Aldosteronproduktion neben den rezeptorvermittelten auch die nicht-rezeptorvermittelten Symptome bessern könnten [44, 74].

### 1.3.5.1 Selektive Aldosteronsynthese-Inhibitoren

Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten sind heute nicht nur fester Bestandteil in der Therapie des primären Hyperaldosteronismus, sondern auch in der der Herzinsuffizienz. Es konnte gezeigt werden, dass sich unter der Therapie mit MRA die Mortalität, Hospitalisierungsrate und Prognose der Patienten bessert [14, 24, 75]. Zu den rezeptorvermittelten Wirkungen von Aldosteron kommen jedoch auch Rezeptor-unabhängige Wirkungen, die durch MRA nicht positiv beeinflusst werden können [32, 36, 70]. Zwar vermögen Renin-Antagonisten und ACE-Inhibitoren die Aldosteronkonzentration zu senken, es hat sich aber gezeigt, dass trotzdem relevante Mengen an Aldosteron produziert werden [74, 76].

Die große strukturelle Ähnlichkeit der Aldosteronsynthese und der 11 $\beta$ -Hydroxylase erschweren jedoch die Entwicklung eines selektiven Inhibitors, der nur die Aldosteron-, nicht aber die Kortisolsynthese hemmt [69-72]. Nachdem man Ende des letzten Jahrhunderts merkte, dass der Aromatasehemmer Fadrozol die Aldosteronsynthese hemmt [77], versuchte man dessen D-Enantiomer, FAD286, als selektiven Aldosteronsyntheseinhibitor zu verwenden [77-79]. FAD286 schaffte es jedoch nie in klinische Studien, sodass erst die strukturell ähnliche Substanz LCI699 als erster oraler Aldosteronsyntheseinhibitor an Patienten getestet wurde. Nach anfangs vielversprechenden Ergebnissen zeigte sich, dass die Spezifität für die Aldosteronsynthese doch zu gering ausgeprägt war und es

## 1 Einleitung

zu einer relevanten Suppression der Kortisolsynthese kam. Als Folge dessen wird derzeit wegen der starken Suppression der  $11\beta$ -Hydroxylase sogar in klinischen Studien ein Einsatz von LCI699 in der Therapie des Cushing-Syndroms erforscht [80-82]. Neuere Substanzen wie BI 689648 oder Dihydro-Benzisoxazol-Verbindungen, zeigten erste vielversprechende Ergebnisse. So wurde in einem Makaken-Affen-Modell für BI 689648 eine 11.000fache *in-vivo*-Selektivität für die Aldosteronsynthese gegenüber der  $11\beta$ -Hydroxylase beschrieben [82, 83]. Ob diese aussichtsreichen Substanzen auch in klinischen Studien ihre hohe Selektivität behalten, werden weitere Studien zeigen müssen.

### 2 Fragestellung und Ziel der Dissertation

Gegenstand dieser Arbeit ist es, einen neuen, selektiven Inhibitor der Aldosteronsynthese zu finden, der als radiofluorierter PET-Tracer in der Differentialdiagnostik des primären Hyperaldosteronismus eingesetzt werden kann. Dies dient dem langfristigen Ziel, den problematischen Nebennierenvenenkatheter als Goldstandard in der Diagnostik des Conn-Syndroms abzulösen und eine einfache, ubiquitär verfügbare Alternative zu finden. Wie in Abschnitt 1.3.4.1 geschildert, geht die selektive Katheterisierung der Nebennierenvenen nicht nur mit einer hohen Strahlenbelastung der Patienten und Untersucher einher, sondern ist, nicht zuletzt wegen der großen Untersucherabhängigkeit, nur in wenigen Zentren verfügbar. Da die PET-Diagnostik jedoch flächendeckend zur Verfügung steht, böte ein passender Tracer mit ausreichend langer Halbwertszeit, so auch außerhalb spezialisierter Zentren die Möglichkeit einer Differenzierung zwischen Aldosteron produzierenden Tumoren und bilateralen Hyperplasien.

Dafür wurden 11 Stoffe aus den Klassen der Naphthylpyridine, Cyanofluorphenylpyridine und Trifluormethylfluorphenylpyridine, hinsichtlich folgender konkreter Fragen untersucht:

- Selektive Inhibition der Aldosteronsynthese *in vitro* und Einflüsse auf die gesamte Hormonsekretion der Nebennierenrinde, insbesondere jedoch auf die Funktion der 11 $\beta$ -Hydroxylase
- *In-vitro*-Effekte auf adrenale Rattenenzyme im Zellkulturmodell, zur besseren Einordnung der nachfolgenden Ergebnisse in murinen *in-vivo*-Modellen
- Selektive Inhibition der Aldosteronsynthese *in vivo* im teilhumanisierten Mausmodell
- Selektive Bindung radiofluorierter Inhibitoren an CYP11B2-exprimierende Regionen in humanen Gewebeschnitten. Überprüfung der Ergebnisse anhand immunhistochemischer Färbungen der Gewebeschnitte.

Dies dient dem Ziel Substanzen zu finden, die selektiv an die Aldosteronsynthese binden und später in klinischen Studien zum Einsatz kommen können.

## 3 Materialien

### 3.1 Geräte

TAB. 1 ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN GERÄTE

Geräte	Hersteller
Analysewaage 120-4NM	Kern ABJ
Automatischer Zellzähler Countess II FL	Thermo Fisher Scientific
Brutschrank Serie C	Binder
Flüssigstickstofftank	KGW
Gefrierschrank	Therma Fisher Scientific
Imageplate Reader CR 35 BIO	Dürr Medical
Immulite 2000	Siemens
Kryostat CM 1850	Leica
Kühlschrank gastroline	Liebherr
Kühlschrank Premium NoFrost	Liebherr
Magnetrührer MMS-3000	Biosan
Magnetrührer RET basic	IKA
Mikroskop Axioskop 2	Zeiss
Mikroskop PrimoVert	Zeiss
Multilabel Reader Victor <sup>3</sup>	PerkinElmer
Pipetten (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 50 µl, 100 µl)	Brand
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand
Repetitive Pipette HandyStep® electronic	Brand
Schüttler VTX-3000L Mixer Uzusio	CLN Freising
Sterilarbeitsbank MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific
Transferpette S	Brand
Trockenschrank T 5042	Heraeus
Wasserbad Exatherm P5 electronic	Julabo
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich

### 3 Materialien

#### 3.2 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Antikörper, Zelllinien und Tiermodelle

TAB. 2 ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN VERBRAUCHSMATERIALIEN

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Combitips Plus (10 ml)	Eppendorf
Deckgläschen	Marienfeld
Falcons (15 ml, 50 ml)	Greiner
Objekträger Superfrost Plus	Thermo Fisher Scientific
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Sarstedt
Präzisions Dispenser Tips (12,5 ml, 25 ml, 50 ml)	Brand
Reaktionsgefäße (1 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Spritzen steril (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Becton Dickinson
Zählkammer Countess	Invitrogen
Zellkulturflaschen Falcon (50 ml, 250 ml und 750 ml)	Becton Dickinson
Zellkulturplatten (steril) (6, 12 und 24 Wells)	Costar

TAB. 3 ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN CHEMIKALIEN

Chemikalien	Hersteller	Konzentration
Aceton	Sigma-Aldrich Co.	≥99,5%
Desoxykortikosteron	Sigma-Aldrich Co.	5 mM
Desoxykortisol	Sigma-Adrich Co.	5 mM
Diaminobenzidin (DAB)	Dako North America Inc.	
DMEM AQ Medium mit 4500 mg/L Glucose, L-Alanyl-L-Glutamin, Natriumpyruvat und Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich Co.	
Entellan	Merck KGaA	
Eosin G – wässrige Lösung	Carl Roth GmbH + Co. KG	1%

### 3 Materialien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Konzentration</b>
<b>Ethanol</b>	Sigma-Aldrich Co.	≥99,8%
<b>FCS (Fetales Kälberserum)</b>	Sigma-Aldrich Co.	
<b>Genetecin</b>	Gibco	50 mg/ml
<b>Wasserstoffperoxid</b>	Merck KGaA	
<b>Alaun-Hämatoxylin-Lösung (sauer nach Mayer)</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG	
<b>Human serum type AB (male)</b>	Sigma-Aldrich Co.	
<b>ImmEdge Pen</b>	Vector Laboratories	
<b>Insulin Lösung</b>	Sigma-Aldrich Co.	
<b>Methanol</b>	Sigma-Aldrich Co.	
<b>Natrium-Selenit</b>	Sigma-Aldrich Co.	4 µg/ml
<b>Paraformaldehyd (PFA)</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG	4 % in PBS
<b>PBS (Phosphate buffered saline)</b>	Sigma-Aldrich Co.	10 mM Phosphat Puffer; 2,7 mM Kali- umchlorid; 137mM Natriumchlorid
<b>RPMI -1640 Medium mit L- Glutamin und Natriumbi- karbonat</b>	Sigma-Aldrich Co.	
<b>Transferrin</b>	Sigma-Aldrich Co.	10 mg/ml
<b>TRIS (Tris-hydroxymethyl- aminomethan) pH 7,4</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG	50 mM
<b>Trypanblau</b>	Sigma-Aldrich Co.	0,4 %
<b>Trypsin-EDTA</b>	Sigma-Aldrich Co.	0,25 % Trypsin, 0,2 % EDTA
<b>Tween 20 (Polysorbat 20)</b>	BioChemica	
<b>Wasser, destilliert</b>	Fresenius Kabi AG	
<b>Zeocin</b>	Invitrogen	100 mg/ml

### 3 Materialien

**TAB. 4 ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN MONOKLONALEN ANTIKÖRPER**  
(vgl. Abschnitt 4.1.3)

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Rat Monoclonal Antibody hCYP11B1</b>	The University of Mississippi – Medical Center – Prof. Gomez-Sanchez
<b>Mouse Monoclonal Antibody hCYP11B2</b>	The University of Mississippi – Medical Center – Prof. Gomez-Sanchez
<b>AK-HRP (Horseradish-Peroxidase) konjugiert</b>	Dako North America Inc.
<b>Anti-CYP11B1-Antikörper</b>	Keio Universität Tokyo – Prof. Kuniaki Mukai
<b>Anti-CYP11B2-Antikörper</b>	Keio Universität Tokyo – Prof. Kuniaki Mukai

**TAB. 5 ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN ZELLINIEN UND TIERMODELLE**  
(vgl. Abschnitte 4.2 und 4.3)

<b>Zelllinien</b>	
<b>NCI-H295</b>	
<b>V79-CYP11B1</b>	
<b>V79-CYP11B2</b>	
<b>Y1-hsCYP11B1</b>	
<b>Y1-hsCYP11B2</b>	
<b>Tiermodelle</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Humanisierte Mäuse: MRK0301</b>	Taconic Biosciences

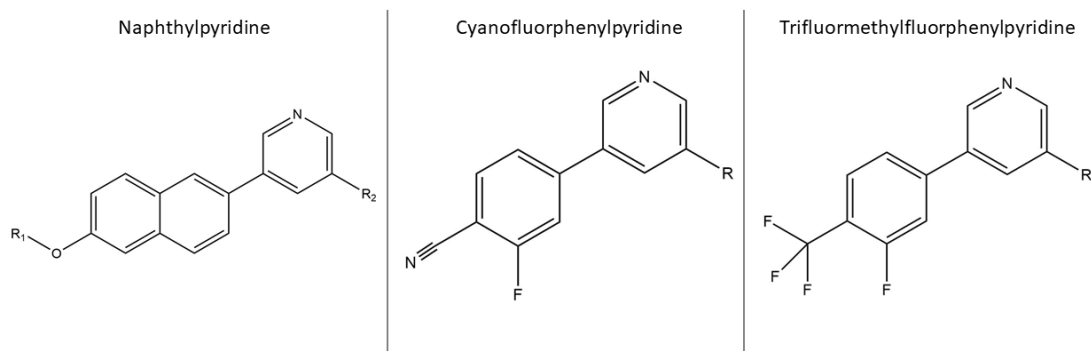
### 3.3 Aldosteronsynthese-Inhibitoren und Tracer

Für diese Arbeit wurden im Rahmen eine Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Würzburg von Dr. Andreas Schirbel potentielle Aldosteronsynthese-Inhibitoren und Tracer aus den Substanzgruppen der



### 3 Materialien

Naphthylpyridine, Cyanofluorphenylpyridine und Trifluormethylfluorphenylpyridine (siehe Abb. 8) synthetisiert.



**ABB. 8** STOFFKLASSEN DER UNTERSUCHTEN SUBSTANZEN

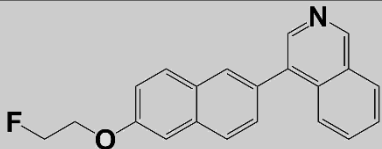
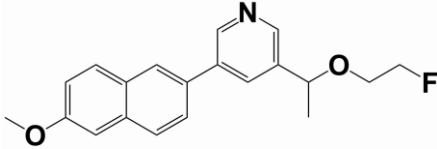
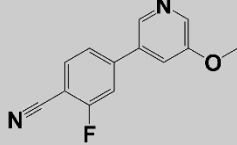
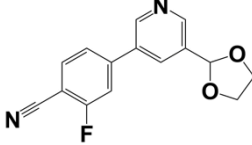

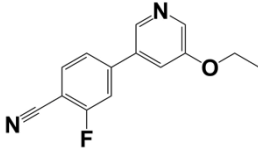
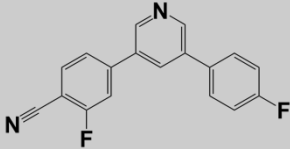
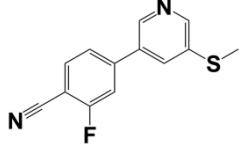
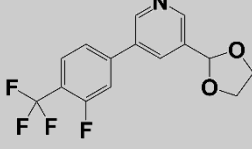
Eigene Darstellung der verwendeten Stoffklassen Naphthylpyridine, Cyanofluorphenylpyridine, Trifluormethylfluorphenylpyridine

Für die Testung potentieller PET-Tracer wurden die synthetisierten Substanzen mit [<sup>18</sup>F] markiert; sie werden in dieser Dissertation als Tracer bezeichnet. Die Markierung erfolgte unmittelbar vor der Durchführung der Versuche. Hierfür wurde [<sup>18</sup>F] im Zyklotron der Uniklinik hergestellt, es hat eine Halbwertszeit von ca. 110 Minuten [84]. Die nicht radioaktiv markierten Substanzen werden in dieser Arbeit hingegen (Aldosteronsynthese-) Inhibitoren genannt. Sie wurden bei einer Temperatur von ca. 6-8 °C gelagert und vor Durchführung der Versuche auf Raumtemperatur gebracht. Außerdem wurden von Dr. Schirbel als Vergleichssubstanzen FAD286 und IMTO synthetisiert. In Tab. 6 sind die getesteten Substanzen dargestellt, bei den Substanzen 1 und 2 handelt es sich um Naphthylpyridine, bei den Substanzen 3-8 um Cyanofluorphenylpyridine und bei den Substanzen 9-11 um Trifluormethylfluorphenylpyridine. Die Radiofluorierung der Naphthylpyridine und Cyanofluorphenylpyridine gestaltete sich sehr schwierig, sodass eine radioaktive Markierung nur bei den Substanzen 2-5 und 9-11 gelang. Die anderen Inhibitoren konnten daher im Rahmen dieser Arbeit nicht mit Bindungsstudien untersucht werden.

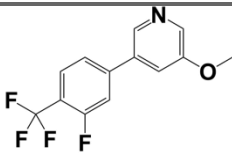
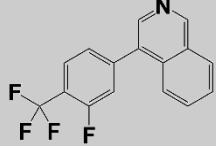
### 3 Materialien

**TAB. 6 ÜBERSICHT DER UNTERSUCHTEN SUBSTANZEN MIT STRUKTURFORMELN**

Bei den Substanzen 1 und 2 handelt es sich um Naphthylpyridine, bei den Substanzen 3-8 um Cyanofluorphenylpyridine und bei den Substanzen 9-11 um Trifluormethylfluorphenylpyridine.

Nummer	Strukturformel
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	

### 3 Materialien

Nummer	Strukturformel
10	
11	

### 3.4 Kits

TAB. 7 ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN KITS

Kit	Hersteller	Inhalt
<b>Advance HRP</b>	Dako North America Inc.	Advance HRP Link Sekundäre Anti-Maus- & Anti-Kaninchen-Anti- körper Advance HRP Enzyme Mit HRP polymerisierte AK in TRIS-HCl-Puffer
<b>ELISA: 17-OH-Progesteron-</b>	IBL	Mikrotiterwellplatte (96 Wells), Enzymkonjugat, Substrat-Lösung, Stop-Lö- sung, Standard- und Kon- trollösungen (lyophili- siert), Waschlösung
<b>ELISA: Aldosteron</b>	IBL	Mikrotiterwellplatte (96 Wells), Enzymkonjugat, Substrat-Lösung, Stop-Lö- sung, Standard- und Kon- trollösungen (lyophili- siert), Waschlösung

### 3 Materialien

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Inhalt</b>
<b>ELISA: Kortikosteroone (Mensch, Ratte, Maus)</b>	IBL	Mikrotiterwellplatte (96 Wells), Enzymkonjugat, Substrat-Lösung, Stop-Lösung, Standard- und Kontrolllösungen (lyophilisiert), Waschlösung
<b>EnVision + System HRP</b>	Dako North America Inc.	DAB + Chromogen DAB + Substratpuffer Mit HRP polymerisierte Anti-Kaninchen-AK

### 3.5 Verwendete Software

TAB. 8 ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETE SOFTWARE

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Amide</b>	Andreas Loening
<b>ChemDraw Professional 17.0</b>	PerkinElmer
<b>Corel Draw X9</b>	Corel Cooperation
<b>CR Reader</b>	Dürr Medical
<b>EndNote X8</b>	Thomson Reuters
<b>GraphPadPrism 7</b>	Graphpad Software, Inc.
<b>Microsoft Office 365</b>	Microsoft
<b>ZEN (blue Edition)</b>	Zeiss

# 4 Methoden

### 4.1 Zellbiologische Verfahren

Mit den zellbiologischen Versuchen wurde die selektive Inhibition der Aldosteronsynthese *in vitro* getestet. Hierfür wurden NCI-h295-, Y1- und V79-Zelllinien verwendet (siehe auch Tab. 4). Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Arbeiten bei Raumtemperatur unter sterilen Kautelen an einer Sterilarbeitsbank durchgeführt. Die Zelllinien wurden bei 37,5 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt in sterilen Zellkulturflaschen kultiviert. Gewaschen wurde stets mit sterilem PBS ohne Zusätze. Zum Ablösen der adhärenen Zelllinien Y1 und V79 wurde Trypsin-EDTA verwendet, beim Passagieren der Zellen wurden stets neue Zellkulturflaschen verwendet. Vor allen Versuchen wurden Wachstum und Vitalität der Zellen beurteilt. Zur Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen wurde die Trypanblau-Methode gewählt. Hierfür wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt und mit einem automatischen Zellzähler ausgewählt. Vitale Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf, während abgestorbene Zellen sich intensiv blau färben [85].

#### 4.1.1 Y1-hsCYP11B1 und Y1-hsCYP11B2-Zelllinien (adhärent)

Bei den Y1-Zelllinien handelt es sich um adhärenente, murine Zellen eines endokrin aktiven ACC, die 1966 von Yasumura et al. entwickelt wurden [86]. Verwendet wurden zwei verschiedene Zelllinien, die durch Transfektion stabil die humane 11 $\beta$ -Hydroxylase (Y1-hsCYP11B1), bzw. die Aldosteronsynthese (Y1-hsCYP11B2) exprimieren [87, 88]. An den Y1-Zelllinien wurde die Wirkung der Inhibitoren auf die jeweiligen Enzyme getestet. Sie wurden alle 48 Stunden passagiert, das Medium bestand aus DMEM AQ (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 4,5 g/l Glukose, welches mit 10 % FCS und 1 mg/ml Zeocin, einem gängigen Antibiotikum für Zellkulturen [85], versetzt wurde.

#### 4.1.2 NCI-H295-Zelllinien (Suspension)

Vor knapp 30 Jahren gelang es Gazdar et al., eine Zellkulturlinie auf Basis eines Nebennierenrindenzinoms zu etablieren. Diese NCI-H295-Zellen können eigenständig Cholesterin synthetisieren und auf Basis dessen über 30 verschiedenen Steroidhormone der

## 4 Methoden

Nebennierenrinde produzieren [89-91]. Dadurch ist es möglich, die Auswirkungen von Inhibitoren nicht nur auf die Aldosteronsynthese (CYP11B2) und 11 $\beta$ -Hydroxylase (CYP11B1) zu überprüfen, sondern auch auf die weiteren Enzyme der Steroidhormonsynthese (vgl. Abb. 2) [89, 92]. Die NCI-Zellen wurden in RPMI-1640-Kulturmedium mit Zusatz von 10 % FCS, 5  $\mu$ g/ml Insulin, 100  $\mu$ g/ml Transferrin und 5,2 ng/ml Natriumselenit gehalten. Sie erhielten alle 48 Stunden ein Mediumwechsel, dabei wurden ca. 30 % des alten Mediums wiederverwendet um synthetisierte Wachstumsfaktoren zu erhalten [85, 89, 93]. Im Wechsel dazu erfolgte alle vier bis fünf Tage eine Passagierung der Zellen.

