

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ. Prof. Dr. med. M. Reincke

**Morphometrische und immunhistochemische Analyse von Aldosteron-  
produzierenden Adenomen auf Basis eines Tissue-Microarrays**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Philippe Ludwig

aus Düdelingen (Luxemburg)

2021

–  
Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. F. Beuschlein

Mitberichterstatter: Prof. Dr. S. R. Bornstein  
PD Dr. Dr. U. Lichtenauer  
PD Dr. U. Dendorfer

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Yara Rhayem

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2021

Meinen Großeltern





---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 .. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Anatomie und Funktion der Nebenniere .....	1
1.1.1 Morphologie der Nebenniere .....	1
1.1.2 Synthese der Steroidhormone in der Nebennierenrinde .....	2
1.1.3 Regulation der Synthese von Aldosteron und Cortisol.....	3
1.1.4 Physiologische Funktion von Aldosteron und Cortisol .....	4
1.2 Primärer Hyperaldosteronismus.....	5
1.2.1 Historische Einordnung und Prävalenz .....	5
1.2.2 Klinik des primären Hyperaldosteronismus .....	6
1.2.3 Diagnostik des primären Hyperaldosteronismus .....	6
1.2.4 Therapie des primären Hyperaldosteronismus .....	7
1.2.5 Bestimmung des Therapieerfolgs nach Adrenalectomie bei APA .....	8
1.2.6 Pathogenese der Aldosteron-produzierenden Adenome.....	8
1.2.6.1 KCNJ5 .....	9
1.2.6.2 Die Kalziumkanäle - CACNA1D und CACNA1H .....	9
1.2.6.3 Die ATPasen – ATP1A1 und ATP2B3.....	9
1.2.6.4 PRKACA .....	10
1.2.6.5 CTNNB1 .....	10
1.3 Morphometrie und Immunhistochemie .....	10
1.3.1 Morphologie von APA.....	10
1.3.2 Immunhistochemie von APA .....	11
1.3.3 Digitale Bildanalyse .....	12
1.4 Ziele der Arbeit .....	12
<b>2 .. Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
2.1 Verwendetes Gewebe und eingeschlossene Patienten .....	14
2.2 Herstellung eines Tissue Microarray (TMA) .....	14
2.3 HE- und immunhistochemische Färbung .....	15
2.4 Computergestützte Bildanalyse.....	16
2.4.1 Bildanalyse der HE-Schnitte.....	17
2.4.2 Bildanalyse der IHC-Schnitte.....	18
2.5 Erhebung der klinischen, biochemischen und tumorspezifischen Daten.....	19
2.5.1 Klinische Daten .....	19

2.5.2	Biochemische Daten .....	20
2.5.3	Tumor-spezifische Daten .....	20
2.5.4	Outcomes.....	21
2.5.4.1	Klinisches Outcome .....	21
2.5.4.2	Biochemisches Outcome .....	21
2.6	Bestimmung des Genotyps .....	22
2.7	Statistische Auswertung der Daten .....	24
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>25</b>
3.1	Beschreibung der Kohorte .....	25
3.1.1	Erhobene Daten .....	25
3.1.2	Geschlechts- und Genotypverteilung .....	25
3.1.3	Altersverteilung .....	27
3.1.4	Präoperative klinische und laborchemische Parameter .....	29
3.1.5	Postoperative klinische und laborchemische Parameter .....	31
3.1.6	Tumorgröße und Lateralisationsindex .....	31
3.1.7	Klinisches und biochemisches Outcome nach Adrenaektomie .....	33
3.2	Morphometrische Analyse.....	36
3.2.1	Erhobene Parameter und interne Korrelationen .....	36
3.2.2	Geschlechtsunterschiede in der Morphometrie .....	38
3.2.3	Unterschiede in der Morphometrie nach Genotyp .....	39
3.2.4	Korrelationen der Morphometrie mit klinischen, biochemischen und Tumor-spezifischen Parametern .....	41
3.2.4.1	Altersverteilung.....	43
3.2.4.2	Klinische Parameter .....	43
3.2.4.3	Biochemische Parameter.....	44
3.2.4.4	Tumor-spezifische Messwerte .....	45
3.2.5	Korrelationen der Morphometrie mit dem Therapieerfolg .....	46
3.3	Immunhistochemische Analyse der CYP11B1-Expression.....	47
3.3.1	Erhobene Parameter und interne Korrelationen .....	47
3.3.2	Geschlechtsunterschiede in der CYP11B1-Expression .....	48
3.3.3	Unterschiede in der CYP11B1-Expression nach Genotyp .....	49
3.3.4	Korrelationen der CYP11B1-Expression mit klinischen und biochemischen Parametern .....	51
3.3.5	Korrelationen der CYP11B1-Expression mit dem Therapieerfolg .....	52
3.4	Immunhistochemische Analyse der CYP11B2-Expression.....	55