### 4.1.3 V79CYP11B1 und V79CYP11B2-Zelllinien (adhärent)

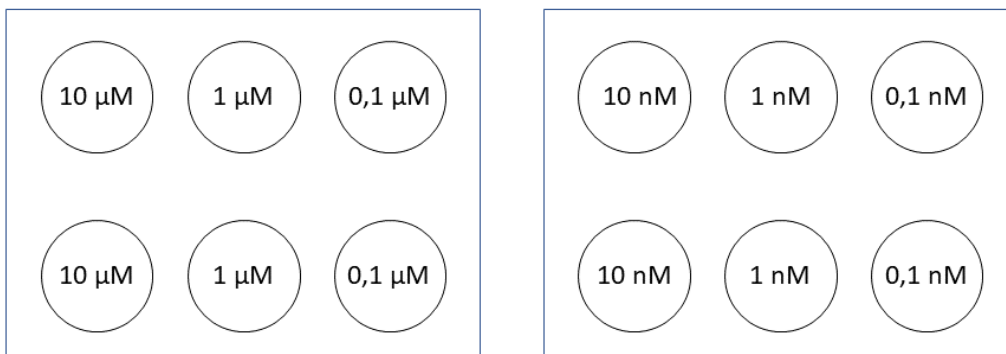
Bei den V79-Zellen handelt es sich ebenfalls um adhärent wachsende Zelllinien, welche aus Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters gewonnen wurden [94]. Durch Transfektion exprimierten die beiden Zelllinien die 11 $\beta$ -Hydroxylase bzw. die Aldosteronsynthese der Ratte stabil. Ziel der Versuche mit den V79-Zellen war es, die Wirkung der Inhibitoren auf Rattenenzyme mit der Wirkung auf die humanen Enzyme zu vergleichen, um die Ergebnisse der *in-vivo*-Experimente am murinen Tiermodell besser einordnen zu können. Die V79 wurden in gleicher Weise kultiviert und passagiert wie die Y1-Zellen, das Medium bestand aus DMEM AQ, versetzt mit 10 % FCS und 0,1 mg/ml Geneticin, einem üblichen Antibiotikum für Zellkulturen [85].

### 4.1.4 Vergleich der selektiven Inhibition der CYP11B1- und CYP11B2-Enzyme in den vorgestellten Zelllinien

Die Aldosteronsynthese-Inhibitoren wurden an allen vorgestellten Zelllinien getestet. Dafür wurden je 500.000 vitale Zellen pro Well einer beschichteten 6-Well-Platte ausgesät und in jedes Well der zu testende Inhibitor in festgelegten Konzentrationen hinzugegeben. Jeder Inhibitor wurde mit jeder Zelllinie in drei unabhängigen Versuchen getestet, bei jedem Durchgang wurde jede Konzentration in zwei getrennten Wells getestet (vgl. Abb. 9). Außerdem wurden bei jedem Durchgang als Negativkontrollen in vier Wells Zellen ausgesät, ohne einen Inhibitor zu verabreichen. Die Zellen wurden für 48 Stunden mit dem Inhibitor inkubiert, danach wurden aus den Überständen die Hormonkonzentrationen bestimmt (siehe auch Abschnitte 4.2.4.1 und 4.2.4.2). Nach der Bestimmung der

## 4 Methoden

Hormonkonzentration wurden für alle Inhibitorkonzentrationen Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie  $IC_{50}$ -Werte errechnet. Bei den  $IC_{50}$ -Werten handelt es sich um eine rechnerische Größe, die die nötige Konzentration eines Inhibitors angibt um die Hormonproduktion exakt um 50 % gegenüber den Negativkontrollen zu reduzieren. Für den Vergleich der  $11\beta$ -Hydroxylase- und Aldosteronsynthese-Hemmung wurden im Anschluss Selektivitätsfaktoren aus den jeweiligen  $IC_{50}$ -Werten ermittelt. Dabei wurde folgende Formel verwendet:  $\frac{IC_{50} \text{ CYP11B1}}{IC_{50} \text{ CYP11B2}}$ . Daraus ergibt sich, dass Substanzen, die die Aldosteronsynthese bereits in geringeren Konzentrationen hemmen, die  $11\beta$ -Hydroxylase jedoch erst in höheren Konzentrationen, einen Selektivitätsfaktor größer 1 erhalten. Je größer der Selektivitätsfaktor, desto selektiver wird die Aldosteronsynthese gehemmt.



**ABB. 9 PIPETTIERSCHEMA DER INHIBITORVERSUCHE**

Dargestellt sind die 6-Well-Platten von oben, in jedes Well wurden zuvor 500.000 vitale Zellen eingesät, der zu untersuchende Inhibitor wurde in den dargestellten Konzentrationen hinzugegeben. Eigene Darstellung.

### 4.1.4.1 Y1- und V79-Zelllinien

Nach der Aussaat der Zellen in die 6-Well-Platten wurden diese über 24 Stunden im Brutschrank gelagert, bevor die Inhibitoren dazugegeben wurden. Auf diese Weise konnten sich die adhären Zellen an den Boden der Wells anheften. Die Y1-hsCYP11B1-Zellen benötigen für die Kortisolsynthese eine Substitution mit der Vorläufersubstanz Desoxykortisol, die Y1-hsCYP11B2-Zellen sind hingegen für die Aldosteronsynthese auf die Zugabe von Desoxykortikosteron angewiesen. Die beiden V79-Zelllinien sind ebenfalls auf die Zugabe dieser Vorstufen für die Produktion von Kortikosteron bzw. Aldosteron

## 4 Methoden

angewiesen. Sie wurden deshalb bei den genannten Zelllinien im Rahmen eines kompletten Mediumwechsels in einer 1  $\mu\text{M}$  Konzentration zusammen mit den Inhibitoren am zweiten Tag zugeführt. Nach 48 Stunden wurden die Überstände abpipettiert und bei -20 °C in Reaktionsgefäßen gelagert. Die Bestimmung der Kortisol-Konzentration (Y1-hsCYP11B1) wurde mittels Immulite durchgeführt (siehe Abschnitt 4.4.1), die Bestimmung der Aldosteron- (Y1-hsCYP11B2 und V79CYP11B2) bzw. Kortikosteron-Konzentration (V79CYP11B1), mittels ELISA (siehe Abschnitt 4.4.2). Bei den Inhibitoren 1-3 erfolgte die Durchführung der Versuche mit Y1-Zellen durch andere Mitglieder unserer Arbeitsgruppe.

### 4.1.4.1 NCI-H295-Zelllinie

Für die Versuche mit den NCI-H295-Zellen wurde zunächst die Zellsuspension für fünf Minuten mit 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der komplette Überstand abpipettiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit frischem Medium wieder in Suspension gebracht und die Zellen nach der oben beschriebenen Trypanblaumethode gezählt. Da die NCI-H295-Zellen ohne Zusätze in der Lage sind, Steroidhormone zu produzieren [93], konnten sie gleich nach dem Aussäen in die 6-Well-Platten (siehe oben) mit den Inhibitoren inkubiert werden. Nach 48 Stunden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit mit den Inhibitoren wurde die Suspension jedes Wells in ein eigenes Reaktionsgefäß abpipettiert, welches dann bei 4000 Umdrehungen pro Minute für 3 Minuten zentrifugiert wurde. Danach wurde der Überstand abpipettiert, 1 ml wurde direkt zur Kortisol- und Androstendion-Bestimmung mithilfe des Immulite 2000 gebracht (siehe Abschnitt 4.4.1). Der restliche Überstand wurde in Reaktionsgefäßen bei -20 °C gelagert, später wurde daraus mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) die Konzentrationen von Aldosteron und 17-Hydroxy-Progesteron gemessen (siehe Abschnitt 4.4.2).

## 4.2 *In-vivo*-Experimente an teilhumanisierten Mäusen

Es liegt eine Genehmigung für die Tierversuche unter dem Aktenzeichen 55.2-2531.01-56/13 vor. Die *in-vivo*-Versuche wurden an den teilhumanisierten Mäusen MRK0301 der Firma Taconic Biosciences durchgeführt. Diese exprimieren die humane Aldosteronsynthese, wodurch eine Aussage über das *in-vivo*-Verhalten der Aldosteronsynthese-Inhibitoren getroffen werden kann. Da eine der Hauptschwierigkeiten in der Entwicklung neuer



## 4 Methoden

Aldosteronsynthese-Inhibitoren die große Homologie zwischen CYP11B1 und CYP11B2 ist, wäre ein Versuch mit nicht-humanisierten Mäusen wenig zielführend, da die murine Aldosteronsynthese nur zu etwa 69 % mit der humanen Aldosteronsynthese übereinstimmt [95], während zwischen der humanen 11 $\beta$ -Hydroxylase und der humanen Aldosteronsynthese ein Homologie von 93 % besteht [69-72]. Am Tag vor den eigentlichen Experimenten erhielten die Versuchstiere mit 2 % KCl versetztes Trinkwasser um die Aldosteronproduktion anzuregen. Für die Experimente wurden den Mäusen die zu untersuchenden Inhibitoren in die Schwanzvene injiziert. Nach 30, 60 oder 120 Minuten wurden die Versuchstiere durch CO<sub>2</sub>-Inkubation euthanisiert. Nach dem Exitus erfolgte der Zugang über einen medianen thorakolumbalen Schnitt, mit einer sterilen Kanüle und Spritze wurde intrakardial Blut entnommen und in ein Reaktionsgefäß überführt, welches auf Trockeneis gelagert wurde. Aus dem entnommenen Blut wurde mittels ELISA die Konzentration von Aldosteron und Kortikosteron ermittelt (siehe Abschnitt 4.4.2) als Vergleichswerte wurde auf gleiche Weise Blut von Mäusen abgenommen und analysiert, die zwar ebenfalls KCl-versetztes Trinkwasser, jedoch keinen Inhibitor erhalten hatten.

### 4.3 Messen der Hormonkonzentrationen

#### 4.3.1 Kortisol und Androstendion (Immulite)

Für die Bestimmung der Kortisol- und Androstendion-Konzentrationen wurde das „Immulite 2000“-Immunoassay-System von Siemens verwendet. Hierbei handelt es sich um ein vollautomatisiertes System, welches auf Basis eines Enzymimmunoassays Chemilumineszenz nutzt, um die Konzentration des gesuchten Hormons zu bestimmen. Grundlage von Immunoassays ist die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion. Ein spezifischer Antikörper bindet an die nachzuweisende Substanz (hier Kortisol bzw. Androstendion), automatisch werden mehrere Zwischenschritte ausgeführt, letztendlich kommt es durch die Reaktion des spezifisch gebundenen Enzyms zur Chemilumineszenz. Die Lichtemission wird quantifiziert und mittels Standardkurven wird hieraus die Konzentration der untersuchten Substanz berechnet [96]. Die Herstellerangaben wurden streng befolgt und Kontrollen wurden bei jedem Durchgang durchgeführt.

## 4 Methoden

### 4.3.2 Aldosteron, Kortikosteron und 17-OH-Progesteron (ELISA)

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein Standardverfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung von Hormonkonzentrationen. An die Wells der Mikrotiterplatten sind Antikörper gebunden, diese binden das nachzuweisende Antigen. Bei dem verwendeten kompetitiven ELISA wird nun ein enzymmarkiertes Antigen in bekannter Konzentration hinzugegeben. Durch Waschschriffe werden dann nicht gebundene enzymmarkierte Antigene entfernt. Je mehr Bindungsstellen durch das nachzuweisende Antigen besetzt sind, desto weniger enzymmarkierte Antigene können binden und desto schwächer fällt die davon katalysierte Farbreaktion aus. Daher ist die Farbintensität antiproportional zur Hormonkonzentration und kann mithilfe einer Standardkurve bestimmt werden [9, 96]. Bei der Durchführung wurden die Herstellerangaben streng befolgt, in jedem Durchgang wurden Standardprobe, Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Direkt nach der Durchführung wurden die optische Dichte der einzelnen Wells bei 450 nm ausgelesen, hierfür wurde der „Multilabel Reader Victor<sup>3</sup>“ von PerkinElmer genutzt.

## 4.1 Histologische Verfahren

### 4.1.1 Gefrierschnitte von humanem Gewebe

Für die Bindungsstudien und histologischen Färbungen wurden Gefrierschnitte von gesunden Nebennieren (nNN = normale Nebenniere), Aldosteron produzierenden Tumoren (APA), Kortisol produzierenden Tumoren (CPA), Nebennierenkarzinomen (ACC = adrenokortikales Karzinom), sowie zum Vergleich von Colon, Schilddrüse, Lunge, Niere und Leber angefertigt. Die verschiedenen Gewebearten waren Teil der endokrinologischen Tumorbank ENSAT oder wurden der Arbeitsgruppe freundlicherweise in anonymisierter Form ohne klinische Annotation vom Pathologischen Institut der Würzburger Universitätsklinik bereitgestellt. Die Patienten hatten zuvor der Verwendung der Gewebe zu Forschungszwecken vorgestellt. Es liegt ein Votum der Würzburger Ethikkommission unter der Nummer 88/11 vor. Nach Entnahme wurden die Gewebestücke in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und im Anschluss bei -80 °C gelagert, der Transport erfolgte stets auf Trockeneis. Mithilfe des Kryostaten CM 1850 wurden die Gefrierschnitte bei einer Temperatur von -20 °C hergestellt. Dabei wurden je zwei 20 µm dicke Schnitte für die Immunhistochemie (siehe Abschnitt 4.1.3) und Bindungsstudien (siehe

## 4 Methoden

Abschnitt 4.1.4) auf einen Superfrost-Objektträger aufgezogen und fixiert. In regelmäßigen Abständen wurden außerdem 8 µm dicke Schnitte für Hämatoxylin-Eosin-Färbungen hergestellt. Die Schnitte wurden ebenfalls auf Trockeneis transportiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

### 4.1.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbungen

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) handelt es sich um ein histologisches Standardverfahren, das sich vor allem für Übersichtsfärbungen von Gewebeschnitten eignet. Verwendet wurde Alaun-Hämatoxylin, ein basischer Farbstoff, der sich somit an negativ geladenen Strukturen anlagert. Dadurch kommt es zu einer kräftigen Blaufärbung basophiler Strukturen, beispielsweise der Zellkerne. Eosin hingegen ist ein saurer Farbstoff, der dementsprechend positiv geladene Strukturen anfärbt, eine rötliche Färbung des Zytoplasmas und anderer acidophiler Strukturen wird somit erreicht [3-5].

Es wurden 8 µm dicke Gefrierschnitte verwendet, die bei -80 °C gelagert wurden. Diese wurden direkt nach der Entnahme aus dem Gefrierschrank für 10 Minuten mit 4 °C kaltem Aceton inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für je 5 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe mit 100 prozentigem, 95 prozentigem und 50 prozentigem Ethanol inkubiert. Danach wurden sie mit destilliertem Wasser gespült und dann für 5 Minuten in Hämalaun inkubiert, um negative geladene Bestandteile zu färben. Unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte für 10 Minuten gebläut und im Anschluss erneut mit destilliertem Wasser gespült. Es erfolgte die Färbung acidophiler Strukturen mittels Eosin für weitere 2 Minuten. Danach wurde eine weitere Spülung mit destilliertem Wasser durchgeführt. Die gefärbten Schnitte wurden daraufhin zum Entwässern sofort für zwei Minuten in reines Ethanol gestellt, nach einer Minute wurde das Ethanol ausgewechselt. Nach Trocknung der Schnitte für 20 min bei 56 °C im Trockenschrank wurden die gefärbten Schnitte mit Entellan eingedeckt. Zur Fotodokumentation wurde die ZEN (blue Edition)-Software am Axioskop 2-Mikroskop verwendet.

### 4.1.3 CYP11B1- und CYP11B2-Immunhistochemie

Grundlage der immunhistochemischen Färbung ist das spezifische Binden monoklonaler Antikörper (Primärantikörper) an Epitope. Nicht gebundene Antikörper werden durch

## 4 Methoden

Waschschritte entfernt und in einem nächsten Schritt werden Sekundärantikörper hinzugegeben. Letztere sind gegen die Primärantikörper gerichtet, sie binden deren fc-Fragmente und bleiben somit indirekt an den Epitop haften. Die Sekundärantikörper sind mit einem Enzym konjugiert, welches eine Farbreaktion katalysiert. Nach Zugabe eines passenden Substrates wird dieses von den gebundenen Enzymen umgesetzt, wodurch eine Färbung der gebundenen Region eintritt. Wir verwendeten hierfür Meerrettichperoxidase (Horse-radish-peroxidase = HRP) als Enzym und Diaminobenzidin (DAB) als chromogenes Substrat, woraus eine intensive Braunfärbung am Reaktionsort resultierte. Die Verwendung von HRP erforderte hierfür eine vorausgehenden Blockade der endogenen Peroxidase um einen unspezifischen Umsatz des Substrats zu verhindern, hierfür verwendeten wir eine methanolische Wasserstoffperoxid-Lösung [5, 97]. Als Primärantikörper wurden uns freundlicherweise sowohl von Prof. Gomez-Sanchez, (University of Mississippi) als auch von Prof. Mukai (Keio Universität Tokyo) spezifische Antikörper gegen CYP11B1 bzw. gegen CYP11B2 zur Verfügung gestellt.

### 4.1.3.1 Primärantikörper der University of Mississippi

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, sofern nicht anders angegeben.

Nach dem Auftauen und Umranden der Schnitte, wurden diese für 5 Minuten mit -20 °C kaltem Paraformaldehyd (4 %) inkubiert und im Anschluss einmal in phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphat bufferde saline = PBS) gewaschen. Zur Hemmung der endogenen Peroxidase wurden auf jeden Schnitt 150 µl einer dreiprozentigen Wasserstoffperoxid-in-Methanol-Lösung gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation mit der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung wurden die Schnitte fünfmal mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurde humanes Antikörper-Serum 1:5 in PBS verdünnt und je 150 µl auf jeden Schnitt gegeben. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde das Antikörper-Serum abgekippt und die Primärantikörper auf die Schnitte gegeben. Hierfür wurden die CYP11B1-Antikörper 1:100, die CYP11B2-Antikörper 1:200 mit PBS verdünnt und je 200 µl des jeweiligen Antikörpers auf einen Schnitt gegeben. Die Schnitte wurden so über Nacht bei 4 °C mit den Primärantikörpern inkubiert.

## 4 Methoden

Am Folgetag wurden die Primärantikörper vorsichtig abgekippt und die Schnitte fünfmal in PBS gewaschen. Danach erfolgte für 20 Minuten die Inkubation mit den HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern bei Raumtemperatur. Nach drei fünfminütigen Waschschritten mit PBS wurde im Dunkeln für weitere 20 Minuten die Enzymlösung auf die Schnitte gegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen für fünf Minuten mit PBS erfolgte für 10 Minuten die Inkubation mit DAB. Dafür wurden 30 µl DAB in 1,5 ml Substratpuffer gegeben. Zur Gegenfärbung wurden die Gefrierschnitte nach dreimaligem Waschen mit Leitungswasser für zwei Minuten in Hämalaunlösung gestellt und anschließend für fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach kurzem Abspülen mit reinem Ethanol wurden die gefärbten Gewebeschnitte für 20 Minuten bei 56 °C im Trockenschrank getrocknet, bevor sie mit Entellan eingedeckt wurden.

### 4.1.3.2 Primärantikörper der Keio Universität Tokyo

Diese Färbung, entsprach bis auf die nachfolgenden Abweichungen, dem Protokoll der Antikörper von Prof. Gomez-Sanchez (siehe Abschnitt 4.1.3.1). Die Primärantikörper (Anti-CYP11B1- und Anti-CYP11B2-Antikörper), wurden 1:1000 in PBS verdünnt und ebenfalls über Nacht auf die Gewebeschnitte gegeben. Am Folgetag wurden die so behandelten Schnitte fünfmal in PBS gewaschen und dann mit HRP-gekoppelten Anti-Rabbit-Sekundärantikörpern für eine Stunde inkubiert. Die Applikation von DAB und Gegenfärbung mit Hämalaun erfolgte wieder wie in Abschnitt 4.1.3.1 geschildert.

### 4.1.4 Bindungsstudie an Gefrierschnitten

Für die Bindungsstudien wurden je zwei 20 µm dicke Gewebeschnitte auf einen Superfrost-Objektträger aufgezogen. Sie dienten dazu, eine selektive Bindung der [<sup>18</sup>F]Tracer an CYP11B2-exprimierenden Arealen zu überprüfen. Die Gefrierschnitte wurden zur Vorbereitung bei Raumtemperatur aufgetaut und dann für fünf Minuten in -20 °C kaltes PFA gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden sie für weitere fünf Minuten in 50 mM Tris-hydroxymethyl-aminomethan (TRIS) mit einem pH von 7,4 gegeben. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit humanem Antikörper-Serum für eine Stunde, dieses wurde danach abgekippt und dann sofort die frisch synthetisierten Tracer appliziert. Um die selektive Bindung zu überprüfen, wurde immer ein Schnitt des Objektträgers mit 200 µl Tracer-Lösung inkubiert, der zweite Schnitt als Negativkontrolle mit 200 µl einer

## 4 Methoden

Tracer-Lösung, zu der eine 10  $\mu\text{M}$  Lösung des zugehörigen, nicht [ $^{18}\text{F}$ ]-markierten Aldosteronsynthese-Inhibitors gegeben wurde. Dieser Schritt diente dazu auf diesem Schnitt die Bindungsstellen zu blockieren und so ein Anhaften des Tracers zu verhindern.

Für die einzelnen Substanzen wurden eigene Protokolle für die weitere Durchführung entwickelt, die im Folgenden beschrieben werden.

### 4.1.4.1 Substanz 3 und 4

Die Schnitte wurden mit je 1 MBq des Tracers für eine Stunde inkubiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit PBS, wobei PBS direkt auf die Schnitte pipettiert wurde, um ein Vermischen der geblockten mit der markierten Seite zu verhindern. Im Anschluss wurden sie für zweimal fünf Minuten in einer 50 mM TRIS-Lösung mit Zusatz von 0,05 % Tween 20 gewaschen. Die so behandelten Schnitte wurden dann für 30 Minuten auf die Imageplatte gelegt.

### 4.1.4.2 Substanz 5

Die Schnitte wurden mit je 1 MBq des Tracers für eine Stunde inkubiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit PBS, wobei PBS direkt auf die Schnitte pipettiert wurde, um ein Vermischen der geblockten mit der markierten Seite zu verhindern. Im Anschluss wurden sie für zweimal fünf Minuten in einer 50 mM TRIS-Lösung gewaschen. Die so behandelten Schnitte wurden dann für eine Stunde auf die Imageplatte gelegt.

### 4.1.4.3 Substanz 10

Die Schnitte wurden mit je 2 MBq des Tracers für eine Stunde inkubiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit PBS, wobei PBS direkt auf die Schnitte pipettiert wurde, um ein Vermischen der geblockten mit der markierten Seite zu verhindern. Im Anschluss wurden sie für fünf Minuten in einer 50 mM TRIS-Lösung mit Zusatz von 2 % Tween 20 gewaschen. Die so behandelten Schnitte wurden dann für 30 Minuten auf die Imageplatte gelegt.

## **4 Methoden**

### **4.1.4.4 Substanz 11**

Die Schnitte wurden mit je 2 MBq des Tracers für eine Stunde inkubiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit PBS, wobei PBS direkt auf die Schnitte pipettiert wurde, um ein Vermischen der geblockten mit der markierten Seite zu verhindern. Danach wurden vier verschiedene Waschstrategien getestet: Dreimal fünf Minuten in TRIS waschen, einmal fünf Minuten in TRIS mit 0,05 % Tween 20, zweimal fünf Minuten in TRIS mit 0,05 % Tween 20 oder dreimal fünf Minuten TRIS mit 0,05 % Tween 20. Die so behandelten Schnitte wurden dann für 30 Minuten auf die Imageplatte gelegt.

### **4.1.4.5 Auswertung der Imageplatte**

Die belichteten Imageplatten wurden nach den Versuchen mit dem Imageplate Reader CR 35 BIO ausgelesen. Dafür wurde die Software CR Reader genutzt. Die Bilder wurden in den Dateiformaten „.dat“ und „.xyz“ gespeichert und mit der Amide-Software [98] ausgewertet.

## 5 Ergebnisse

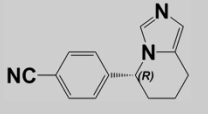
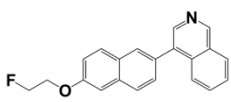
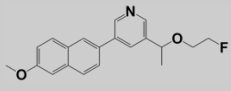
### 5.1 Zellbiologische Verfahren

Insgesamt wurden 11 Inhibitoren und als Referenz FAD286 in je drei getrennten Ansätzen getestet. Aus den jeweiligen Hormonkonzentrationen der vier Kontroll-Wellen (500.000 Zellen/Well ohne Inhibitor) wurde für jeden Ansatz der Mittelwert bestimmt und als 100 %-Wert gewertet. Auf Basis dessen wurde für jede Substanz in jedem Durchgang der IC<sub>50</sub>-Wert der Hormonproduktion bestimmt und daraus die Selektivitätsfaktoren errechnet. Alle Inhibitoren und FAD286 wurden in den fünf Zellreihen NCI-H295, Y1-hsCYP11B1, Y1-hsCYP11B2, V79CYP11B1 und V79CYP11B2 getestet.

#### 5.1.1 Effekte der Inhibitoren auf Y1-hsCYP11B1- und Y1-hsCYP11B2-Zellen

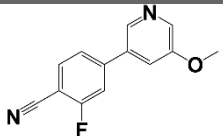
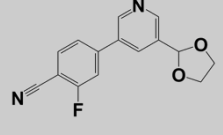
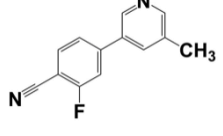
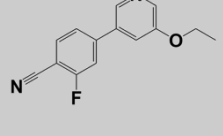
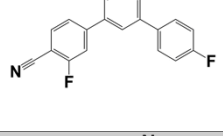
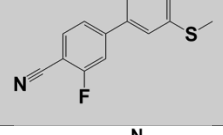
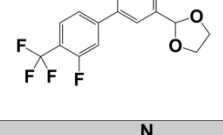
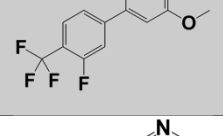
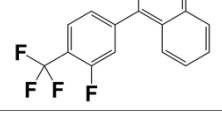
In den beiden Y1-Zelllinien wurden die Inhibitoren in zwei getrennten Ansätzen jeweils in drei Durchgängen getestet und daraus die Mittelwerte bestimmt. Die Substanzen zeigten hierbei Selektivitätsfaktoren zwischen 24,4 (Substanz 8) und 129,9 (Substanz 9), der Selektivitätsfaktor von FAD286 lag bei 4,7. Tab. 9 zeigt die IC<sub>50</sub>-Werte mit Standardabweichungen und Selektivitätsfaktoren aller getesteten Substanzen. Inhibitor 4 hatte mit 1,1 nM den niedrigsten IC<sub>50</sub>-Wert für die CYP11B2-Inhibition.

**TAB. 9** IC<sub>50</sub>-WERTE UND SELEKTIVITÄTSFAKTOREN DER INHIBITOREN IN BEIDEN Y1-ZELLINIEN  
Vergleich der Inhibitoren und FAD286 in Y1-hsCYP11B1- und Y1-hsCYP11B2-Zellen.

Nr.	Strukturformel	IC <sub>50</sub> CYP11B1 [nM]	IC <sub>50</sub> CYP11B2 [nM]	Selektivitäts- faktor
<b>FAD286</b>		65,8 ± 25,4	13,9 ± 0,8	4,7
<b>1</b>		1515,0 ± 90,1	25,6 ± 6,9	59,2
<b>2</b>		377,7 ± 37,1	7,0 ± 2,5	54,0



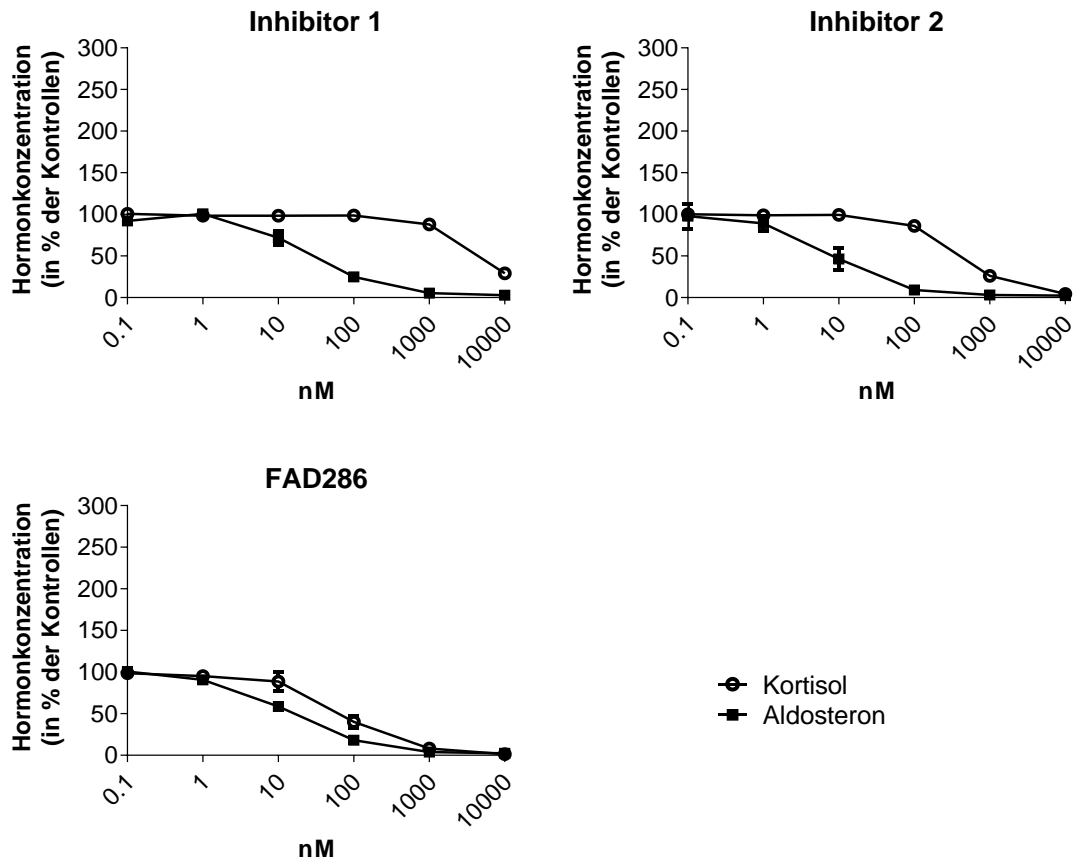
## 5 Ergebnisse

Nr.	Strukturformel	IC <sub>50</sub> CYP11B1 [nM]	IC <sub>50</sub> CYP11B2 [nM]	Selektivitäts- faktor
3		179,5 ± 10,1	6,5 ± 2,4	27,6
4		40,2 ± 16,3	1,1 ± 0,4	36,5
5		169,5 ± 74,5	2,3 ± 0,9	73,7
6		85,0 ± 21,8	2,8 ± 0,9	30,4
7		79,2 ± 26,8	1,9 ± 0,6	41,7
8		107,3 ± 39,5	4,4 ± 2,1	24,4
9		441,7 ± 175,0	3,4 ± 1,1	129,9
10		1392,7 ± 146,1	21,4 ± 5,5	65,1
11		1184,3 ± 210,7	12,1 ± 2,8	97,9

In Abb. 10 und Abb. 11 sind die Inhibition der Kortisol- und Aldosteron-Synthese in den beiden Y1-Zelllinien für die Inhibitoren 1 und 2, bzw. 3-8 graphisch dargestellt. Abb. 12 zeigt die Inhibition der Kortisol- und Aldosteronsynthese nach Gabe der Inhibitoren 9-11. Der 100 %-Wert entspricht der Konzentration in den vier Kontrollen, die ohne Zugabe eines Inhibitors gemessen wurden. Bei allen gezeigten Inhibitoren findet unter einer

## 5 Ergebnisse

10 nM Konzentration keine relevante Inhibition der Kortisol-Synthese statt, während die Aldosteron-Konzentration schon bei kleineren Inhibitoren-Konzentrationen fällt.



**ABB. 10** GRAPHISCHE AUSWERTUNG DER NAPHTYLPYRIDINE (INHIBITOREN 1 UND 2) IM VERGLEICH ZU FAD286 IN Y1-HSCYP11B1- UND Y1-HSCYP11B2-ZELLEN

Gezeigt sind jeweils die Kortisol- und Aldosteron-Konzentration nach 48 Stunden Inkubation mit dem jeweiligen Naphtylpyridin in Konzentrationen zwischen 0,1 nM und 10  $\mu$ M.

## 5 Ergebnisse

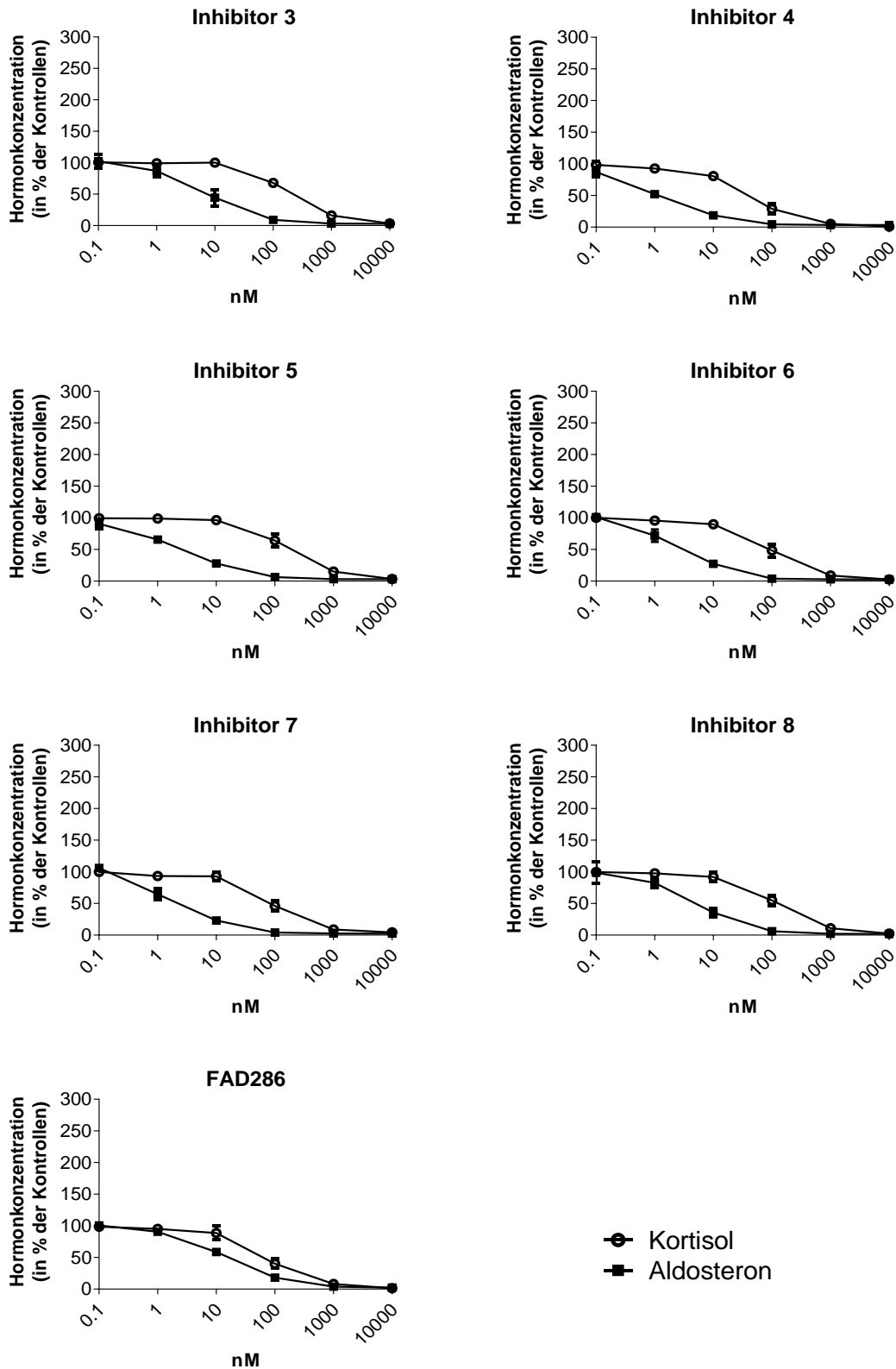
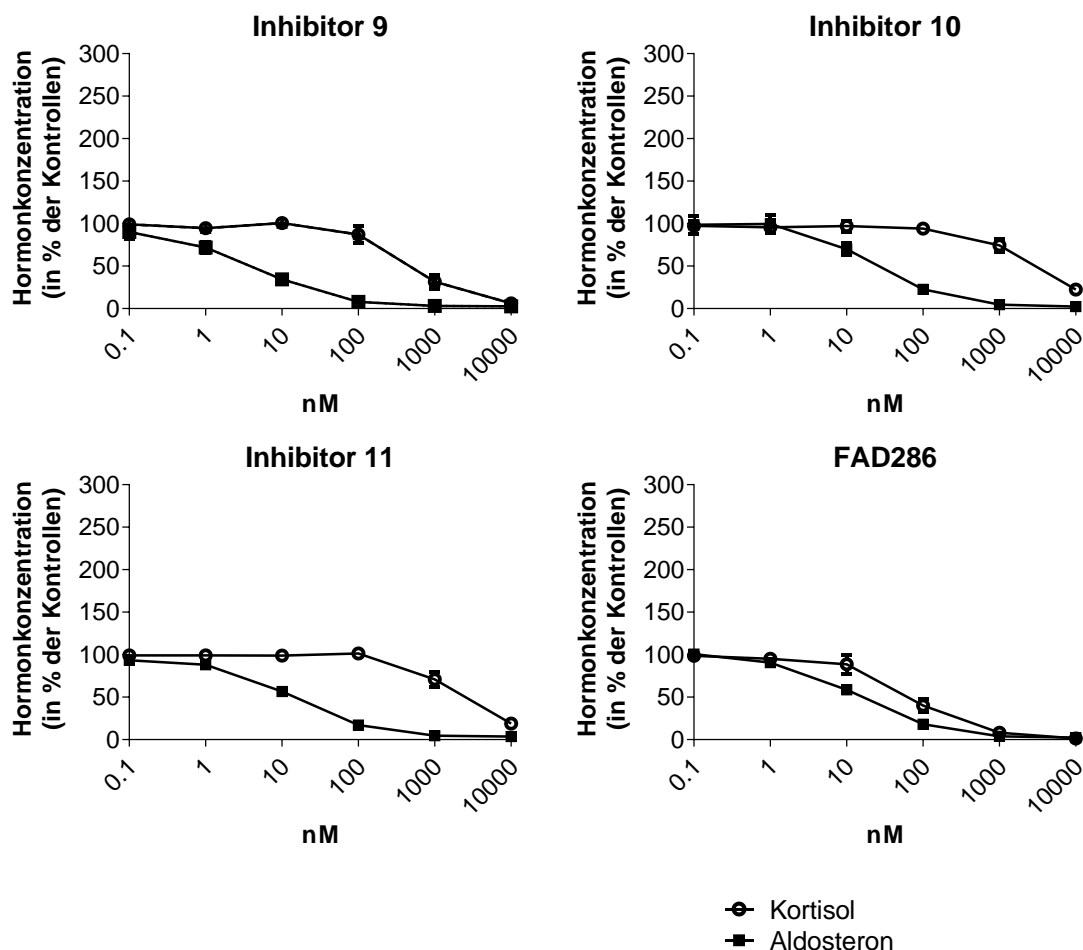


ABB. 11 GRAPHISCHE AUSWERTUNG DER CYANOFLUORPHENYLPYRIDINE (INHIBITOREN 3-8) IM VERGLEICH ZU FAD286 IN Y1-HSCYP11B1- UND Y1-HSCYP11B2-ZELLEN

## 5 Ergebnisse

Gezeigt sind jeweils die Kortisol- und Aldosteron-Konzentration nach 48 Stunden Inkubation mit dem jeweiligen Cyanofluorphenylpyridin in Konzentrationen zwischen 0,1 nM und 10  $\mu$ M.



**ABB. 12 GRAPHISCHE AUSWERTUNG DER TRIFLUORMETHYLFLUORPHENYLPYRIDINE (INHIBITOREN 9-11) IM VERGLEICH ZU FAD286 IN Y1-HSCYP11B1- UND Y1-HSCYP11B2-ZELLEN**  
Gezeigt sind jeweils die Kortisol- und Aldosteron-Konzentration nach 48 Stunden Inkubation mit dem jeweiligen Trifluormethylfluorphenylpyridine in Konzentrationen zwischen 0,1 nM und 10  $\mu$ M.

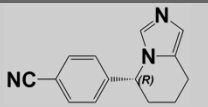
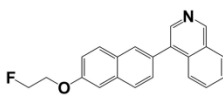
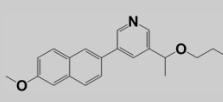
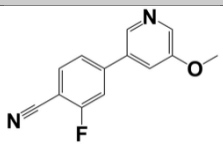
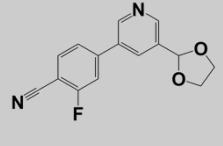
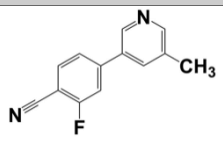
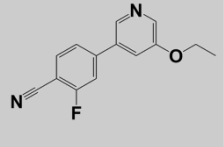
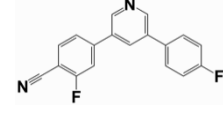
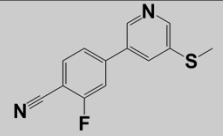
### 5.1.2 Effekte der Inhibitoren auf NCI-H295-Zellen

Neben dem Einfluss auf die Kortisol- und Aldosteron-Synthese wurde in den NCI-H295-Zellen auch die Konzentration von 17-Hydroxy-Progesteron und Androstendion nach Zugabe der Inhibitoren bestimmt. Da NCI-H295-Zellen die zuständigen Enzyme simultan exprimieren, konnten alle Hormonkonzentrationen aus einem gemeinsamen

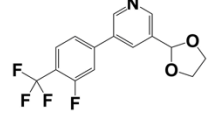
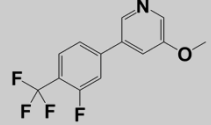
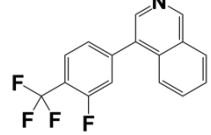
## 5 Ergebnisse

Versuchsansatz bestimmt werden. Als Vergleichssubstanz diente wieder FAD286, dessen Selektivitätsfaktor in NCI-H295-Zellen bei 3,8 lag. Die getesteten Inhibitoren wiesen hingegen Selektivitätsfaktoren zwischen 6,1 (Substanz 8) und 64,4 (Substanz 1) auf.