---

3.4.1	Erhobene Parameter und interne Korrelationen .....	55
3.4.2	Geschlechtsunterschiede in der CYP11B2-Expression .....	56
3.4.3	Unterschiede in der CYP11B2-Expression nach Genotyp .....	56
3.4.4	Korrelationen der CYP11B2-Expression mit klinischen und biochemischen Messwerten .....	58
3.4.5	Korrelationen der CYP11B2-Expression mit dem Therapieerfolg .....	58
3.5	Zusammenhänge der bildanalytischen Parametern .....	59
3.5.1	Korrelationen zwischen der Morphometrie und der CYP11B1-Expression .....	59
3.5.2	Korrelationen zwischen der Morphometrie und der CYP11B2-Expression .....	60
3.5.3	Korrelationen der immunhistochemischen Färbungen.....	61
<b>4</b>	<b>.. Diskussion .....</b>	<b>62</b>
4.1	Betrachtung der Studienpopulation .....	62
4.1.1	Geschlechtsverteilung .....	62
4.1.2	Genotypverteilung .....	62
4.1.2.1	KCNJ5 .....	63
4.1.2.2	CACNA1D .....	63
4.1.2.3	Die ATPasen – ATP1A1 und ATP2B3.....	63
4.1.2.4	CTNNB1 .....	64
4.1.2.5	PRKACA .....	64
4.1.2.6	Wildtyp und nicht-rekurrente Mutationen .....	64
4.1.3	Altersverteilung .....	65
4.1.4	Präoperative biochemische und klinische Messwerte .....	65
4.1.5	Postoperative biochemische und klinische Messwerte .....	65
4.1.6	Tumor-spezifische Parameter .....	66
4.1.7	Bewertung des Therapieerfolgs .....	67
4.1.7.1	Bewertung des biochemischen Therapieerfolgs.....	67
4.1.7.2	Bewertung des klinischen Therapieerfolgs .....	67
4.2	Morphometrie .....	68
4.2.1	Anmerkungen zur Morphometrie .....	68
4.2.2	Geschlechts- und Genotypverteilung .....	69
4.2.3	Biochemische, klinische und Tumor-spezifische Parameter in Abhängigkeit vom Therapieerfolg .....	70
4.3	CYP11B1-Expression.....	71
4.3.1	Geschlechts- und Genotypverteilung .....	71
4.3.2	Biochemische, klinische, Tumor-spezifische Messwerte und Therapieerfolg .....	72

---

4.4 CYP11B2-Expression.....	73
4.5 Interaktionen der Bildanalyse .....	74
4.6 Stärken und Schwächen dieser Studie.....	74
4.6.1 Stärken und Schwächen in Bezug auf die Arbeit mit einem Tissue-Microarray ...	74
4.6.2 Stärken und Schwächen der digitalen Bildanalyse .....	75
4.6.3 Stärken und Schwächen der verwendeten Studienkohorte .....	76
4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick.....	76
4.7.1 Charakterisierung von APAs .....	76
4.7.2 Die CYP11B1-Expression im Kontext des „Connshing-Syndroms“ .....	77
4.7.3 Implikationen auf die Subtyp-Differenzierung bei PA-Patienten.....	78
<b>5 ..Zusammenfassung .....</b>	<b>80</b>
<b>6 ..Literaturverzeichnis .....</b>	<b>82</b>
<b>7 ..Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme .....</b>	<b>91</b>
<b>8 ..Danksagung.....</b>	<b>93</b>
<b>9 ..Veröffentlichungen.....</b>	<b>94</b>

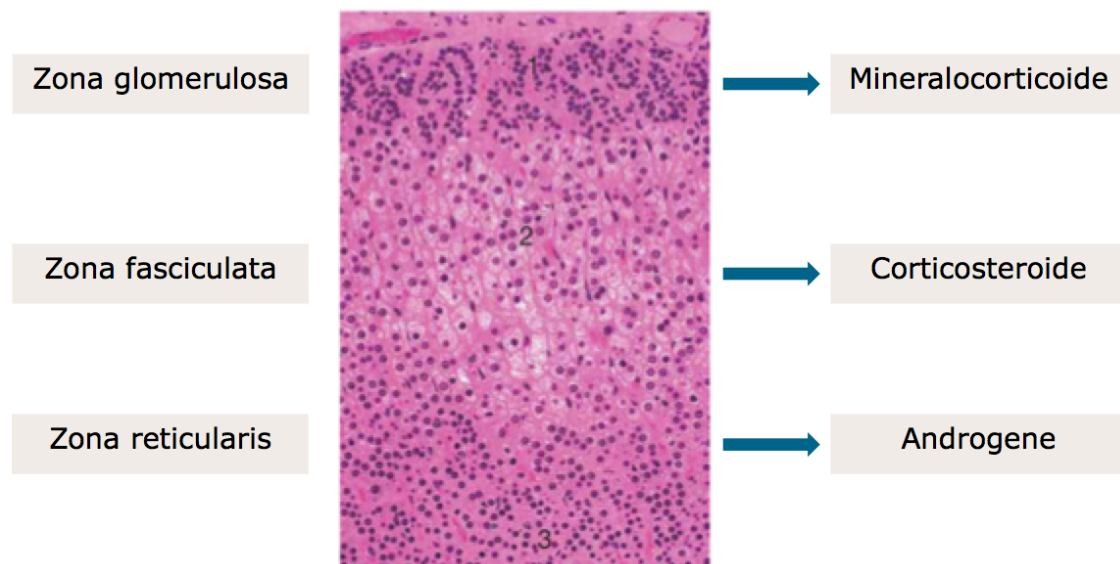
# 1 Einleitung

## 1.1 Anatomie und Funktion der Nebenniere

Die Nebenniere ist ein paarig angelegtes retroperitoneales Organ, welches sich am jeweiligen oberen Pol der Nieren befindet (1). Sie besteht aus zwei entwicklungsgeschichtlich getrennten Anteilen: dem innen liegenden Nebennierenmark, welches aus der Neuralleiste entstammt und an der Katecholaminsynthese mitbeteiligt ist, und der außen liegenden Nebennierenrinde, welche aus dem Zölomepithel entstammt und Steroidhormone produziert (2). Diese Arbeit befasst sich mit der Nebennierenrinde.

### 1.1.1 Morphologie der Nebenniere

Die menschliche Nebennierenrinde besteht aus drei mikroskopisch differenzierbaren Schichten: Zona glomerulosa (ZG), Zona fasciculata (ZF) und Zona reticularis (ZR) (2). Diese Dreiteilung ist in Abb. 1 dargestellt.



**Abb. 1** Die menschliche Nebennierenrinde  
Adaptiert nach (2).

Die äußere, in Nestern direkt unterhalb der bindegewebsreichen Kapsel gelegene Zona glomerulosa entspricht etwa 5% des Cortex und besteht aus kleinen, lipidarmen Zellen. Die darunter gelegene Zona fasciculata macht mit etwa 75 % der Rinde den größten Anteil aus. Sie besteht aus größeren, säulenbildenden Zellen mit hohem Lipidanteil, welche in

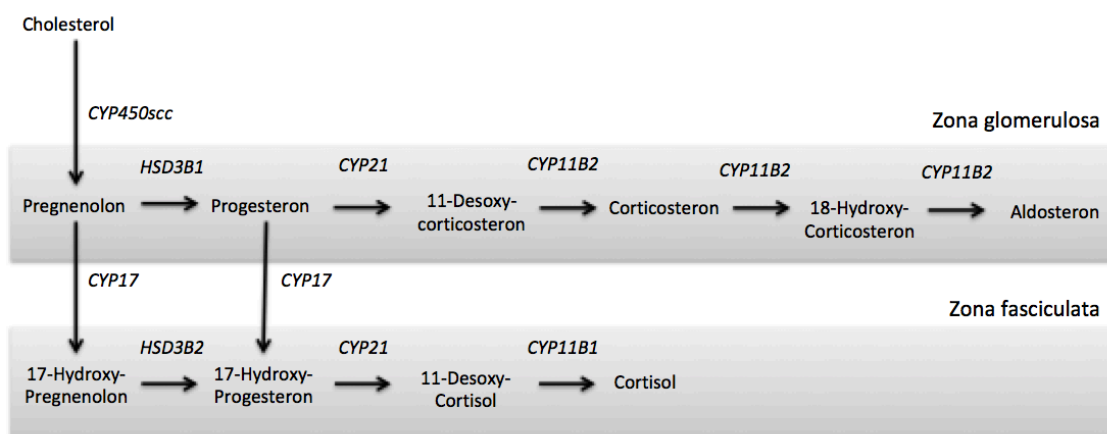
paraffineingebetteten histologischen Schnitten einem klarzelligen Bild entsprechen. Die Zona fasciculata dehnt sich von der Zona glomerulosa aus bis zur darunter liegenden Zona reticularis (3, 4). Diese besteht aus mittelgroßen, kompakten Zellen mit stark azidophilem Zytoplasma, vielen Lipofuszingranula und dichten Kernen. Die Zellen der ZR bilden verzweigte Stränge und grenzen nach innen an die Zellen des Nebennierenmarks (2).