**TAB. 10 IC<sub>50</sub>-WERTE UND SELEKTIVITÄTSFAKTOREN DER INHIBITOREN IN DER NCI-H295-ZELLINIE**  
Vergleich der Inhibitoren und FAD286 in den NCI-H295-Zellen-H295-Zellen.

Nr.	Strukturformel	IC <sub>50</sub> CYP11B1 [nM]	IC <sub>50</sub> CYP11B2 [nM]	Selektivitäts- faktor
<b>FAD286</b>		74,3 ± 55,3	19,4 ± 12,8	3,8
<b>1</b>		1094,3 ± 75,6	17,0 ± 6,2	64,4
<b>2</b>		128,3 ± 102,0	5,6 ± 1,4	22,9
<b>3</b>		56,0 ± 36,1	2,3 ± 1,0	24
<b>4</b>		14,5 ± 8,1	1,0 ± 0,4	14,5
<b>5</b>		47,9 ± 9,9	5,2 ± 2,5	9,2
<b>6</b>		24,4 ± 22,7	1,9 ± 0,8	12,8
<b>7</b>		23,6 ± 18,8	1,1 ± 0,5	23,4
<b>8</b>		20,8 ± 14,1	3,4 ± 1,0	6,1

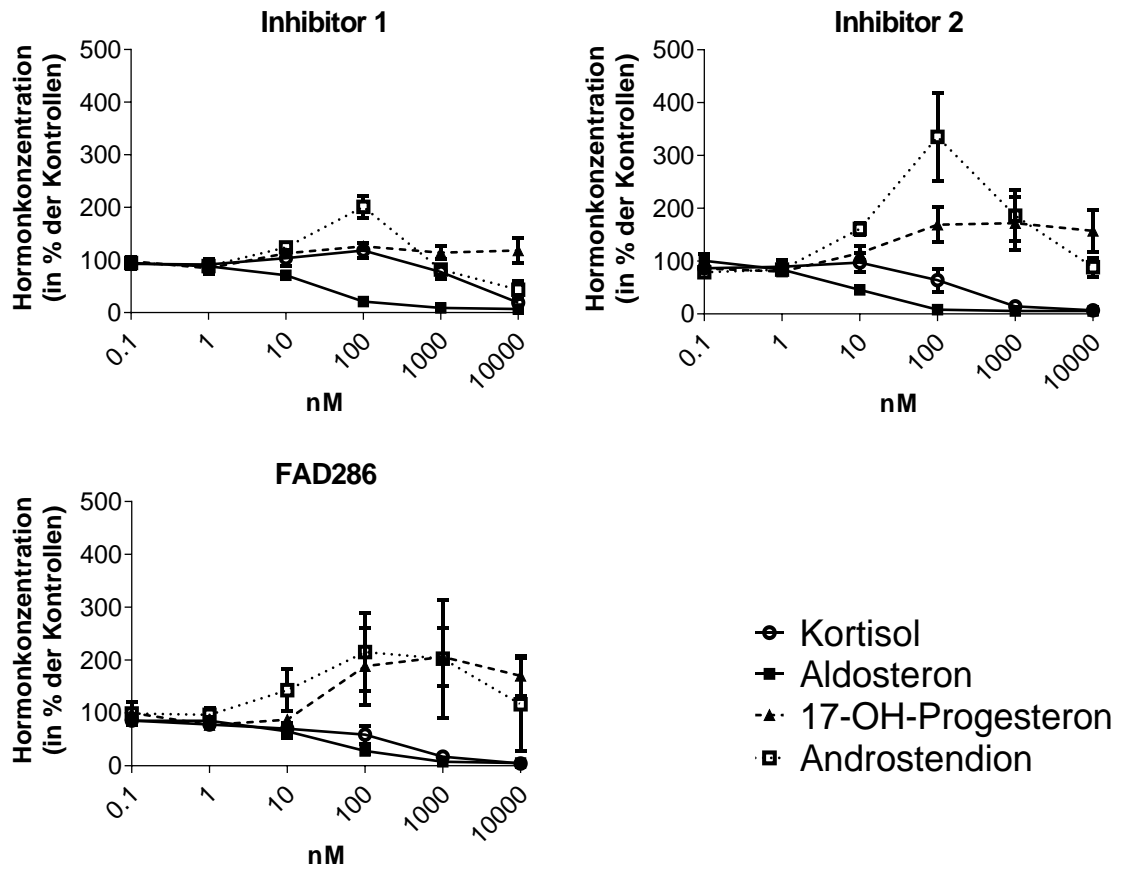
## 5 Ergebnisse

Nr.	Strukturformel	IC <sub>50</sub> CYP11B1 [nM]	IC <sub>50</sub> CYP11B2 [nM]	Selektivitäts- faktor
9		158,0 ± 110,8	8,5 ± 5,2	18,6
10		258,4 ± 84,8	23,2 ± 6,3	11,1
11		561,9 ± 264,9	16,7 ± 9,8	33,6

Durch das gleichzeitige Expressieren aller Enzyme konnte neben den Einflüssen der Inhibitoren auf die Kortisol- und Aldosteron-Synthese auch die Effekte auf die Synthese der anderen Steroidhormone getestet werden. Die Konzentrationen der verschiedenen

## 5 Ergebnisse

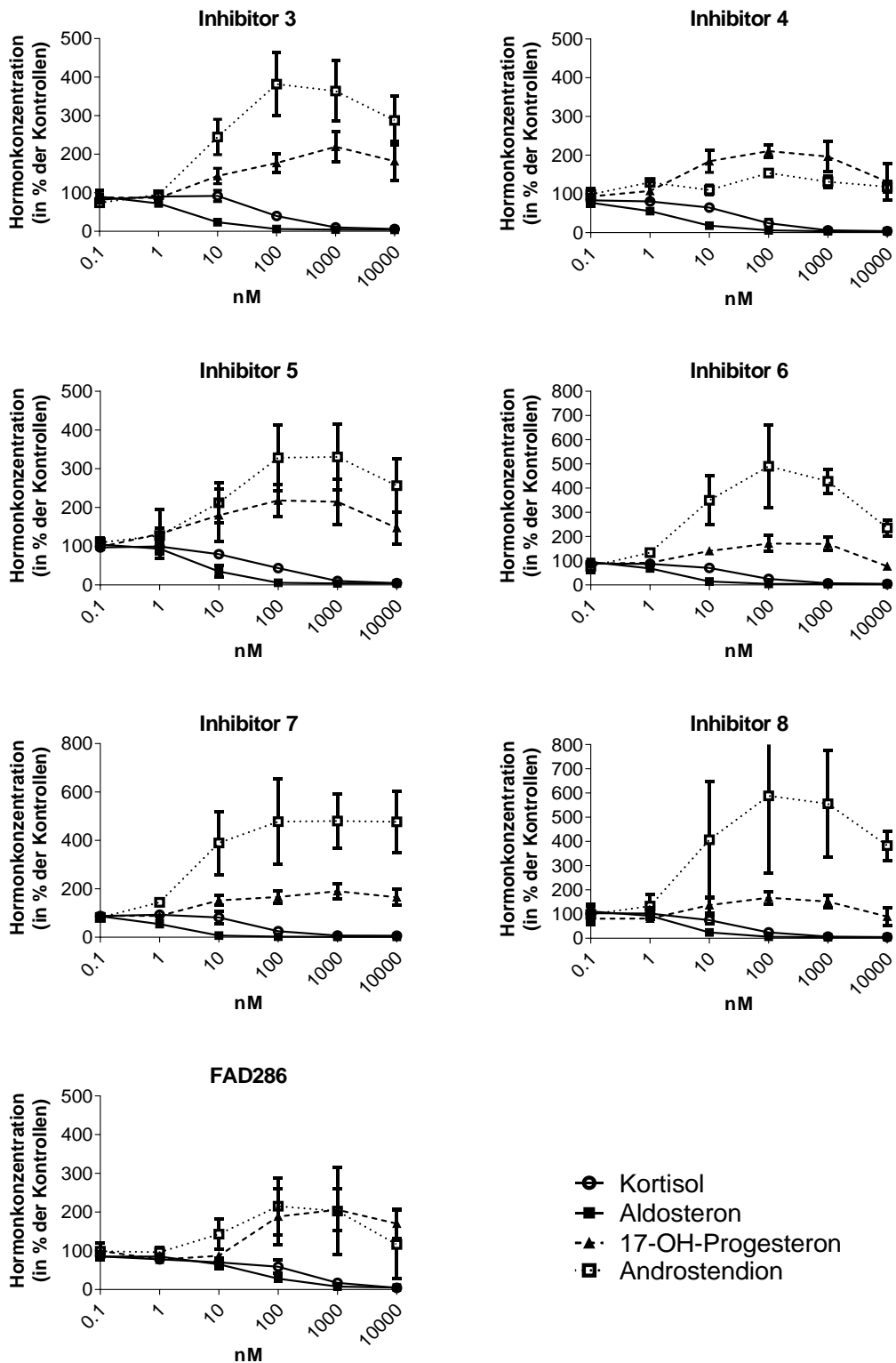
Hormone unter steigender Inhibitor-Dosis werden in den nachfolgenden Abbildungen, getrennt nach Stoffklasse, gezeigt. Als Vergleichsubstanz ist immer FAD286 dargestellt.



**ABB. 13 GRAPHISCHE AUSWERTUNG DER NAPHTHYLPYRIDINE (INHIBITOREN 1 UND 2) IM VERGLEICH ZU FAD286 IN NCI-H295-ZELLEN**

Gezeigt sind jeweils die Kortisol-, Aldosteron-, 17-Hydroxy-Progesteron und Androstendion-Konzentration nach 48 Stunden Inkubation mit dem jeweiligen Naphthylpyridin in Konzentrationen zwischen 0,1 nM und 10  $\mu$ M.

## 5 Ergebnisse

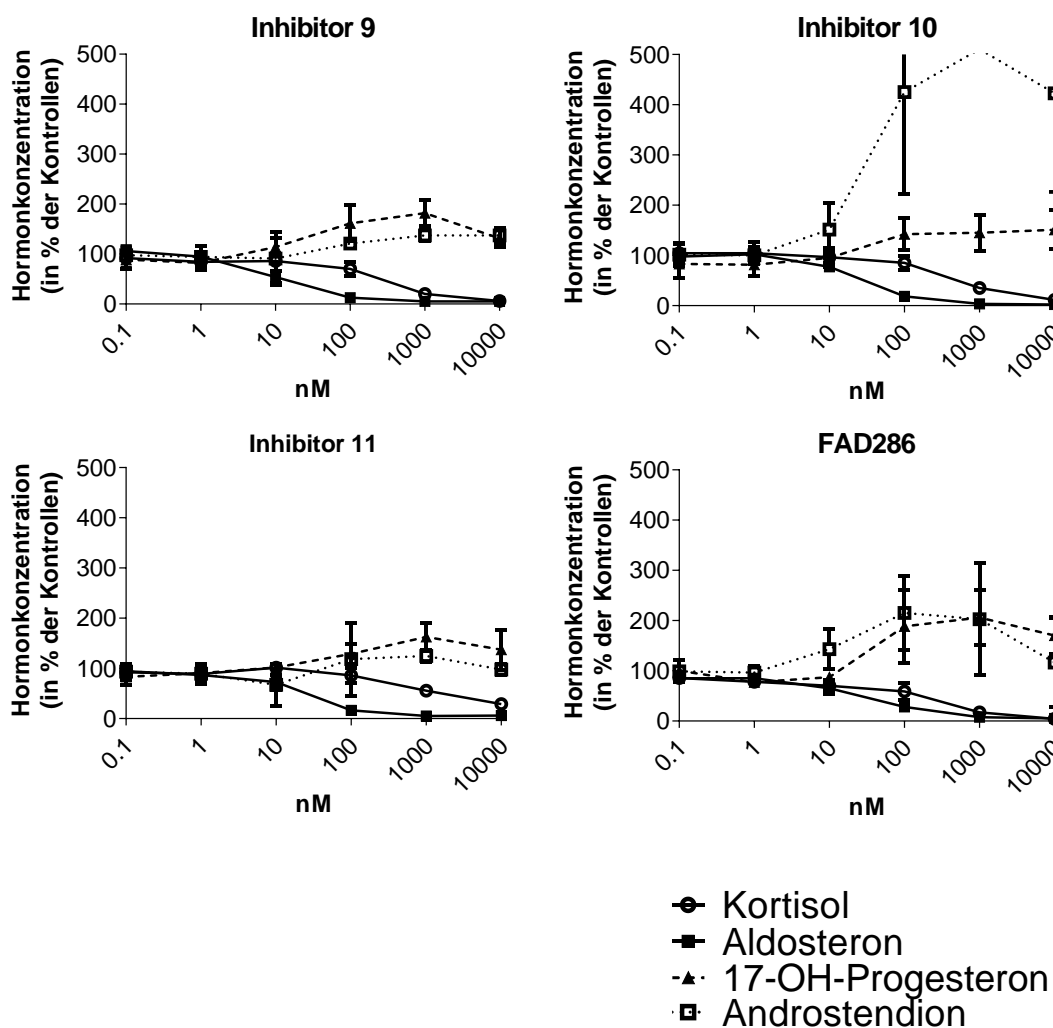


**ABB. 14 GRAPHISCHE AUSWERTUNG DER CYANOFLUORPHENYLPYRIDINE (INHIBITOREN 3-8) IM VERGLEICH MIT FAD286 IN NCI-H295-ZELLEN**

Gezeigt sind jeweils die Kortisol-, Aldosteron-, 17-Hydroxy-Progesteron und Androstendion-Konzentration nach 48 Stunden Inkubation mit dem jeweiligen Cyanofluorphenylpyridin in Konzentrationen zwischen 0,1 nM und 10  $\mu$ M.



## 5 Ergebnisse



**ABB. 15 GRAPHISCHE AUSWERTUNG DER TRIFLUORMETHYLFLUORPHENYLPYRIDINE (INHIBITOREN 9-11) IM VERGLEICH ZU FAD286 IN NCI-H295-ZELLEN**

Gezeigt sind jeweils die Kortisol-, Aldosteron-, 17-Hydroxy-Progesteron und Androstendion-Konzentration nach 48 Stunden Inkubation mit dem jeweiligen Trifluormethylfluorphenylpyridine in Konzentrationen zwischen 0,1 nM und 10  $\mu$ M.

Allen Stoffklassen ist gemein, dass ab einer 10 nM Inhibitor-Konzentration, neben einer Inhibition der Aldosteron- und/oder Kortisol-Synthese eine initiale Zunahme der Androstendion- und 17-Hydroxy-Progesteron-Konzentration zu beobachten ist, die in höheren Konzentrationen wieder abnimmt. Ähnliche Effekte haben in der Vergangenheit bereits Studien mit anderen Imidazolderivaten wie Etomidat gezeigt (vgl. Abschnitt 1.3.4.2). So konnte nach Gabe von Etomidat in niedrigen Dosierungen zunächst eine Inhibition von CYP11B1 und CYP11B2 beobachtet werden, die Konzentration von

## 5 Ergebnisse

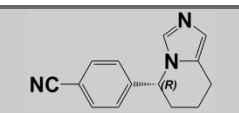
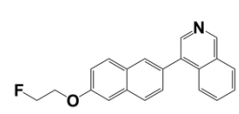
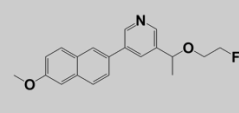
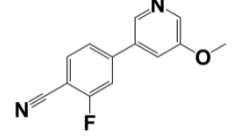
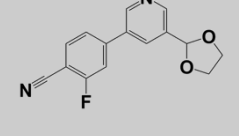
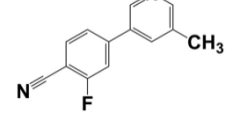
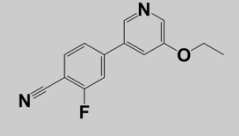
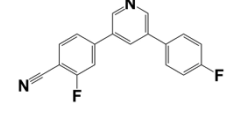
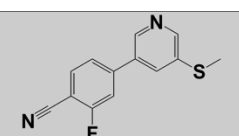
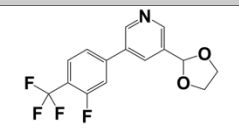
Kortisol und Aldosteron sank. Dadurch kam es zu einer Akkumulation der Hormonvorstufen und einer vermehrten Androgenproduktion – die Konzentration von 17-Hydroxyprogesteron und Androstendion stieg. In hohen Dosen kam es jedoch zu einer zunehmenden Inhibition des side chain cleavage-Enzyms CYP11A1 (Cholesterin-Desmolase), welches die Umwandlung von Cholesterin zu Pregnenolon katalysiert (vgl. Abschnitt 1.2.2). Als Folge dessen kam die gesamte Steroidhormonsynthese zum Erliegen und die Konzentration sämtlicher getesteter Steroidhormone nahm ab [54, 56, 61, 99]. Es ist daher wahrscheinlich, dass die von uns beobachteten Konzentrationsschwankungen durch den gleichen Mechanismus hervorgerufen wurden.

### 5.1.3 Effekte der Inhibitoren auf V79CYP11B1- und V79CYP11B2-Zellen

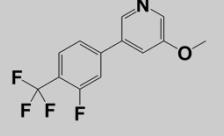
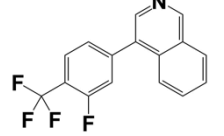
Bei den Versuchen mit den beiden V79-Zelllinien lag der Selektivitätsfaktor von FAD286 bei 1,5. Inhibitor 1 hatte einen Selektivitätsfaktor von 1,6. Alle anderen Inhibitoren zeigten Selektivitätsfaktoren unter 1, sie hemmten die Kortikosteron-Synthese folglich stärker als die Aldosteron-Synthese (siehe Tab. 11).

## 5 Ergebnisse

**TAB. 11 IC<sub>50</sub>-WERTE UND SELEKTIVITÄTSFAKTOREN DER INHIBITOREN IN BEIDEN V79-ZELLINIEN**  
 Vergleich der Inhibitoren und FAD286 in V79CYP11B1- und V79CYP11B2-Zellen.

Nr.	Strukturformel	IC <sub>50</sub> CYP11B1 [nM]	IC <sub>50</sub> CYP11B2 [nM]	Selektivitäts- faktor
<b>FAD286</b>		594,9 ± 445,6	386,7 ± 266,3	1,5
<b>1</b>		318,4 ± 0,2	205,4 ± 288,3	1,6
<b>2</b>		0,2 ± 0,3	774 ± 127,9	<0,1
<b>3</b>		1,2 ± 1,1	411 ± 341,5	<0,1
<b>4</b>		156,2 ± 262,9	650,2 ± 183,5	0,2
<b>5</b>		57,4 ± 92,2	576,9 ± 396,4	0,1
<b>6</b>		132,1 ± 227	413,5 ± 190,4	0,3
<b>7</b>		78,4 ± 114,8	1027,9 ± 196,22	0,1
<b>8</b>		35,2 ± 43,9	593,3 ± 320,4	0,1
<b>9</b>		9,8 ± 15,5	253,1 ± 422,1	<0,1

## 5 Ergebnisse

Nr.	Strukturformel	IC <sub>50</sub> CYP11B1 [nM]	IC <sub>50</sub> CYP11B2 [nM]	Selektivitäts- faktor
10		166,6 ± 9,8	2659,6 ± 2785,1	0,1
11		86,1 ± 149,2	1666,3 ± 103,8	0,1

### 5.2 *In-vivo*-Experimente

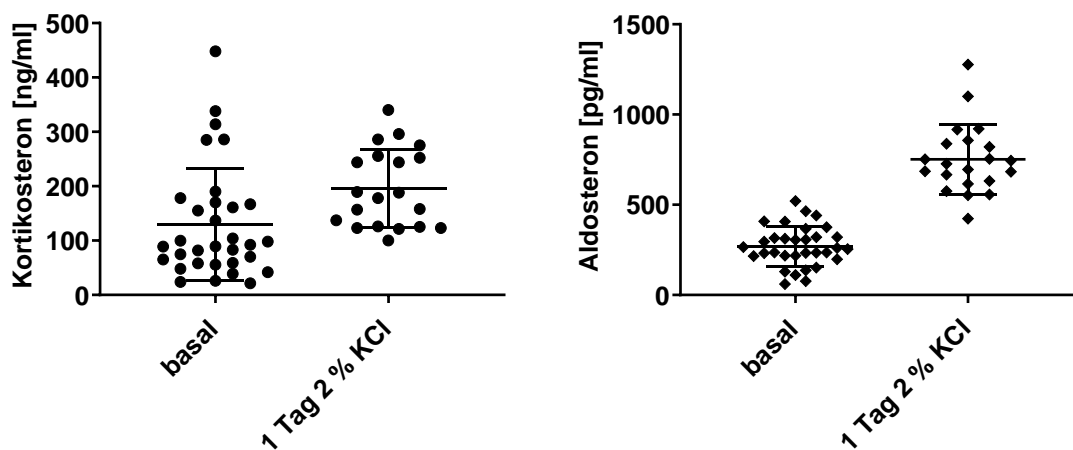
In den *in-vivo*-Experimenten wurde einerseits der Einfluss einer KCl-Substitution über das Trinkwasser der Versuchstiere auf die Kortikosteron- und Aldosteron-Sekretion untersucht. Andererseits wurden die *in-vivo*-Wirkung der Inhibitoren 4 und 5 getestet.