### 1.1.2 Synthese der Steroidhormone in der Nebennierenrinde

Die Nebennierenrinde ist ein wichtiges Organ in der Synthese von Steroidhormonen. Die verschiedenen Zonen unterscheiden sich neben ihrer Morphologie auch in ihrer Fähigkeit, Hormone zu produzieren (2). Aldosteron wird in der ZG synthetisiert, Cortisol in der ZF und adrenale Androgene, wie Dihydroepiandrosteron (DHEA), Dihydroepiandrosteron-Sulfat (DHEA-S) und Androstendion in der ZR (3).

Die ersten enzymatischen Schritte der Steroidgenese in der Nebennierenrinde sind in allen Zonen gleich, während die letzten Schritte sich durch Zonen-spezifische Enzyme und Zonen-definierende Produkte unterscheiden (3).

Zuerst wird intrazelluläres Cholesterin durch das *Steroidogenic acute regulatory protein* (StAR) von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran transportiert. Dort wird das Cholesterin durch den Enzymkomplex *P450<sub>scc</sub>* durch Seitenkettenspaltung zu Pregnenolon verarbeitet. Das Pregnenolon diffundiert anschließend aus den Mitochondrien in das Zytoplasma (5). Im darauffolgenden Schritt unterscheiden sich die Stoffwechselwege je nach NNR-Zone.



**Abb. 2** Übersicht über die Stoffwechselwege der Steroidogenese. Schema erstellt nach (5, 6).

---

In der ZG verstoffwechselt das Enzym *3-beta-Hydroxysteroiddehydrogenase 1 (HSD3B1)* das Pregnenolon im Endoplasmatischen Retikulum zu Progesteron. Dieses wird durch 21-Hydroxylierung zu Desoxycorticosteron, welches zurück in die Mitochondrien transportiert wird (6, 7). Dort werden die weiteren Schritte über Corticosteron und 18-Hydroxycorticosteron zu Aldosteron durch CYP11B2 durchgeführt. Dieses Enzym ist spezifisch für die ZG (8), auch wenn nicht alle Zellen, welche morphologisch dem ZG-Typ entsprechen, es auch exprimieren (3).

In der ZF wird Pregnenolon durch die CYP17A1-Hydroxylase, die *3-beta-Hydroxysteroiddehydrogenase 2 (HSD3B2)* und CYP21A2 zu 11-Desoxycortisol umgewandelt. Dieses wird in den Mitochondrien durch CYP11B1 zu Cortisol umgewandelt (8).

Die in der ZR lokalisierte Androgensynthese ist für diese Arbeit weniger relevant und wird somit nicht weiter ausgeführt.

### *1.1.3 Regulation der Synthese von Aldosteron und Cortisol*

**Aldosteron:** Die wichtigsten physiologischen Stimuli der Aldosteronsynthese sind Angiotensin II als Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und ein erhöhter Serumkaliumwert (9, 6). Auch das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) stimuliert kurzfristig die Produktion von Aldosteron (10).

Im Rahmen des RAAS kommt es bei einem in den Epitheloidzellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere gemessenen Abfall des Blutdrucks oder –volumen zu einer Freisetzung des proteolytischen Enzyms Renin. Dieses spaltet das von der Leber produzierte Angiotensinogen zu Angiotensin I ( $AT_1$ ). Die Endothelzellen von Blutgefäßen, vor allem der Lungengefäße, produzieren ein weiteres Enzym dieser Kaskade, das Angiotensin Converting Enzyme (ACE). Das ACE spaltet  $AT_1$  zu Angiotensin II ( $AT_2$ ). Dieses hat eine direkte vasokonstriktive Wirkung und führt über die Bindung an Angiotensinrezeptoren in der NNR zur Aldosteronproduktion (11).

**Cortisol:** Bei der Cortisolsekretion ist zwischen einer basalen und einer stimulierten Sekretion zu unterscheiden. Die Basalsekretion folgt einem zirkadianen Rhythmus, der unter Ruhebedingungen in den frühen Morgenstunden seinen Höhepunkt hat und anschließend abfällt. Dies muss bei der Interpretation laborchemisch bestimmter Cortisolwerte beachtet werden. In Stresssituationen kommt es zudem zu einer belastungsabhängig stimulierten Sekretion von Cortisol (11).

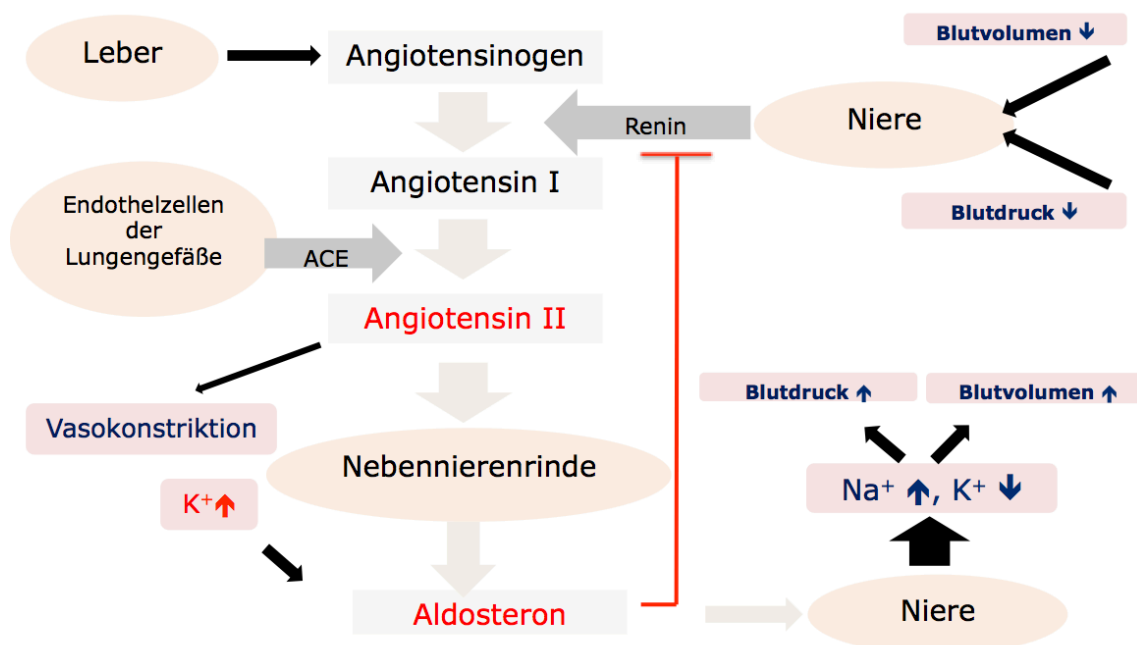
Insgesamt unterliegt die Cortisolsekretion der Kontrolle des hypothalamisch-hypophysären Regelkreises. Das hypothalamische Hormon Corticotropin-Releasing-Hormone (CRH) induziert

die Sekretion des in der Adenohypophyse produzierten ACTH, welches wiederum die Synthese von Cortisol induziert. Dieses inhibiert durch Feedback-Hemmung die Sekretion von CRH und ACTH (5, 11).

#### 1.1.4 Physiologische Funktion von Aldosteron und Cortisol

**Aldosteron:** Aldosteron bindet an die Mineralocorticoidrezeptoren, unter anderem in den distalen Tubuli der Niere. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Resorption von  $\text{Na}^+$ -Ionen und einer vermehrten  $\text{K}^+$ -Ausscheidung (6, 12, 13). Aldosteron stimuliert auch die Ausschüttung von Antidiuretischem Hormon (ADH) aus der Hypophyse (14). Beides führt zu einer Erhöhung des Blutdrucks und –volumen (11).

Weiterhin fördert Aldosteron die Bildung von Bindegewebe im Herzen im Rahmen des *cardiac remodeling* und steigert zentralnervös den Salzappetit (15, 16).



**Abb. 3** Schema des RAAS

Eigene Abbildung, adaptiert nach (11, 17).

**Cortisol:** Cortisol hat sowohl auf den allgemeinen Stoffwechsel als auch auf verschiedene Organsysteme zahlreiche Wirkungen. So kann Cortisol über Stimulation der Gluconeogenese und Hemmung des Glucosetransportes und der Glucoseverwertung eine diabetogene Wirkung haben. Gleichzeitig reduziert es Proteinspeicher und induziert Enzyme für den Katecholamin-gesteuerten Abbau von Lipidspeichern (6).