#### 5.2.1 Einfluss der KCl-Stimulation auf die Steroidhormonsynthese

Um die Effekte der Inhibitoren auf eine gesteigerte Aldosteronproduktion abzuschätzen, wurde versucht, mittels Kaliumsubstitution die Aldosteron-Synthese der Versuchstiere zu stimulieren. Hierfür wurde am Vortag der eigentlichen Experimente dem Trinkwasser der Versuchstiere 2 % Kaliumchlorid (KCl) beigefügt. Wie in Abb. 16 dargestellt, kam es hierunter zu einer deutlichen Zunahme der Aldosteronkonzentration von im Mittel

## 5 Ergebnisse

269,6 pg/ml auf 752,2 pg/ml. Die Kortisol-Konzentration stieg hingegen nur von 131,7 ng/ml auf 218,4 ng/ml.



**ABB. 16 EINFLUSS DER KALIUMCHLORID-SUBSTITUTION AUF KORTIKOSTERON UND ALDOSTERON**  
Gezeigt sind die Hormon-Konzentrationen der Versuchstiere vor und einen Tag nach KCl-Substitution.

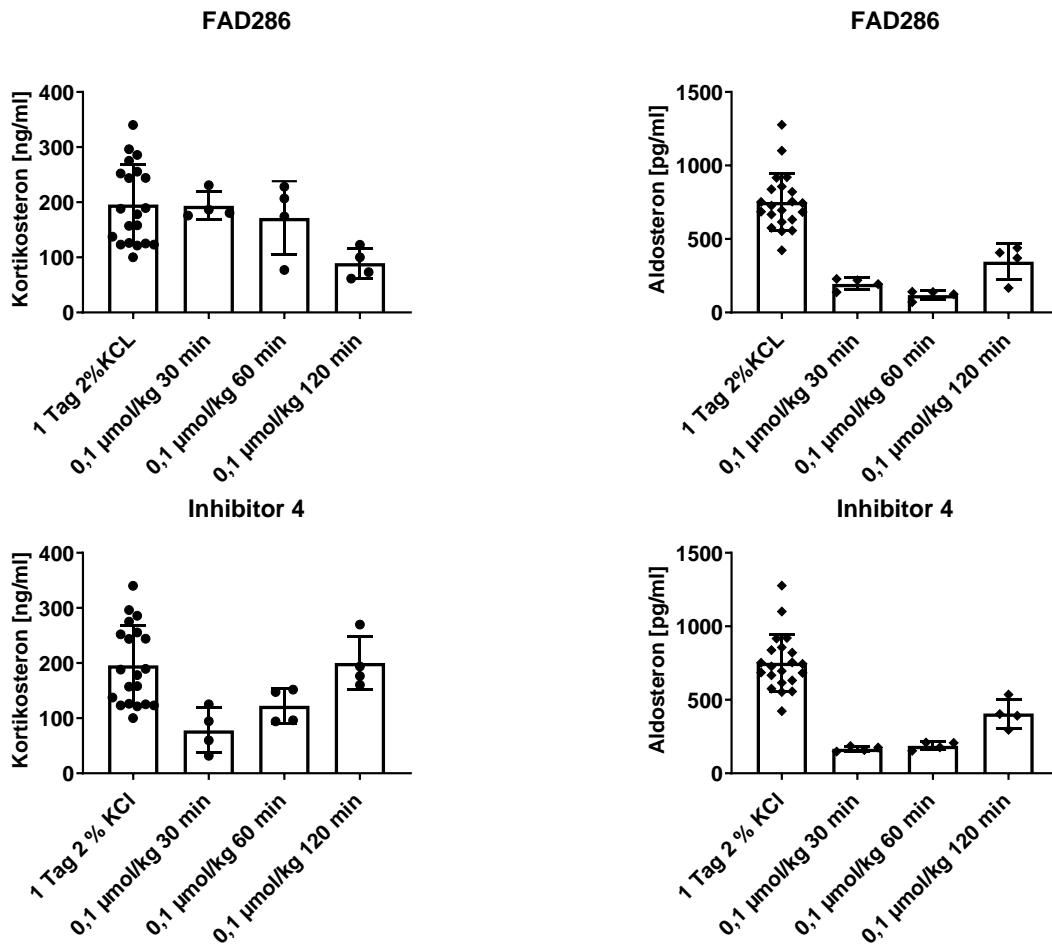
### 5.2.2 Effekte der Inhibitoren auf die Steroidhormonsynthese im Vergleich

Getestet wurden sowohl unterschiedliche Inkubationszeiten, als auch verschiedene Dosen der Inhibitoren, immer im Vergleich zu FAD286. Stets wurde die Kortikosteron- und die Aldosteron-Konzentration in den Versuchstieren mittels ELISA bestimmt. Als Ausgangswerte wurden die in Abb. 16 dargestellten Hormon-Konzentrationen nach KCl-Stimulation genommen.

In Abb. 17 werden die Wirkungen von FAD286 und Inhibitor 4 nach 30, 60 und 120 Minuten auf die Kortikosteron- und Aldosteron-Synthese der teilhumanisierten Mäuse dargestellt. Bei FAD286 sank die Kortikosteron-Konzentration erst nach 120 Minuten relevant von initial 196,0 ng/ml auf 89,4 ng/ml, die Aldosteron-Konzentration fiel bereits nach 30 Minuten von 752,2 pg/ml auf 194 pg/ml. Nach 120 Minuten stieg unter FAD286 die Aldosteron-Konzentration wieder auf 346,0 pg/ml. Dreißig Minuten nach der Gabe von Inhibitor 4 sank die Kortikosteron-Konzentration von 196,0 ng/ml auf 78,0 ng/ml, die Aldosteron-Konzentration sank von 752,2 pg/ml auf 167,2 pg/ml. Für die weiteren

## 5 Ergebnisse

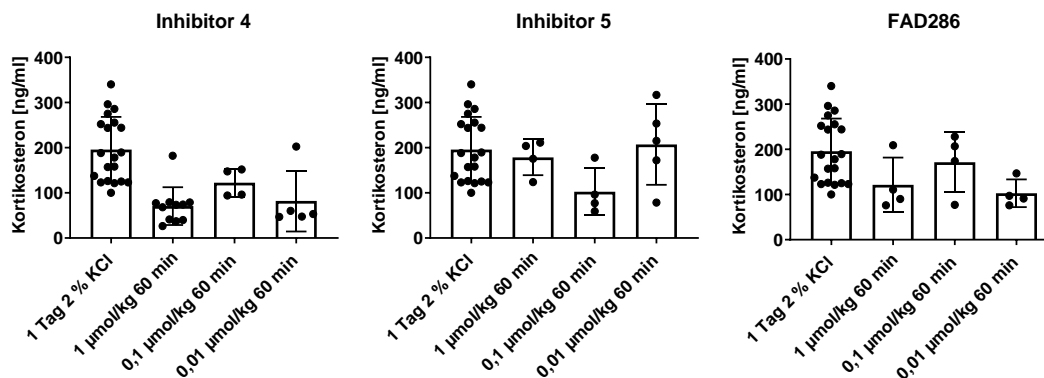
Versuche, in denen die Inhibitoren 4 und 5 in verschiedenen Konzentrationen getestet wurden, wurde auf Basis dieser Ergebnisse stets der 60 Minuten-Wert bestimmt (siehe Abb. 18 und Abb. 19).



**ABB. 17 VERGLEICH DER WIRKUNG VON FAD286 UND INHIBITOR 4 NACH 30, 60 UND 120 MINUTEN**  
Auf der linken Bildhälfte ist der Verlauf der Kortikosteron-, auf der rechten Bildhälfte der Verlauf der Aldosteron-Konzentration dargestellt.

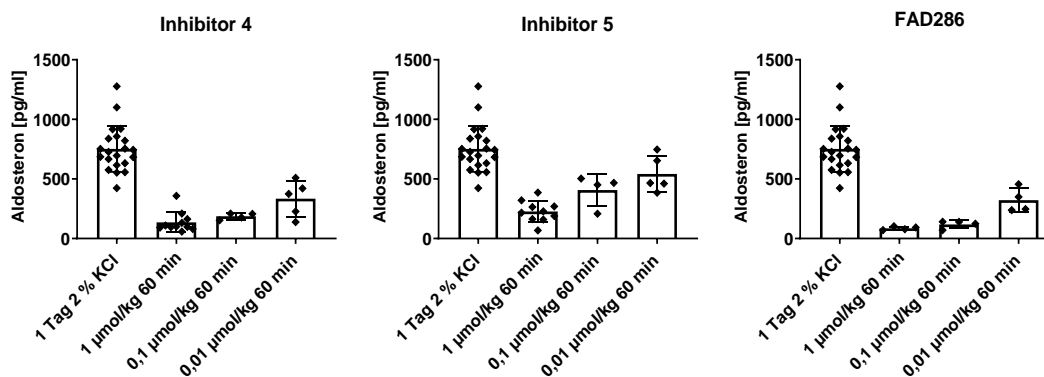
In den beiden nachfolgenden Abbildungen wird der Einfluss verschiedener Inhibitor-Konzentrationen auf die murine Kortikosteron- und Aldosteron-Synthese gezeigt. Unter FAD286 sank die Aldosteron-Konzentration in jeder Konzentration stärker als nach Gabe der Inhibitoren 4 oder 5, die Kortikosteron-Konzentration sank bei Inhibitor 5 am wenigsten (Mittelwert aller Dosierungen 162,8 ng/ml) und bei Inhibitor 4 am stärksten (Mittelwert aller Dosierungen 91,7 ng/ml). Unter FAD286 sank die Kortikosteron-Konzentration von 196,0 ng/ml auf 132,0 ng/ml (Mittelwert aller Dosierungen).

## 5 Ergebnisse



**ABB. 18 EINFLUSS DER INHIBITOREN 4 UND 5 AUF DIE KORTIKOSTERONSYNTHESE IM VERGLEICH ZU FAD286**

Gezeigt ist die Änderung der Kortikosteron-Spiegel nach Gabe der Inhibitoren, bzw. nach Gabe von FAD286 in Konzentrationen zwischen 0,01  $\mu\text{mol/kg}$  und 1  $\mu\text{mol/kg}$ . Als Ausgangswert gilt jeweils die Kortikosteron-Konzentration nach eintägiger Substitution von Kaliumchlorid über das Trinkwasser.



**ABB. 19 EINFLUSS DER INHIBITOREN 4 UND 5 AUF DIE ALDOSTERONSYNTHESE IM VERGLEICH ZU FAD286**

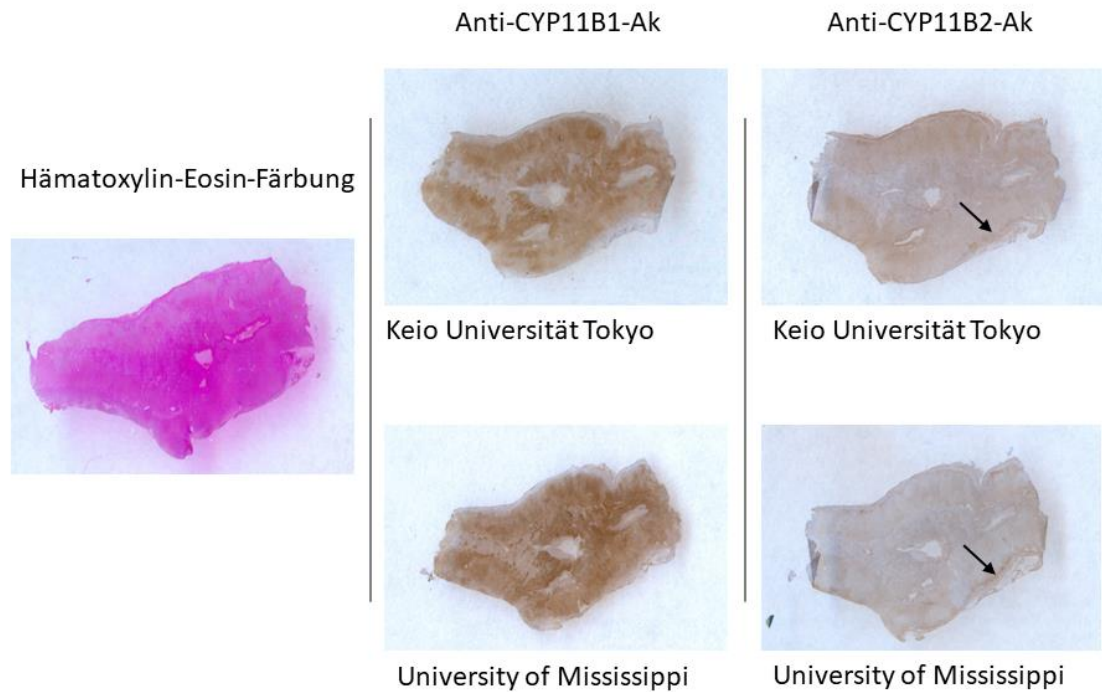
Gezeigt ist die Änderung der Aldosteron-Spiegel nach Gabe der Inhibitoren, bzw. nach Gabe von FAD286 in Konzentrationen zwischen 0,01  $\mu\text{mol/kg}$  und 1  $\mu\text{mol/kg}$ . Als Ausgangswert gilt jeweils die Aldosteron-Konzentration nach eintägiger Substitution von Kaliumchlorid über das Trinkwasser.

### 5.3 Histologische Verfahren

Die Primäntikörper, die uns von Prof. Gomez-Sanchez (University of Mississippi) und von Prof. Mukai (Keio Universität Tokyo) zur Verfügung gestellt worden waren, konnten erfolgreich in der immunhistochemischen Färbung von humanen Gewebeschnitten eingesetzt werden. Nach Inkubation der vorbereiteten Gefrierschnitte über Nacht mit den jeweiligen Primäntikörpern zeigte sich eine intensive Bindung in den typischen

## 5 Ergebnisse

Regionen. Die Antikörper von Prof. Gomez-Sanchez und von Prof. Mukai zeigten gleichwertige Ergebnisse (siehe Abb. 20).

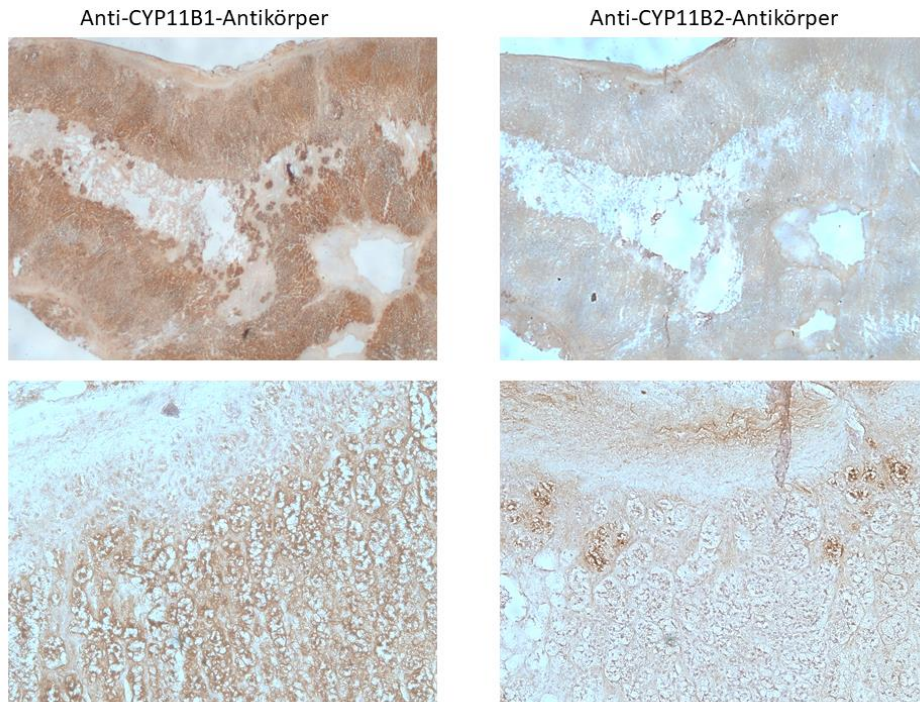


**ABB. 20 VERGLEICH DER HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG UND DER IMMUNHISTOCHEMIE**

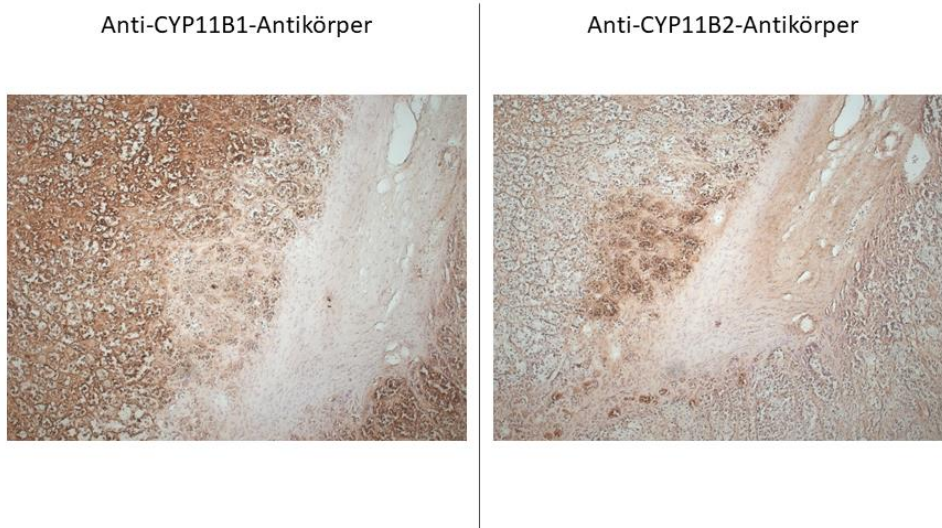
Dargestellt sind benachbarte Schnitte einer normalen Nebenniere, zum Vergleich mit einer Hämatoxylin-Eosin- und immunhistochemischer Färbung. Die immunhistochemische Färbung erfolgte bei den oberen Aufnahmen mit den Antikörpern der Keio Universität Tokyo, bei den unteren mit den Antikörpern der University of Mississippi. Die Pfeile zeigen auf die Zona Glomerulosa.



## 5 Ergebnisse



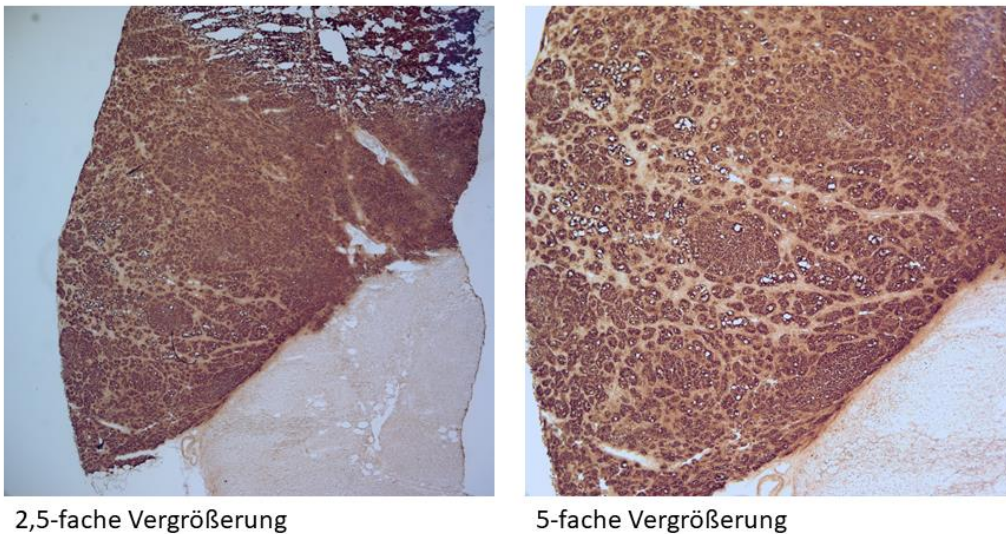
**ABB. 21** DETAILAUFNAHME DER MITTELS IMMUNHISTOCHEMIE GEFÄRBTEN NEBENNIERE  
Gezeigt werden Detailaufnahmen der in Abb. 10 gezeigten Nebenniere nach immunhistochemischer Färbung mit den Antikörpern der Keio Universität Tokyo. In der oberen Bildhälfte in 2,5-facher Vergrößerung, in der unteren Bildhälfte in 10-facher Vergrößerung.