---

Cortisol wirkt immunsuppressiv und hemmt Entzündungsprozesse. Es kann längerfristig zu Osteoporose führen, hat eine hemmende Wirkung auf das Längenwachstum von Knochen, sowie eine katabole Wirkung auf die Muskulatur. Durch Wirkung im ZNS können erhöhte Cortisolwerte zu Depressionen und Lernschwierigkeiten führen. Bei hohen Glucocorticoidkonzentrationen tritt eine mineralocorticoide Wirkung in der Niere mit Natriumretention und Kaliumexkretion hinzu (6, 11).

## 1.2 Primärer Hyperaldosteronismus

### 1.2.1 Historische Einordnung und Prävalenz

Das Konzept eines Primären Hyperaldosteronismus wurde erstmals 1955 von Jerome W. Conn am Fallbericht einer Frau mit stark erhöhtem Blutdruck, Muskelkrämpfen und Lähmungen beschrieben. Durch eine inadäquate Produktion von Aldosteron durch die Nebennieren mit Entkopplung vom RAAS kommt es bei diesem Krankheitsbild zu einer Blutdruckerhöhung und Hypokaliämie (18, 19).

Ursprünglich als seltene Ursache einer sekundären Hypertonie angesehen, wurden durch verbesserte diagnostische Möglichkeiten zunehmend höhere Prävalenzen des primären Hyperaldosteronismus bekannt. Auch wenn genaue Zahlen zur Prävalenz durch stark variierende Angaben in der Literatur fehlen, ist der primäre Hyperaldosteronismus heute als eine der häufigsten Ursachen einer sekundären Hypertonie anerkannt (20). Die Prävalenzen variieren vor allem stark nach der untersuchten Population: Während in einer nicht weiter selektionierten Population mit Hypertonie die Prävalenz nur bei 7 % liegt, steigt diese auf 11,2 % bei Patienten, die in spezialisierten Zentren behandelt werden (21, 22). Auch die Art der Datenerhebung ist relevant. Insgesamt zeigen prospektive Studien niedrigere Prävalenzen als retrospektive Untersuchungen auf (20).

Die häufigsten Ursachen für einen primären Hyperaldosteronismus sind einseitige Aldosteron-produzierende Adenome (APA) und eine bilaterale adrenale Hyperplasie (BAH). APA und BAH machen über 90 % der Fälle von primärem Hyperaldosteronismus aus, wobei BAH etwas häufiger auftreten als APA. In seltenen Fällen kann eine unilaterale Hyperplasie der NNR oder ein Aldosteron-produzierendes Karzinom nachgewiesen werden (23). Familiäre Formen des Hyperaldosteronismus sind mit einer Prävalenz von etwa 6 % selten, wobei auch das zufällige Zusammentreffen sporadischer Fälle nicht auszuschließen ist (24).

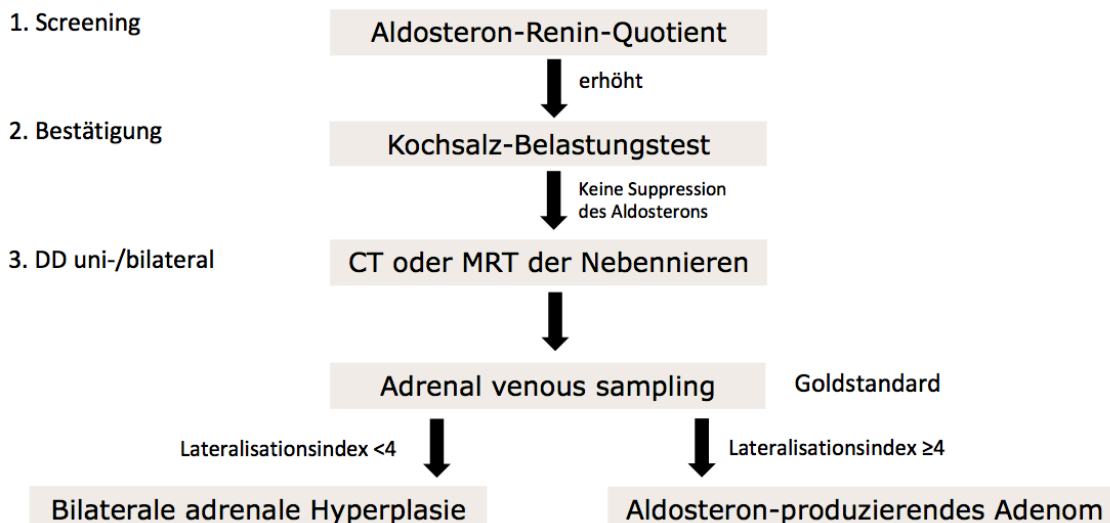
### 1.2.2 Klinik des primären Hyperaldosteronismus

Der primäre Hyperaldosteronismus ist häufig klinisch symptomarm mit normokaliämischem Bluthochdruck. Nur eine Minderheit der Patienten weist die klassische, 1955 von Conn beschriebene Trias mit Hypertonus, Hypokaliämie und Alkalose auf, wobei die Hypokaliämie jedoch bei Patienten mit APA häufiger ist als bei Patienten mit BAH (22, 25). Weiterhin wurden Muskelschwäche, -krämpfe, Parästhesien, Polyurie und Hybernatriämie beschrieben (26).

Bluthochdruck an sich hat bereits einen starken negativen Effekt auf die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität des Patienten, bei PA-Patienten ist das kardiovaskuläre Risiko jedoch noch höher (27, 28). Zusätzlich weisen diese Patienten häufiger Diabetes mellitus und ein metabolisches Syndrom, sowie Osteoporose, Depression, Angststörungen und ein schlechteres allgemeines Wohlbefinden als vergleichbare Populationen mit essentieller Hypertonie auf (29, 30, 31).

### 1.2.3 Diagnostik des primären Hyperaldosteronismus

Die Diagnostik des primären Hyperaldosteronismus erfolgt gemäß den Empfehlungen der Endocrine Society in einem mehrstufigen Verfahren, welches graphisch in Abb. 4 dargestellt ist.



**Abb. 4** Workflow der Diagnostik des primären Hyperaldosteronismus

Eigene Abbildung, nach (32).

Als erster Schritt des diagnostischen Algorithmus wird eine Selektion derjenigen Patienten empfohlen, die eine erhöhte Wahrscheinlichkeit haben, an einer sekundären Form der

---

Hypertonie zu leiden. So wird beispielsweise bei Patienten mit einem Blutdruck > 140/90 mmHg und gleichzeitig Hypokaliämie, bei Patienten mit resistenter Hypertonie (RR > 140/90 mmHg, trotz Einnahme von drei üblichen antihypertensiven Medikamenten), sowie bei hypertensiven Patienten mit Inzidentalom der Nebenniere ein weiterführendes Screening auf PA mittels Aldosteron-Renin-Quotient (ARQ) empfohlen.

Da der ARQ störanfällig auf Interaktionen mit Medikamenten und den äußeren Umständen während der Blutentnahme ist, wird im Falle eines pathologischen Ergebnisses ein Bestätigungstest empfohlen. Drei verschiedene Methoden sind etabliert: der Kochsalz-Belastungstest, der Fludrocortison-Suppressionstest und der Captopril-Test. Es gibt hierbei keinen Goldstandard; in der endokrinologischen Ambulanz des Universitätsklinikums München wird jedoch für gewöhnlich der intravenöse Kochsalz-Belastungstest durchgeführt. Bei diesem käme es beim Gesunden durch die NaCl-Infusion zu einer Suppression des Aldosterons, welche bei der autonomen Produktion des Hormons im PA ausbleibt.

Für die spätere Therapie des Krankheitsbildes ist es danach erforderlich, den Subtyp des PA zu bestimmen und eine maligne Entartung der Nebennierenrinde auszuschließen. Hierzu wird zuerst eine Schnittbildgebung empfohlen, entweder mittels Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT). Da im CT oder MRT jedoch sehr kleine Adenome übersehen werden können und keine Aussage über die Hormonproduktion eines Adenoms oder einer Hyperplasie getroffen werden kann, wird zur Lateralisationbestimmung eine Katheterisierung der Nebennierenvenen (engl. *Adrenal venous sampling, AVS*) empfohlen (32). Hierbei wird die lokale Konzentration von Aldosteron gemessen und mit der ebenfalls gemessenen Cortisolkonzentration korrigiert. Anschliessend wird der Lateralisationsindex (LI) bestimmt. Hierzu werden die Cortisol-korrigierten Aldosteronausscheidungen beider Seiten verglichen. Beträgt der LI mehr als 4:1, so ist eine unilaterale Aldosteronproduktion mit einer Sensitivität von 95% und einer Spezifität von 100 % nachgewiesen (33).