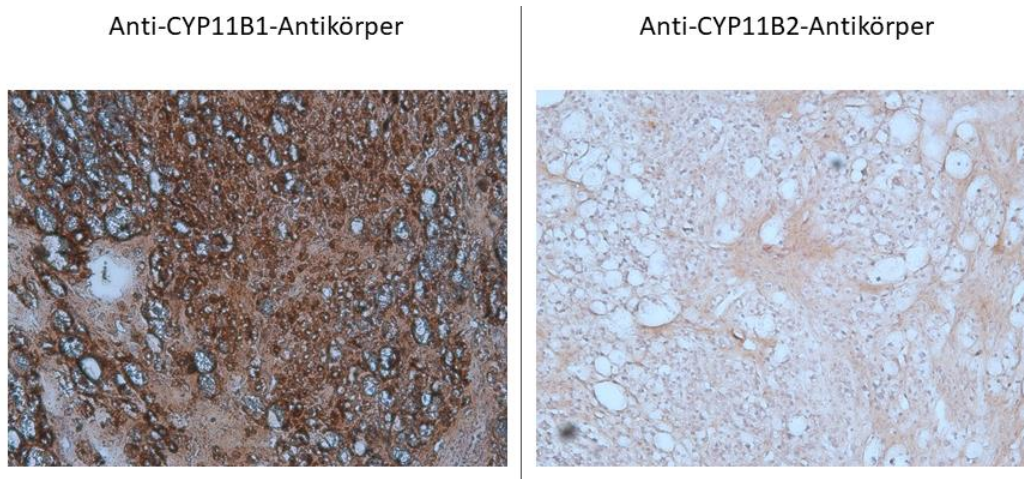
**ABB. 22** DETAILAUFNAHME EINER MITTELS IMMUNHISTOCHEMIE GEFÄRBTEN NEBENNIERE  
10-fache Vergrößerung. Nach Färbung mit den Antikörpern der University of Mississippi zeigen sich charakteristische Cluster mit CYP11B2-Expression (rechts), in denen keine CYP11B1-Expression erkennbar ist (links).

## 5 Ergebnisse

Hierbei zeigten sich die erwarteten CYP11B2-exprimierenden Zellcluster, die in der Literatur beschrieben werden [11, 29]. Weiterhin konnten in gesicherten Aldosteron produzierenden Tumoren, Regionen mit sehr starker CYP11B2-Expression nachgewiesen werden (siehe Abb. 13). In gesicherten Kortisol produzierenden Tumoren, zeigte wiederum die Verwendung von Anti-CYP11B1-Antikörpern eine intensive Färbung, wohingegen die Anti-CYP11B2-Antikörper die Schnitte kaum färbten (siehe Abb. 14).



**ABB. 23 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG EINES GESICHERTEN APA (ANTI-CYP11B2-AK)**  
Das Bild zeigt zwei Aufnahmen desselben Schnittes nach der Färbung mit Anti-CYP11B2-Antikörpern der University of Mississippi in 2,5- und 5-facher Vergrößerung.

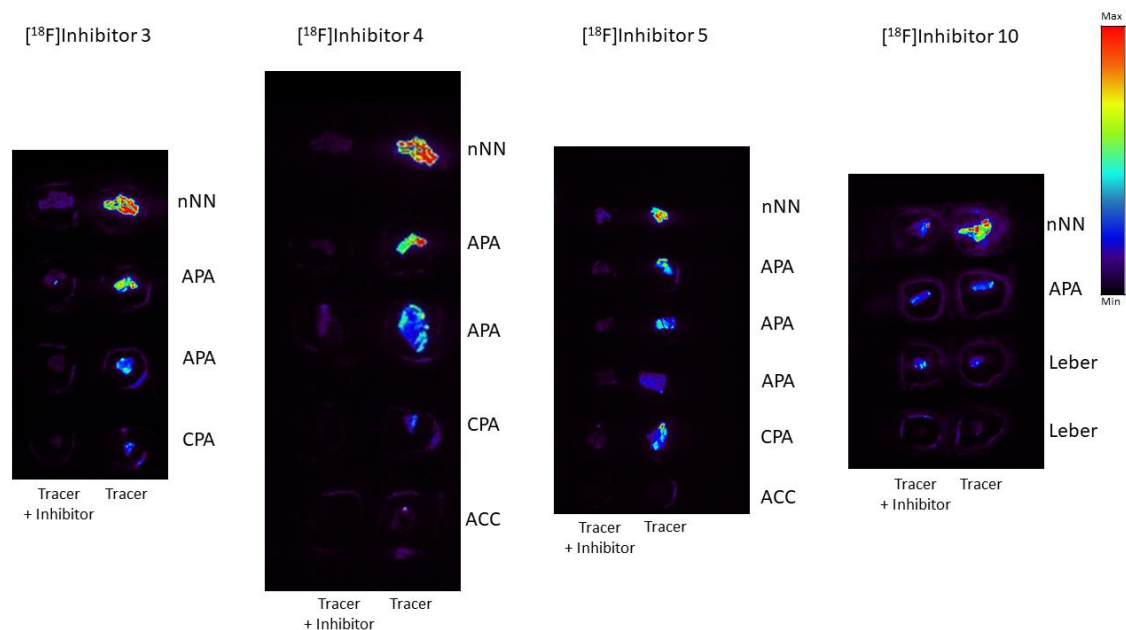


**ABB. 24 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG EINES GESICHERTEN CPA**  
10-fache Vergrößerung. Benachbarte Gefrierschnitte eines Kortisol produzierenden Adenoms wurden mit Anti-CYP11B1- (links), bzw. mit Anti-CYP11B2-Antikörpern der Keio Universität Tokyo gefärbt. Die Färbung mit Anti-CYP11B1-Antikörpern zeigt eine intensive Färbung, wohingegen der Nachbarschnitt kaum gefärbt ist.

## 5 Ergebnisse

### 5.3.1 Ergebnisse der Bindungsstudien an Gefrierschnitten

Für die Bindungsstudien an humanen Gewebeschnitten standen die Substanzen 3-5, 10 und 11 zur Verfügung. Bei den restlichen Inhibitoren gelang während der Durchführung dieser Arbeit keine Radiofluorierung, sodass sie nicht mittels Bindungsstudien untersucht werden konnten.



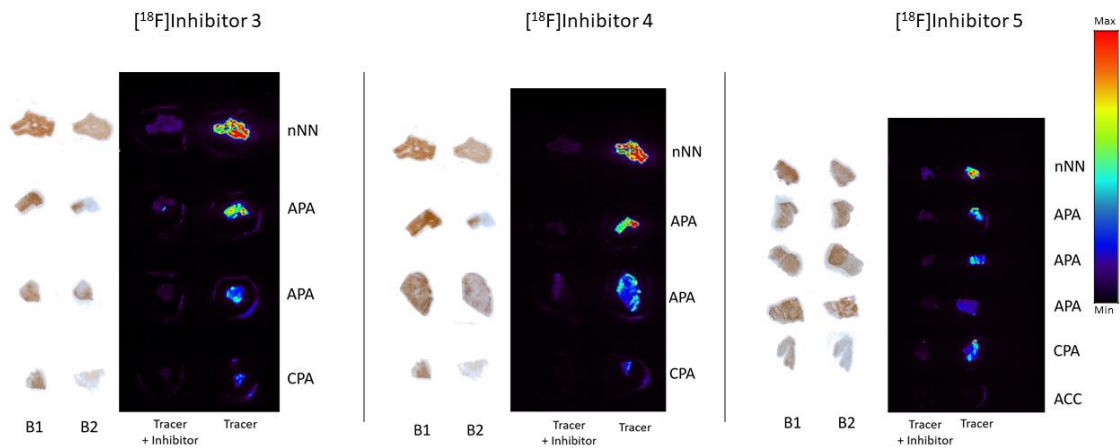
**ABB. 25 VERGLEICH DER BINDUNGSSTUDIEN MIT DEN TRACERN 3, 4, 5 UND 10**

Ergebnisse der Bindungsstudien mit verschiedenen Gewebeschnitten. Jeweils links wurde als Negativkontrolle zusätzlich der nicht radiofluorierte Inhibitor zugegeben um die Bindungsstellen zu blockieren.

nNN = normale Nebenniere, APA = Aldosteron produzierendes Adenom, CPA = Kortisol produzierendes Adenom und ACC = Adrenokortikales Karzinom

Zur Beurteilung der spezifischen Bindung an die Gewebeschnitte wurde eine immunhistochemische Färbung benachbarter Gefrierschnitte vorgenommen und den Ergebnissen der Bindungsstudien gegenübergestellt (siehe Abb. 26). Aufgrund begrenzter Gewebesvorräte mussten für verschiedene Tracer teilweise unterschiedliche Nebennieren und Adenome genommen werden.

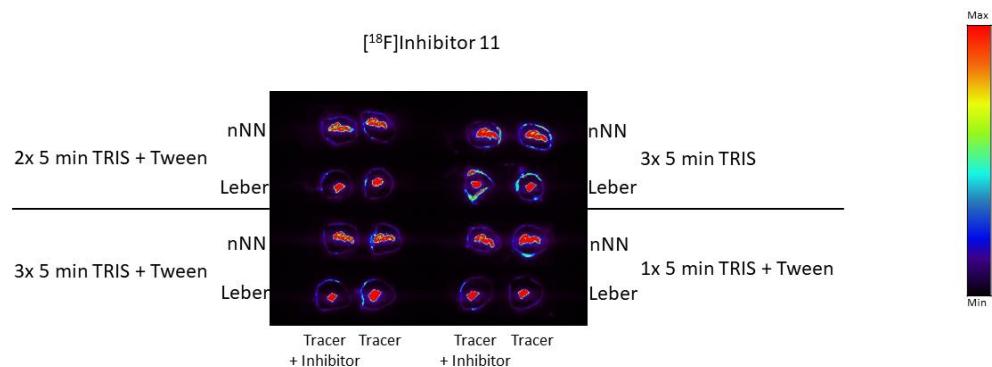
## 5 Ergebnisse



**ABB. 26 VERGLEICH VON BINDUNGSSTUDIEN UND IMMUNHISTOCHEMIE**

Eigene Darstellung. Gezeigt sind die Ergebnisse der Bindungsstudien mit den Tracern 3, 4 und 5, jeweils links daneben wurden die korrelierenden immunhistochemischen Färbungen der verwendeten Schnitte eingefügt. B1 entspricht hierbei der Färbung mit Anti-CYP11B1-Antikörpern, B2 der Färbung mit Anti-CYP11B2-Antikörpern. nNN = normale Nebeniere, APA = Aldosteron produzierendes Adenom, CPA = Kortisol produzierendes Adenom und ACC = Adrenokortikales Karzinom.

Alle untersuchten Tracer wurden in mehreren Versuchsansätzen mit verschiedenen Variationen der Waschschritte, Belichtungszeit und der verwendeten Aktivität untersucht. Insbesondere bei den sehr lipophilen Trifluormethylfluorphenylpyridinen war es jedoch sehr schwierig, unspezifisch gebundenen Tracer von den Gewebeschnitten zu waschen. Bei Substanz 11 gelang es trotz verschiedener Variationen nicht, die unspezifische Bindung mit Waschschritten zu beseitigen (siehe Abb. 27).



**ABB. 27 VERGLEICH VIER VERSCHIEDENER ANSÄTZE FÜR BINDUNGSSTUDIEN MIT TRACER 11**

Alle Schnitte wurden zweimal mit PBS gewaschen und im Anschluss entweder mit TRIS (rechts oben) oder mit TRIS + 0,05 % Tween 20 in 1-3 fünf minütigen Waschgängen (siehe Bild). Bei allen Varianten konnte die unspezifische Bindung nicht gelöst werden, die mit nicht-radiofluorierten Inhibitor blockierten Kontrollschnitte (jeweils links) zeigen eine starke Aktivität, ebenso die Leberschnitte.

### 6 Diskussion

Die 11 getesteten Substanzen zeigten allesamt eine deutlich selektivere Inhibition der Aldosteronsynthese als die Vergleichssubstanz FAD286 in den murinen Y1-Zelllinien. Am stärksten war der Unterschied zu FAD286 bei Inhibitor 9, der in den Y1-Zelllinien einen Selektivitätsfaktor von 129,9 aufwies. Da die verwendeten Y1-Zelllinien die humane Aldosteronsynthese nicht simultan mit der 11 $\beta$ -Hydroxylase exprimieren [61, 88], konnte mit ihnen jedoch nicht untersucht werden, wie sich die Selektivität in direkter Konkurrenz der beiden Enzyme verhält. Deshalb wurden sämtliche Substanzen auch in NCI-H295-Zellen getestet. Da diese alle relevanten Enzyme der Steroidhormonsynthese exprimieren [93], konnte somit untersucht werden, bei welchen Inhibitoren es neben der Wirkung auf die Aldosteronsynthese auch zu einer relevanten Inhibition der 11- $\beta$ -Hydroxylase und anderer Enzyme der Steroidhormonsynthese kommt. Die Experimente mit den NCI-H295-Zellen bestätigten die hohe Affinität der getesteten Inhibitoren für die Aldosteronsynthese, die Selektivitätsfaktoren lagen zwischen 6,1 und 64,4 – FAD286 konnte im Vergleich dazu nur einen Selektivitätsfaktor von 3,8 aufweisen, es kam bereits in niedrigen Dosierungen zu einer Inhibition der 11 $\beta$ -Hydroxylase. Erfahrungen mit Patienten, die an einem adrenogenitalen Syndrom leiden, haben gezeigt, dass es durch Funktionslosigkeit eines späteren Enzyms der Steroidhormonsynthese zu stark erhöhten Spiegeln der Vorläufersubstanzen kommt [100, 101].

Die Verwendung von NCI-H295-Zellen bietet die Möglichkeit, auch diese potentielle Wirkung der Inhibitoren zu testen. Tatsächlich kam es bei allen Substanzen ab einer Inhibitor-Dosis von 10 nmol/l zu einem Anstieg von 17-Hydroxy-Progesteron und Androstendion. Bei höheren Konzentrationen sanken die 17-Hydroxy-Progesteron und Androstendion-Konzentrationen wieder, sodass von einer zusätzlichen Inhibition weiterer Enzyme der Steroidhormonsynthese ausgegangen werden muss. In der Vergangenheit konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Imidazolderivat Etomidat in hohen Dosen auch die Cholesterin-Desmolase (CYP11A1) direkt inhibiert und somit die gesamte Steroidhormonsynthese unterbindet . [54, 56, 61, 99].

Angesichts der Sekretionshemmung von 17-Hydroxyprogesteron und Androstendion ist zu vermuten, dass dieser Effekt auch bei den von uns getesteten Substanzen in hohen

## 6 Diskussion

Dosen eintritt. Zur weiteren Evaluation welche Enzyme der Steroidhormonsynthese bei welchen Inhibitorkonzentrationen gehemmt werden könnten im Rahmen weiterer Studien zum Beispiel mittels Massenspektrometrie die Konzentrationen aller Steroidhormone und -Prohormone erfolgen. Gleichzeitig entspricht die gleichzeitige Expression der verschiedenen Enzyme der Steroidhormonsynthese nicht den Verhältnissen einer physiologischen Nebenniere, es fehlt die in Abb. 1 dargestellte zonale Gliederung der Nebennierenrinde. Da beispielsweise sowohl Aldosteron, als auch Kortisol aus der Vorstufe Desoxykorticosteron entstehen (siehe Abb. 2), konkurrieren 11 $\beta$ -Hydroxylase und Aldosteronsynthase im Zellkulturmodell um ihr gemeinsames Substrat, was in einer zonal gegliederten Nebenniere nicht geschieht. Weiterhin kann nur aufgrund der Konzentrationen von Kortisol, Aldosteron, 17-Hydroxy-Progesteron und Androstendion nicht auf den genauen Effekt einer Substanz auf ein einzelnes Enzym geschlossen werden, da es zu einem komplexen Nebeneinander von Enzymblockaden und Hochregulationen kommt. Es ist nicht auszuschließen, dass bei einer selektiven Inhibition der Aldosteronsynthase vermehrt Vorstufen akkumulieren, was möglicherweise bei Patienten zu unerwünschten Wirkungen führen kann. Trotz der höheren Selektivitätsfaktoren der getesteten Inhibitoren, kommt es wegen der 93%igen Sequenzhomologie der Aldosteronsynthase mit der 11 $\beta$ -Hydroxylase [70, 71] auch bei den getesteten Substanzen in höheren Konzentrationen immer zu einer gewissen Inhibition der Kortisol-Produktion. Diese ist in der in vitro-Diagnostik schwächer als bei FAD286, aber ein potentieller limitierender Faktor für den zukünftigen Einsatz in der medikamentösen Therapie des Hyperaldosteronismus. Dies war letztendlich auch der Grund, weshalb der vielversprechende Aldosteronsynthase-Inhibitor LCI699 mittlerweile in der Therapie des Cushing-Syndroms eingesetzt wird [81].

Mithilfe der Experimente mit den V79-Zelllinien wurde untersucht, inwiefern sich die Ergebnisse der Inhibitoren bei Nagetieren und Menschen unterscheiden, u.a. um zu klären, inwieweit ein Ratten-in vivo Modell für eine weitere Evaluation geeignet wäre, wie bereits durch andere Arbeitsgruppen eingesetzt [68, 102] IC<sub>50</sub>-Werte und Selektivitätsfaktoren unterschieden sich deutlich von den in den Y1- und NCI-H295-Zellen erhobenen Werten, lediglich bei Inhibitor 1 kam es zu einer stärkeren CYP11B2- als CYP11B1-Hemmung. Dieser Umstand lässt sich mit der vergleichsweise niedrigen Ähnlichkeit der Rattenenzyme mit den humanen Pendanten [95] erklären. So liegt die

## 6 Diskussion

Aminosäuresequenzhomologie von CYP11B1 und CYP11B2 zwischen Menschen und Ratten nur bei 64%, bzw. 69%. Mit diesem Hintergrund scheint eine *in-vivo*-Testung in nicht-humanisierten Mäusen wenig sinnvoll und auch die Ergebnisse bereits publizierter Daten sind diesbezüglich kritisch zu hinterfragen.

Daher wurden für die *in-vivo*-Untersuchungen teilhumanisierte Mäuse verwendet, die die humane Aldosteronsynthase exprimieren. Somit konnte die Inhibition des Zielenzym auch im murinen Modell gut *in vivo* getestet werden. Entgegen der Ergebnisse der *in-vitro*-Versuche hatte FAD286 im teilhumanisierten Mausmodell den stärksten inhibitorischen Effekt auf die Aldosteronsynthese. Innerhalb von 60 Minuten nach Gabe von 0,1  $\mu\text{mol/kg}$  FAD286 sank die Konzentration von 752,2 pg/ml in der Vergleichsgruppe auf durchschnittlich 118,7 pg/ml. Die gleiche Dosis an Inhibitor 4 senkte den Aldosteronspiegel nach einer Stunde nur auf 186,4 pg/ml, bei Inhibitor 5 lag der Ein-Stunden-Wert mit 407,5 pg/ml noch deutlich darüber. Die Kortikosteronsynthese wurde von FAD286 am wenigsten beeinflusst, während es bei den Inhibitoren 4 und 5 zu einer deutlichen Abnahme kam. Die hohe Selektivität für die Aldosteronsynthase von FAD286 im Nagetiermodell wurde bereits beschrieben [103] und ist mit unseren Ergebnissen vereinbar. Jedoch ist es kaum möglich, daraus auf die Wirkung der Inhibitoren im Menschen zu schließen. Das zentrale Problem in der Entwicklung eines selektiven Aldosteronsynthase-Inhibitors liegt in der großen Homologie von Aldosteronsynthase und 11 $\beta$ -Hydroxylase [70], die Struktur der murinen Enzyme stimmt jedoch nur teilweise mit den humanen Enzymen überein, eine selektive Bindung an humane Enzyme ist deshalb im Mausmodell nicht evaluierbar. Durch die Verwendung teilhumanisierter Mäuse konnte zwar die inhibitorische Wirkung auf die humane Aldosteronsynthase im Tiermodell bestimmt werden, über den Effekt auf die 11 $\beta$ -Hydroxylase lässt sich jedoch nichts sagen, da diese im verwendeten Modell nicht humanisiert war. Weiterhin kann durch ein unspezifisches Binden an murinen Enzymen die Inhibition der Aldosteronsynthase schwächer ausfallen, als es im Menschen zu erwarten wäre. Ein humanisiertes Mausmodell, das auch die übrigen adrenalen Enzyme, insbesondere die humane 11 $\beta$ -Hydroxylase exprimiert, böte eine bessere Aussagekraft für die selektive Bindung an das Zielenzym, ist derzeit jedoch nicht verfügbar. Ebenso würde eine größere Zahl an Versuchstieren die Aussagekraft erhöhen, da Schwankungen in den Hormonkonzentrationen der einzelnen Tiere weniger stark ins

## 6 Diskussion

Gewicht fielen. Dies wäre aber auch im Rahmen des Tierschutzes kritisch zu betrachten. Da für die Messung der Hormonkonzentrationen eine ausreichende Menge an Blut entnommen werden musste, war die Abnahme aus der Schwanzvene nicht praktikabel. Außerdem wäre bei der Abnahme aus der Schwanzvene eine stressbedingte Erhöhung der Kortikosteronkonzentration nicht auszuschließen, was die Ergebnisse verzerrt hätte. Deshalb wurden die Tiere durch CO<sub>2</sub>-Insufflation euthanasiert und anschließend das Blut mit einer sterilen Kanüle intrakardial entnommen. Dadurch gab es aber keine Möglichkeit für die Erhebung von Langzeitdaten nach der Gabe des Inhibitors. Außerdem lässt sich trotz größter Vorsicht und schonenden Umgangs mit den Versuchstieren nicht ausschließen, dass es durch die Versuche zu einer Stressreaktion mit erhöhten Kortikosteronpegeln kam.

Durch die erfolgreiche, neu etablierte immunhistochemische Färbung der Gefrierschnitte humanen Gewebes, konnten die Ergebnisse der Bindungsstudien mit der CYP11B2-Expression verglichen werden. Andererseits wurden, nicht zuletzt dadurch, viele Gewebeschnitte benötigt, weshalb es nicht möglich war, die verschiedenen Tracer an denselben Gewebestücken zu testen. Erschwerend kam hinzu, dass CYP11B2 auch innerhalb von Adenomen in Clustern exprimiert wird [67], weshalb auch innerhalb eines Gewebestückes nicht alle Schnitte verwendet werden konnten. Ein Problem bei den Bindungsstudien war oftmals die unspezifische Bindung der lipophilen Tracer an die Gewebeschnitte. Insbesondere bei Trifluormethylfluorphenylpyridin waren intensive Waschschrte nötig, die wiederum die Gewebeschnitte stark in Mitleidenschaft zogen. Bei Tracer 11 gelang es auch durch ausgeprägte Waschschrte nicht, das unspezifische Kleben an den Negativkontrollen zu lösen, ohne dabei die Gewebeschnitte zu zerstören. Eine weitere Option wäre auch der Versuch für die Bindungsstudien Paraffinschnitte zu verwenden, welche widerstandsfähiger sind, zudem wurden die verwendeten Anti-CYP11B1- und Anti-CYP11B2-Antikörper für die immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten entwickelt [11, 12].

Bei den Tracern 3, 4 und 5 konnte eine Bindung an CYP11B2-exprimierende Regionen gezeigt werden (siehe Abb. 25), allerdings band Tracer 5 auch an den Schnitt eines Kortisol produzierenden Adenoms, sodass von einer partiellen Bindung an CYP11B1 ausgegangen werden muss. Die Radiofluorierung der Inhibitoren ist äußerst komplex und war



## 6 Diskussion

nicht immer erfolgreich, dadurch konnte nur ein Teil der Substanzen getestet werden. Diese könnten aber in Zukunft beispielsweise auch *in vivo* mit einem Kleintier-PET getestet werden, um die Entwicklung klinisch nutzbarer Substanzen weiter voranzutreiben und eine alternative Methode zu den Bindungsstudien an Gewebeschnitten zu haben.

Ein prinzipielles Problem in der Differentialdiagnostik des primären Hyperaldosteronismus via Radiotracer ist die Frage der Auflösung in der Bildgebung. Kleinere Aldosteron produzierende Adenome kommen häufig vor und werden in der klassischen Schnittbildgebung oft übersehen [104], gleichwohl ist die CYP11B2-Expression sowohl in Aldosteron produzierenden Adenomen, als auch bei der bilateralen idiopathischen Hyperplasie gegenüber dem physiologischen Nebennierengewebe meistens gesteigert [31, 67]. Es erscheint daher plausibel, dass ein selektiver Tracer in diesen pathologischen Geweben stark bindet und ein deutliches Signal erzeugt, zumal bei kleineren Adenomen eine Zunahme der CYP11B2- und eine Abnahme der CYP11B1-Expression beschrieben wurde [105, 106]

Die Entwicklung selektiver Inhibitoren der Aldosteronsynthese ist aktuell Forschungsziel mehrerer Arbeitsgruppen weltweit. Von einer erfolgreichen, zielgerichteten Suppression der Aldosteron-Synthese verspricht man sich nicht nur eine bessere Therapie des Conn-Syndroms, sondern auch der Herzinsuffizienz [107]. Die große Rolle von Aldosteron bei der kardialen Morbidität zeigt sich unter anderem in den positiven Effekten der Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten, die nachweislich bei Herzinsuffizienz die Mortalität senken [14, 75]. Gleichwohl lassen sich dadurch die nicht-rezeptorvermittelten Effekte des Aldosterons nicht beeinflussen und auch unter Therapie mit Renin-Antagonisten und ACE-Hemmern kommt es zu einer signifikanten Produktion von Aldosteron [74, 76]. Mit FAD286 und LCI699 wurden in der Vergangenheit bereits vielversprechende Substanzen entwickelt, von denen man sich eine selektive Inhibierung der Aldosteronsynthese versprach. Die im Tiermodell ausgeprägten Selektivitätsfaktoren beider Substanzen bestätigten sich jedoch nicht, was sich unter anderem durch die geringe Homologie der humanen und murinen Enzyme erklären lässt [70, 103]. Eine weitere Substanz, BI 689648, wurde deshalb in Primaten getestet, wovon die Autoren sich eine bessere Aussagekraft für die Verhältnisse beim Menschen erhoffen [82]. Der Einfluss von LCI699 auf die humane 11 $\beta$ -Hydroxylase ist tatsächlich so stark ausgeprägt, dass ein Einsatz in der

## 6 Diskussion

Therapie des Cushing-Syndroms erforscht wird [81]. Ein Einsatz von LCI699 in der Therapie des primären Hyperaldosteronismus könnte daher mit einer, unter Umständen lebensbedrohlichen [108, 109], Suppression der Kortisol-Synthese einhergehen. Andererseits zeigen neuste Studien, dass es sowohl bei Aldosteron produzierenden Adenomen, als auch bei der bilateralen idiopathischen Hyperplasie zu einer relevanten Produktion von Kortisol kommen kann [110, 111]. Dieser Umstand könnte auch eine Erklärung sein für das gehäufte Auftreten von Diabetes mellitus, dem metabolischen Syndrom und psychischen Begleiterkrankungen beim Conn-Syndrom [112-114]. Außerdem könnte ein relevanter Glukokortikoidexzess mitverantwortlich für die hohe kardiovaskuläre Morbidität der betroffenen Patienten sein [14, 114]. Diese neuen Erkenntnisse werfen ein anderes Licht auf die aktuellen Empfehlungen für die Therapie des primären Hyperaldosteronismus. Einerseits muss in klinischen Studien erforscht werden, ob eine zusätzliche Hemmung der Kortisolsynthese oder -wirkung für die Betroffenen einen Benefit darstellt, andererseits sollte untersucht werden, ob es durch die gesteigerte Glukokortikoidsynthese zu einer Suppression der kontralateralen Nebennierenrinde kommt. In diesem Fall könnte die Entfernung eines Adenoms eine vital bedrohliche Addison-Krise auslösen [14, 15, 109], was in der Therapieplanung zwingend berücksichtigt werden muss. Sollten klinische Studien in Zukunft zeigen, dass Patienten von einer Anti-Glukokortikoiden-Therapie profitieren, so wäre ein Aldosteronsynthese-Inhibitor, der zu einem geringen Umfang auch die 11 $\beta$ -Hydroxylase hemmt, unter Umständen sogar einem reinen Aldosteronsynthese-Inhibitor überlegen.

Bei der Anwendung radiofluorierter Inhibitoren wäre wiederum eine hohe Selektivität der Substanzen für die Aldosteronsynthese besonders wünschenswert. Die Möglichkeit der Radiofluorierung hochselektiver Inhibitoren bietet das Potential zur Entwicklung eines PET-Tracers, der den selektiven Nebennierenvenenkatheter als diagnostischen Goldstandard zumindest teilweise ablösen könnte. Dies würde nicht nur das Problem der starken Untersucherabhängigkeit [46, 52] und mitunter hohen Strahlenbelastung [48] lösen, sondern böte dank der vergleichsweise langen Halbwertszeit von [ $^{18}\text{F}$ ] [84] auch eine breitere Verfügbarkeit einer adäquaten Diagnostik. Momentan kann diese nur in wenigen Zentren erfolgen [46], was bei der hohen Prävalenz des primären Hyperaldosteronismus problematisch ist. Die bisherigen bildgebenden Verfahren werden diesem Anspruch

## 6 Diskussion

jedoch noch nicht gerecht. Eine einfache CT- oder MRT-Aufnahme kann nicht zwischen klinisch irrelevanten Inzidentalomen und Aldosteron produzierenden Tumoren unterscheiden, außerdem können kleine Adenome leicht übersehen werden [40, 52]. Tracer wie [ $^{11}\text{C}$ ]Metomidat und [ $^{123}\text{I}$ ]IMTO zeigen gute Ergebnisse in der Differenzierung zwischen adrenokortikalem und nicht-adrenokortikalem Gewebe [53, 58, 61], sind jedoch nicht in der Lage, eine Aussage über die endokrine Aktivität eines adrenalen Herdes zu treffen, da sie durch die Bindung sowohl an CYP11B1, als auch an CYP11B2 nahezu in allen adrenokortikalen Zellen aufgenommen [64, 66]. Hinzu kommt die sehr kurze Halbwertszeit von [ $^{11}\text{C}$ ]Metomidat [66], die einen Transport in Kliniken ohne eigenen Zyklotron unmöglich macht.

Sehr interessant ist in diesem Kontext die Entdeckung, dass CXCR4 in Regionen mit CYP11B2-Expression ebenfalls exprimiert wird, was bereits in ersten erfolgreichen PET/CT-Untersuchungen mit dem CXCR4-Tracer [ $^{68}\text{Ga}$ ]Pentixafor mündete [65]. Da jedoch auch in normalem adrenokortikalem Gewebe CXCR4 exprimiert wird, ist insbesondere die Detektion kleinerer Aldosteron produzierender Tumore aufgrund der starken Hintergrundaktivität erschwert. In Zukunft werden klinischen Studien den möglichen Einsatz von [ $^{68}\text{Ga}$ ]Pentixafor evaluieren müssen.

Von den in dieser Arbeit getesteten Substanzen zeigten vor allem die Inhibitoren 4 und 5, beides Cyanofluorphenylpyridine, vielversprechende Ergebnisse. Mit Selektivitätsfaktoren von 36,5 in Y1- und 14,5 in NCI-H295-Zellen (Inhibitor 4), beziehungsweise 73,7 in Y1- und 9,2 in NCI-H295-Zellen (Inhibitor 5) zeigten beide *in vitro* gute Resultate. Nach erfolgreicher Radiofluorierung konnte bei beiden Substanzen eine Bindung an CYP11B2-exprimierende Strukturen gezeigt werden, allerdings band Tracer 5 auch an CYP11B1-exprimierende Teile der Gewebeschnitte. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass trotz vielfältiger Anpassungen des Versuchsaufbaus die Waschschriffe nicht ausreichten um ein unspezifisches Festkleben der Tracer auf der Oberfläche der Gewebeschnitte zu verhindern. Auch bei den *in-vivo*-Experimenten trat nach Gabe der beiden Inhibitoren jeweils eine deutliche Suppression der Aldosteronproduktion auf. Weitere Experimente mit Versuchstieren, die auch die humane 11 $\beta$ -Hydroxylase exprimieren und vor allem Kleintier-PET-Untersuchungen sind nötig, um den Stellenwert der Substanzen als mögliche diagnostische Instrumente in der Differentialdiagnostik des primären

## 6 Diskussion

Hyperaldosteronismus zu klären. Auch Inhibitor 11 konnte *in vitro* mit Selektivitätsfaktoren von 97,9 (Y1-Zellen) und 33,6 (NCI-H295-Zellen) überzeugen, allerdings gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht, ein Protokoll für die Bindungsstudien mit dieser Substanz zu etablieren.

Vor allem bei kleinen Läsionen wird der Nebennierenvenenkatheter wahrscheinlich auch in Zukunft eine wichtige Rolle im diagnostischen Algorithmus einnehmen. Durch die Entwicklung einer funktionellen Bildgebung könnte man diesen aber möglicherweise nur noch bei einzelnen Patienten benötigen, deren Fälle durch diese nicht abschließend geklärt werden konnten. Gleichzeitig kann die Diagnostik durch zunehmend differenziertere Laborchemie ergänzt werden, die mittels genauer Steroidanalytik in Zukunft möglicherweise zwischen uni- und bilateralen Erkrankungen differenzieren kann [115].

### 7 Zusammenfassung

Mit einer durchschnittlichen Prävalenz von ca. 50 % aller Erwachsenen ist die arterielle Hypertonie der häufigste kardiovaskuläre Risikofaktor [14, 19]. Aktuelle Studien konnten zeigen, dass mit ca. 5–10 % der primäre Hyperaldosteronismus die häufigste Ursache einer sekundären Hypertonie darstellt [19, 26]. Damit handelt es sich bei dem sogenannten Conn-Syndrom um eine weit verbreitete Erkrankung, für die vor allem bei jungen Patienten eine potentiell kurativen Therapie existiert. Gleichzeitig können auch die nicht kurativ behandelbaren Patienten von einer gezielten Therapie mit Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten profitieren [24, 33].

Unabdingbar ist jedoch eine an die jeweilige Ätiologie angepasste Therapie. Während Aldosteron produzierende Adenome durch eine Adrenalektomie geheilt werden können, sollten Patienten mit idiopathischen bilateralen Hyperplasien Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten erhalten [14, 33, 44]. Zur Unterscheidung zwischen Hyperplasien und Adenomen ist man aktuell auf die selektive Katheterisierung der Nebennierenvenen angewiesen, ein Verfahren das sehr aufwendig ist, eine oftmals hohe Strahlenbelastung für Patienten und Untersucher bedeutet, komplikationsreich ist und aufgrund der großen Untersucherabhängigkeit nur in wenigen Zentren verfügbar ist [24, 32, 116]. Die momentan zur Verfügung stehenden bildgebenden Verfahren sind wiederum nicht aussagekräftig genug, um zwischen den verschiedenen Formen zu differenzieren. Ein selektiver PET-Tracer, der nur an Aldosteron produzierende Zellen bindet und mit [<sup>18</sup>F] markiert werden kann, wäre eine mögliche Alternative und könnte, dank der relativ langen Halbwertszeit von [<sup>18</sup>F] [84], auch in Kliniken transportiert werden, die nicht über ein Zyklotron verfügen.

Zu diesem Zweck wurden 11 Substanzen aus den Stoffklassen der Naphthylpyridine, Cyanofluorphenylpyridine und Trifluormethylfluorphenylpyridine im Rahmen dieser Arbeit untersucht. In *in-vitro*-Experimenten wurde für alle Stoffe die selektive Hemmung der Aldosteronsynthese in verschiedenen Zellkulturmodellen getestet. Außerdem erfolgten nach erfolgreicher Radiofluorierung der Substanzen erste Bindungsstudien an humanen Gewebeschnitten. Diese wurden mit der neu etablierten immunhistochemischen Färbung benachbarter Schnitte verglichen. Einzelne, vielversprechende Substanzen wurden

## **7 Zusammenfassung**

außerdem *in vivo* in transgenen Mäusen getestet, die durch Transfektion die humane Aldosteronsynthase exprimieren. Auf Basis dieser Ergebnisse, müssen künftige Untersuchungen mit einem Kleintier-PET und Tests im Rahmen klinischer Studien erfolgen, um die Entwicklung eines geeigneten PET-Tracers weiter voranzutreiben und so mittelfristig die Differentialdiagnostik des primären Hyperaldosteronismus zu verbessern.

## 8 Anhang

### 8.1 Literaturverzeichnis

1. Drenckhahn, D., A. Benninghoff, and J. Waschke, *Taschenbuch Anatomie*. 2. Aufl. ed. 2014, München: Elsevier. X, 582 S.
2. Schünke, M., et al., *Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*. 4., überarbeitete und erweiterte Auflage ed. Prometheus. 2014, Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag. XV, 613 Seiten.
3. Welsch, U. and T. Deller, *Lehrbuch Histologie*. 3. Aufl. ed. 2010, München: Elsevier. XI, 596 S.
4. Aumüller, G., *Anatomie*. 3., aktualisierte Auflage ed. Duale Reihe. 2014, Stuttgart: Thieme. 1332 Seiten.
5. Lüllmann-Rauch, R. and F. Paulsen, *Taschenlehrbuch Histologie* 5. Aufl. ed. 2015, Stuttgart [u.a.]: Thieme. Online Ressource (PDF, 46589 KB, 694 S.).
6. Schünke, M., et al., *Innere Organe* 3., überarb. und erw. Aufl. ed. Prometheus. 2012, Stuttgart [u.a.]: Thieme. XV, 486 S.
7. Behrends, J.C., et al., *Physiologie*. 2., überarbeitete Auflage ed. Duale Reihe. 2012, Stuttgart: Thieme. XIII, 830 Seiten.
8. Elliott, T.R., *The Sidney Ringer Memorial Lecture on the Adrenal Glands: Delivered at University College Hospital Medical School, June, 1914*. Br Med J, 1914. **1**(2791): p. 1393-7.
9. Rassow, J., *Biochemie*. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. ed. Duale Reihe. 2012, Stuttgart: Thieme. XVI, 846 S.
10. Rintelen, H., et al., *Pathologie*. 2015, Elsevier Health Sciences Germany: s.l.
11. Nishimoto, K., et al., *Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(5): p. 2296-305.
12. Nishimoto, K., et al., *Human Adrenocortical Remodeling Leading to Aldosterone-Producing Cell Cluster Generation*. Int J Endocrinol, 2016. **2016**: p. 7834356.
13. Pschyrembel, W., *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 2007: Berlin u.a.

## 8 Anhang

14. Herold, G., *Innere Medizin 2016* 2016, Köln: Selbstverl. 1004 Seiten.
15. Renz-Polster, H., et al., *Basislehrbuch Innere Medizin* 5. Aufl. ed. 2013, München: Elsevier. XIX, 1202 S.
16. Scharthl, M., M. Gessler, and A. Von Eckardstein, *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. 2009, München: Elsevier, Urban & Fischer. XXII, 1034 S.
17. Born-Frontsberg, E., et al., *Cardiovascular and cerebrovascular comorbidities of hypokalemic and normokalemic primary aldosteronism: results of the German Conn's Registry*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(4): p. 1125-30.
18. Schmidt, R.F., F. Lang, and M. Heckmann, *Physiologie des Menschen*. 2010, Heidelberg: Springer Medizin-Verlag. XXI, 979 Seiten.
19. Whelton, P.K., et al., 2017  
*ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines*. Hypertension, 2018. **71**(6): p. e13-e115.
20. Conn, J.W. and L.H. Louis, *Primary aldosteronism, a new clinical entity\*†*. Annals of Internal Medicine, 1956. **44**(1): p. 1-15.
21. Quack, I., O. Vonend, and L.C. Rump, *Familial Hyperaldosteronism I–III*. Horm Metab Res, 2010. **42**(06): p. 424-428.
22. Lenzini, L., et al., *Saga of Familial Hyperaldosteronism: Yet a New Channel*. Hypertension, 2018. **71**(6): p. 1010-1014.
23. Heinrich, D.A., et al., *Primary aldosteronism: key characteristics at diagnosis: a trend toward milder forms*. Eur J Endocrinol, 2018. **178**(6): p. 605-611.
24. Funder, J.W., et al., *The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2016. **101**(5): p. 1889-1916.
25. Reincke, M., *Diabetes, Conn syndrome and osteoporosis. What is new in diagnosis and therapy?* MMW Fortschr Med, 2003. **145**(9): p. 29.



## 8 Anhang

26. Mulatero, P., et al., *Increased diagnosis of primary aldosteronism, including surgically correctable forms, in centers from five continents*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(3): p. 1045-50.
27. Mulatero, P., et al., *Diagnosis of primary aldosteronism: from screening to subtype differentiation*. Trends Endocrinol Metab, 2005. **16**(3): p. 114-9.
28. Bassett, M.H., et al., *Expression profiles for steroidogenic enzymes in adrenocortical disease*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(9): p. 5446-55.
29. Boulkroun, S., et al., *Adrenal cortex remodeling and functional zona glomerulosa hyperplasia in primary aldosteronism*. Hypertension, 2010. **56**(5): p. 885-92.
30. Nanba, K., et al., *Molecular Heterogeneity in Aldosterone-Producing Adenomas*. J Clin Endocrinol Metab, 2016. **101**(3): p. 999-1007.
31. Wang, T., et al., *Gene expression profiles in aldosterone-producing adenomas and adjacent adrenal glands*. Eur J Endocrinol, 2011. **164**(4): p. 613-9.
32. Born-Frontsberg, E. and M. Quinkler, *Conn's syndrome*. Internist (Berl), 2009. **50**(1): p. 17-26.
33. Schirpenbach, C., et al., *The diagnosis and treatment of primary hyperaldosteronism in Germany: results on 555 patients from the German Conn Registry*. Dtsch Arztebl Int, 2009. **106**(18): p. 305-11.
34. Milliez, P., et al., *Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(8): p. 1243-8.
35. Monticone, S., et al., *Cardiovascular events and target organ damage in primary aldosteronism compared with essential hypertension: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2018. **6**(1): p. 41-50.
36. Hundemer, G.L., et al., *Cardiometabolic outcomes and mortality in medically treated primary aldosteronism: a retrospective cohort study*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2018. **6**(1): p. 51-59.
37. Fassnacht, M., et al., *Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors*. Eur J Endocrinol, 2016. **175**(2): p. G1-g34.
38. Grumbach, M.M., et al., *Management of the clinically inapparent adrenal mass (incidentaloma)*. Annals of Internal Medicine, 2003. **138**(5): p. 424-429.

## 8 Anhang

39. Monticone, S., et al., *Primary Aldosteronism: Who Should be Screened?* *Horm Metab Res*, 2012. **44**(03): p. 163-169.
40. Mulatero, P., S. Monticone, and F. Veglio, *Diagnosis and treatment of primary aldosteronism*. *Rev Endocr Metab Disord*, 2011. **12**(1): p. 3-9.
41. Schirpenbach, C. and M. Reincke, *Screening for primary aldosteronism*. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006. **20**(3): p. 369-384.
42. Maiolino, G., L.A. Calo, and G.P. Rossi, *The Time has Come for Systematic Screening for Primary Aldosteronism in All Hypertensives*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2017. **69**(14): p. 1821-1823.
43. Speer, C.P. and M. Gahr, *Pädiatrie*. 2013, Berlin [u.a.]: Springer. XXIV, 1123 S.
44. Arlt, W., *A detour guide to the Endocrine Society Clinical Practice Guideline on case detection, diagnosis and treatment of patients with primary aldosteronism*. *Eur J Endocrinol*, 2010. **162**(3): p. 435-8.
45. Mattsson, C. and W.F. Young, Jr., *Primary aldosteronism: diagnostic and treatment strategies*. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2006. **2**(4): p. 198-208; quiz, 1 p following 230.
46. Vonend, O., et al., *Adrenal venous sampling: evaluation of the German Conn's registry*. *Hypertension*, 2011. **57**(5): p. 990-5.
47. Strajina, V., et al., *Primary aldosteronism: making sense of partial data sets from failed adrenal venous sampling-suppression of adrenal aldosterone production can be used in clinical decision making*. *Surgery*, 2018. **163**(4): p. 801-806.
48. Fuss, C.T., et al., *Radiation exposure of adrenal vein sampling: a German Multicenter Study*. *Eur J Endocrinol*, 2018. **179**(4): p. 261-267.
49. Rossi, G.P., *Update in adrenal venous sampling for primary aldosteronism*. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2018. **25**(3): p. 160-171.
50. Rossi, G.P., et al., *The Adrenal Vein Sampling International Study (AVIS) for identifying the major subtypes of primary aldosteronism*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012. **97**(5): p. 1606-14.
51. Stewart, P.M. and B. Allolio, *Adrenal vein sampling for Primary Aldosteronism: time for a reality check*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2010. **72**(2): p. 146-8.

## 8 Anhang

52. Ladurner, R., et al., *Accuracy of adrenal imaging and adrenal venous sampling in diagnosing unilateral primary aldosteronism*. Eur J Clin Invest, 2017. **47**(5): p. 372-377.
53. Hahner, S. and A. Sundin, *Metomidate-based imaging of adrenal masses*. Horm Cancer, 2011. **2**(6): p. 348-53.
54. Wagner, R.L., et al., *Inhibition of Adrenal Steroidogenesis by the Anesthetic Etomidate*. New England Journal of Medicine, 1984. **310**(22): p. 1415-1421.
55. Allolio, B., et al., *Adrenocortical suppression by a single induction dose of etomidate*. Klinische Wochenschrift, 1984. **62**(21): p. 1014-1017.
56. Allolio, B., et al., *Effect of a single bolus of etomidate upon eight major corticosteroid hormones and plasma ACTH*. Clin Endocrinol (Oxf), 1985. **22**(3): p. 281-6.
57. Hennings, J., et al., *Computed tomography, magnetic resonance imaging and 11C-metomidate positron emission tomography for evaluation of adrenal incidentalomas*. Eur J Radiol, 2009. **69**(2): p. 314-23.
58. Hennings, J., et al., *11C-metomidate positron emission tomography after dexamethasone suppression for detection of small adrenocortical adenomas in primary aldosteronism*. Langenbecks Arch Surg, 2010. **395**(7): p. 963-7.
59. Burton, T.J., et al., *Evaluation of the sensitivity and specificity of (11)C-metomidate positron emission tomography (PET)-CT for lateralizing aldosterone secretion by Conn's adenomas*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(1): p. 100-9.
60. Kreissl, M.C., et al., *[123I]Iodometomidate imaging in adrenocortical carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(7): p. 2755-64.
61. Hahner, S., et al., *[123 I]Iodometomidate for molecular imaging of adrenocortical cytochrome P450 family 11B enzymes*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(6): p. 2358-65.
62. Kvaternik, H., et al., *Radiosynthesis of [124I]iodometomidate and biological evaluation using small-animal PET*. Mol Imaging Biol, 2014. **16**(3): p. 317-21.
63. Hahner, S., et al., *[131I]iodometomidate for targeted radionuclide therapy of advanced adrenocortical carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(3): p. 914-22.

## 8 Anhang

64. Hahner, S., et al., *Functional characterization of adrenal lesions using [123I]IMTO-SPECT/CT*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(4): p. 1508-18.
65. Heinze, B., et al., *Targeting CXCR4 (CXC Chemokine Receptor Type 4) for Molecular Imaging of Aldosterone-Producing Adenoma*. Hypertension, 2018. **71**(2): p. 317-325.
66. Hennings, J., et al., *[11C]metomidate positron emission tomography of adrenocortical tumors in correlation with histopathological findings*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(4): p. 1410-4.
67. Nakamura, Y., et al., *Intratumoral heterogeneity of steroidogenesis in aldosterone-producing adenoma revealed by intensive double- and triple-immunostaining for CYP11B2/B1 and CYP17*. Mol Cell Endocrinol, 2016. **422**: p. 57-63.
68. Abe, T., et al., *A Novel CYP11B2-Specific Imaging Agent for Detection of Unilateral Subtypes of Primary Aldosteronism*. J Clin Endocrinol Metab, 2016. **101**(3): p. 1008-15.
69. Alvarez-Madrazo, S., J.M. Connell, and E.M. Freel, *Role of genetic variation in regulation of aldosterone biosynthesis*. Endocr Dev, 2011. **20**: p. 106-15.
70. Azizi, M., L. Amar, and J. Menard, *Aldosterone synthase inhibition in humans*. Nephrol Dial Transplant, 2013. **28**(1): p. 36-43.
71. MacKenzie, S.M., E. Davies, and S. Alvarez-Madrazo, *Analysis of the Aldosterone Synthase (CYP11B2) and 11beta-Hydroxylase (CYP11B1) Genes*. Methods Mol Biol, 2017. **1527**: p. 139-150.
72. Mornet, E., et al., *Characterization of two genes encoding human steroid 11 beta-hydroxylase (P-450(11) beta)*. J Biol Chem, 1989. **264**(35): p. 20961-7.
73. Amar, L., et al., *Progress in primary aldosteronism. Mineralocorticoid antagonist treatment for aldosterone-producing adenoma*. Eur J Endocrinol, 2015. **172**(3): p. R125-9.
74. Connell, J.M., et al., *A lifetime of aldosterone excess: long-term consequences of altered regulation of aldosterone production for cardiovascular function*. Endocr Rev, 2008. **29**(2): p. 133-54.
75. Brown, N.J., *Eplerenone: cardiovascular protection*. Circulation, 2003. **107**(19): p. 2512-8.

## 8 Anhang

76. Brown, R., J. Quirk, and P. Kirkpatrick, *Eplerenone*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(3): p. 177-8.
77. Lamberts, S.W., et al., *The new aromatase inhibitor CGS-16949A suppresses aldosterone and cortisol production by human adrenal cells in vitro*. J Clin Endocrinol Metab, 1989. **69**(4): p. 896-901.
78. Menard, J. and L. Pascoe, *Can the dextroenantiomer of the aromatase inhibitor fadrozole be useful for clinical investigation of aldosterone-synthase inhibition?* J Hypertens, 2006. **24**(6): p. 993-7.
79. Trunet, P.F., et al., *The effects of fadrozole hydrochloride on aldosterone secretion in healthy male subjects*. J Clin Endocrinol Metab, 1992. **74**(3): p. 571-6.
80. Amar, L., et al., *Aldosterone synthase inhibition with LCI699: a proof-of-concept study in patients with primary aldosteronism*. Hypertension, 2010. **56**(5): p. 831-8.
81. Bertagna, X., et al., *LCI699, a potent 11beta-hydroxylase inhibitor, normalizes urinary cortisol in patients with Cushing's disease: results from a multicenter, proof-of-concept study*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(4): p. 1375-83.
82. Weldon, S.M., et al., *Selectivity of BI 689648, a Novel, Highly Selective Aldosterone Synthase Inhibitor: Comparison with FAD286 and LCI699 in Nonhuman Primates*. J Pharmacol Exp Ther, 2016. **359**(1): p. 142-50.
83. Meyers, K., et al., *Dihydrobenzisoxazole-4-one compounds are novel selective inhibitors of aldosterone synthase (CYP11B2) with in vivo activity*. Bioorg Med Chem Lett, 2018. **28**(5): p. 979-984.
84. Han, J., et al., *18F half-life measurement using a high-purity germanium detector*. Appl Radiat Isot, 2012. **70**(11): p. 2581-5.
85. Schmitz, S., *Der Experimentator: Zellkultur*. Sabine Schmitz. 2011, Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. XVI, 272 S.
86. Yasumura, Y., V. Buonassisi, and G. Sato, *Clonal Analysis of Differentiated Function in Animal Cell Cultures*. Cancer Research, 1966. **26**(3 Part 1): p. 529.
87. H., T.A., *Animal cell cultures as a source of hormones*. Biotechnology and Bioengineering, 1969. **11**(2): p. 109-126.
88. Yasumura, Y., *Retention of differentiated function in clonal animal cell lines, particularly hormone-secreting cultures*. Am Zool, 1968. **8**(2): p. 285-305.

## 8 Anhang

89. Gazdar, A.F., et al., *Establishment and Characterization of a Human Adrenocortical Carcinoma Cell Line That Expresses Multiple Pathways of Steroid Biosynthesis*. Cancer Research, 1990. **50**(17): p. 5488.
90. Strajhar, P., et al., *Steroid profiling in H295R cells to identify chemicals potentially disrupting the production of adrenal steroids*. Toxicology, 2017. **381**: p. 51-63.
91. Gracia, T., et al., *The H295R system for evaluation of endocrine-disrupting effects*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2006. **65**(3): p. 293-305.
92. Rainey, W.E., I.M. Bird, and J.I. Mason, *The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies*. Mol Cell Endocrinol, 1994. **100**(1-2): p. 45-50.
93. Müller-Vieira, U., M. Angotti, and R.W. Hartmann, *The adrenocortical tumor cell line NCI-H295R as an in vitro screening system for the evaluation of CYP11B2 (aldosterone synthase) and CYP11B1 (steroid-11 $\beta$ -hydroxylase) inhibitors*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2005. **96**(3): p. 259-270.
94. Ulmschneider, S., et al., *Synthesis and evaluation of imidazolylmethylenetetrahydronaphthalenes and imidazolylmethyleneindanes: potent inhibitors of aldosterone synthase*. J Med Chem, 2005. **48**(6): p. 1796-805.
95. Gabor, S., *Präklinische Evaluation von Aldosteronsynthaseinhibitoren als PET-Tracer für die Differentialdiagnostik des primären Hyperaldosteronismus mit besonderem Fokus auf Cyanofluorphenylpyridinen und deren Derivate*. 2017.
96. Luttmann, W., et al., *Der Experimentator: Immunologie*. 2009, Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. XIV, 309 S.
97. Lang, G., *Histotechnik*. 2. Auflage ed. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. 2012, Vienna: Springer Vienna. IX, 427 S.
98. Loening, A.M. and S.S. Gambhir, *AMIDE: a free software tool for multimodality medical image analysis*. Mol Imaging, 2003. **2**(3): p. 131-7.
99. Preda, V.A., et al., *THERAPY IN ENDOCRINE DISEASE: Etomidate in the management of hypercortisolaemia in Cushing's syndrome: a review*. 2012. **167**(2): p. 137.
100. White, P.C. and P.W. Speiser, *Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency\**. Endocrine Reviews, 2000. **21**(3): p. 245-291.

## 8 Anhang

101. I., N.M., *An Update of Congenital Adrenal Hyperplasia*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2004. **1038**(1): p. 14-43.
102. Ehmer, P.B., et al., *Development of a test system for inhibitors of human aldosterone synthase (CYP11B2): screening in fission yeast and evaluation of selectivity in V79 cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2002. **81**(2): p. 173-9.
103. Rigel, D.F., et al., *Pharmacodynamic and pharmacokinetic characterization of the aldosterone synthase inhibitor FAD286 in two rodent models of hyperaldosteronism: comparison with the 11beta-hydroxylase inhibitor metyrapone*. J Pharmacol Exp Ther, 2010. **334**(1): p. 232-43.
104. Rossi, G.P., et al., *A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(11): p. 2293-300.
105. Nanba, K., et al., *Histopathological diagnosis of primary aldosteronism using CYP11B2 immunohistochemistry*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(4): p. 1567-74.
106. Ono, Y., et al., *Different expression of 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase between aldosterone-producing microadenomas and macroadenomas*. Hypertension, 2014. **64**(2): p. 438-44.
107. Hartmann, R.W., U. Muller, and P.B. Ehmer, *Discovery of selective CYP11B2 (aldosterone synthase) inhibitors for the therapy of congestive heart failure and myocardial fibrosis*. Eur J Med Chem, 2003. **38**(4): p. 363-6.
108. Hahner, S., *Acute adrenal crisis and mortality in adrenal insufficiency: Still a concern in 2018!* Ann Endocrinol (Paris), 2018. **79**(3): p. 164-166.
109. Pulzer, A., S. Burger-Stritt, and S. Hahner, *Addison's disease : Primary adrenal insufficiency*. Internist (Berl), 2016. **57**(5): p. 457-69.
110. Lang, K. and M. Reincke, *Conn-Syndrom – mehr als nur Aldosteronexzess?* Dtsch med Wochenschr, 2018. **143**(03): p. 143-146.
111. Fallo, F., et al., *Histopathological and genetic characterization of aldosterone-producing adenomas with concurrent subclinical cortisol hypersecretion: a case series*. Endocrine, 2017. **58**(3): p. 503-512.
112. Apostolopoulou, K., et al., *Gender differences in anxiety and depressive symptoms in patients with primary hyperaldosteronism: a cross-sectional study*. World J Biol Psychiatry, 2014. **15**(1): p. 26-35.

## 8 Anhang

113. Hanslik, G., et al., *Increased prevalence of diabetes mellitus and the metabolic syndrome in patients with primary aldosteronism of the German Conn's Registry*. Eur J Endocrinol, 2015. **173**(5): p. 665-75.
114. Di Dalmazi, G., et al., *Subclinical hypercortisolism: a state, a syndrome, or a disease?* Eur J Endocrinol, 2015. **173**(4): p. M61-71.
115. Yang, Y., et al., *Classification of microadenomas in patients with primary aldosteronism by steroid profiling*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2019. **189**: p. 274-282.
116. Monticone, S., et al., *Clinical Management and Outcomes of Adrenal Hemorrhage Following Adrenal Vein Sampling in Primary Aldosteronism*. Hypertension, 2016. **67**(1): p. 146-52.



### 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Histologischer Aufbau der Nebenniere .....	1
Abb. 2	Überblick über die Steroidhormonsynthese .....	4
Abb. 3	Regulation der Kortisolsynthese .....	5
Abb. 4	Übersicht über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System .....	6
Abb. 5	Schematischer Vergleich der häufigen Ursachen eines PHA .....	9
Abb. 6	Übersicht über das diagnostische Vorgehen bei Verdacht auf einen PHA .....	12
Abb. 7	Überblick über die Subtyppendifferenzierung bei gesichertem PHA .....	14
Abb. 8	Stoffklassen der untersuchten Substanzen .....	26
Abb. 9	Pipettierschema der Inhibitorversuche .....	32
Abb. 10	Graphische Auswertung der Naphtylpyridine (Inhibitoren 1 und 2) im Vergleich zu FAD286 in Y1-hsCYP11B1- und Y1-hsCYP11B2-Zellen .....	43
Abb. 11	Graphische Auswertung der Cyanofluorphenylpyridine (Inhibitoren 3-8) im Vergleich zu FAD286 in Y1-hsCYP11B1- und Y1-hsCYP11B2-Zellen .....	44
Abb. 12	Graphische Auswertung der Trifluormethylfluorphenylpyridine (Inhibitoren 9-11) im Vergleich zu FAD286 in Y1-hsCYP11B1- und Y1-hsCYP11B2-Zellen .....	45
Abb. 13	Graphische Auswertung der Naphthylpyridine (Inhibitoren 1 und 2) im Vergleich zu FAD286 in NCI-H295-Zellen .....	48
Abb. 14	Graphische Auswertung der Cyanofluorphenylpyridine (Inhibitoren 3-8) im Vergleich mit FAD286 in NCI-H295-Zellen .....	49
Abb. 15	Graphische Auswertung der Trifluormethylfluorphenylpyridine (Inhibitoren 9-11) im Vergleich zu FAD286 in NCI-H295-Zellen .....	50
Abb. 16	Einfluss der Kaliumchlorid-Substitution auf Kortikosteron und Aldosteron ....	54
Abb. 17	Vergleich der Wirkung von FAD286 und Inhibitor 4 nach 30, 60 und 120 Minuten .....	55
Abb. 18	Einfluss der Inhibitoren 4 und 5 auf die Kortikosteronsynthese im Vergleich zu FAD286 .....	56
Abb. 19	Einfluss der Inhibitoren 4 und 5 auf die Aldosteronsynthese im Vergleich zu FAD286 .....	56
Abb. 20	Vergleich der Hämatoxylin-Eosin-Färbung und der Immunhistochemie .....	57
Abb. 21	Detailaufnahme der mittels Immunhistochemie gefärbten Nebenniere .....	58
Abb. 22	Detailaufnahme einer mittels Immunhistochemie gefärbten Nebenniere .....	58

## 8 Anhang

Abb. 23 Immunhistochemische Färbung eines gesicherten APA (Anti-CYP11B2-Ak)	59
Abb. 24 Immunhistochemische Färbung eines gesicherten CPA .....	59
Abb. 25 Vergleich der Bindungsstudien mit den Tracern 3, 4, 5 und 10.....	60
Abb. 26 Vergleich von Bindungsstudien und Immunhistochemie .....	61
Abb. 27 Vergleich vier verschiedener Ansätze für Bindungsstudien mit Tracer 11.....	61

## Danksagung

Auf dieser Seite möchte ich den Personen danken, ohne deren Unterstützung und Verständnis diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Als erstes bedanke ich mich bei meiner Doktormutter, Frau Professor Stefanie Hahner, nicht nur für die Ermöglichung dieser Arbeit, sondern auch für die kontinuierliche Unterstützung, die gute Betreuung und Förderung und das mir entgegengebrachte Verständnis. Außerdem auch für kurzfristige Gesprächstermine, Ermutigungen und ihre Vorbildfunktion.

Ich danke Herrn Dr. Andreas Schirbel, von der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, für die Synthese der Substanzen und Tracer, die chemische Beratung und Hilfestellung beim Aussprechen von Wörtern, wie Naphthylpyridine, Cyanofluorphenylpyridine und Trifluormethylfluorphenylpyridine.

Für die Betreuung danke ich Frau Dr. Britta Heinze. Das gesamte Team des endokrinen Forschungslabors hat mich während den Experimenten unterstützt, beraten und bei kritischen Versuchen die Daumen gedrückt. Vielen Dank an Katja Marienfeld, Martina Zink, Michaela Bekteshi, Sabine Kendl und Sonja Steinhauer, außerdem auch herzlichen Dank an Frau Dr. Carmina Fuß und Frau Dr. Isabel Weigand. Allen Mitarbeitern des Hormonlabors danke ich für sehr viele Messungen am Immulite, den freundlichen Umgang und die Nachsicht mit mir, wenn ich manchmal völlig unverhofft mit zahlreichen Proben im Gepäck bei ihnen aufkreuzte. Ich danke auch dem gesamten Leitungsteam der Endokrinologie, für die gute Integration und Förderung des Nachwuchses.

Mein großer Dank gebührt auch meiner Familie – Ihr habt mir schon in der Grundschule geholfen runde „O“s zu schreiben und nie aufgehört mich zu unterstützen. Liebe Eltern, liebe Iridia und lieber Emanuel, Ihr seid meine größten Vorbilder und immer für mich da.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meiner Freundin, die mir immer den Rücken gestärkt hat und nie von meiner Seite weicht. Vielen Dank für Alles, liebe Lena.