#### 1.2.4 Therapie des primären Hyperaldosteronismus

Die Therapie des primären Hyperaldosteronismus ist je nach Subtyp der Erkrankung unterschiedlich. Wenn im Rahmen der Stufendiagnostik die Diagnose BAH festgestellt wurde, wird eine medikamentöse Therapie mit einem Mineralocorticoidantagonisten (MRA), wie Spironolacton oder Eplerenon empfohlen. Diese ist im Normalfall dauerhaft erforderlich, da keine kausale Therapie erfolgt. Spironolacton ist effektiver und kostengünstiger als Eplerenon, hat jedoch antiandrogene Nebenwirkungen, die sich bei Männern etwa in der Entwicklung einer Gynäkomastie äußern können (32, 34).

---

Bei einem APA wird ein chirurgisches Vorgehen gewählt. Über einen laparoskopischen Zugang wird die betroffene Nebenniere reseziert. Dadurch wird die Quelle des Aldosteronüberschusses entfernt, was einer kausalen Therapie entspricht. Entsprechend kommt es bei der großen Mehrzahl der so behandelten Patienten zu einer Normalisierung oder Verbesserung des Bluthochdrucks (32). Im Rahmen der Adrenalectomie kann es in seltenen Fällen postoperativ zu einer Insuffizienz der ZG der gesunden Nebennierenrinde kommen, da diese durch die Aldosteronüberproduktion der kranken NNR supprimiert ist. Dies kann eine kurzzeitige Substitution durch Fludrocortison verlangen. Um dies zu vermeiden, wird vor dem Eingriff eine 6-8-wöchige Substitutionstherapie mit MRA empfohlen (35, 36).

#### 1.2.5 Bestimmung des Therapieerfolgs nach Adrenalectomie bei APA

Die operative Therapie des APA mittels laparoskopischer Adrenalectomie führt, wenn die korrekte Diagnose eines einseitigen Hyperaldosteronismus gestellt wurde, zur Normalisierung der biochemischen Werte, also insbesondere der Aldosteronsekretion. Eine medikamentenfreie Normalisierung des Bluthochdrucks kann jedoch nur in einem Teil der Fälle (42 %) erreicht werden (37). In der Literatur ist eine erhebliche Varianz der Anzahl der Patienten mit kompletter klinischer Remission zu finden (16-72 %). Dies kann sowohl durch Komorbiditäten, wie zusätzlich bestehende primäre Hypertonie, Niereninsuffizienz und Aldosteron-bedingtes *Vascular remodelling*, als auch durch bis vor kurzem fehlende standardisierte Outcome-Kriterien bedingt sein (38, 39, 40, 41).

Um die Outcome-Kriterien international zu standardisieren, wurde mit Hilfe der Delphi-Technik ein Expertenkonsensus erzielt. Da kein a-priori-Zusammenhang zwischen dem biochemischen und dem klinischen Outcome besteht, wird zwischen diesen unterschieden (38). Bei der Delphi-Methode werden den Teilnehmern in mehreren Runden Fragebögen ausgeteilt, deren Antworten jeweils ausgewertet werden und hierbei bestimmte Kriterien erfüllen müssen (42). Die von Williams et al. bestimmten Outcome-Kriterien werden auch in dieser Arbeit verwendet.

#### 1.2.6 Pathogenese der Aldosteron-produzierenden Adenome

In den letzten Jahren kam es durch *Next generation sequencing* zu einem erweiterten Verständnis der genetischen Einflüsse auf die autonome Aldosteronproduktion in APA. In etwa 60 % aller APA können mittlerweile sporadische Mutationen in verschiedenen Genen nachgewiesen werden: *KCNJ5*, *ATPA1A*, *ATP2B3*, *CACNA1D*, *CACNA1H*, *PRKACA*, *ARMC5* und *CTNNB1* (17).

---

#### 1.2.6.1 KCNJ5

*KCNJ5* codiert für den Kaliumkanal  $K_{ir}3.4$ , der in vielen verschiedenen Geweben exprimiert ist. Neben einem gehäuftem Auftreten in der ZG und den äußeren Anteilen der ZF in der Nebennierenrinde ist er auch in anderen endokrinen Geweben, im Herz, sowie im zentralen und peripheren Nervensystem zu finden (17, 43).

Die verschiedenen Mutationen des *KCNJ5*-Gens führen zu einem Verlust der Spezifität für Kalium, sodass auch Natriumionen in die Zelle einströmen können, was zu einer Depolarisation der Zellmembran führt. Dies hat die Öffnung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen zur Folge und eine erhöhte Aldosteronproduktion (43). Mutationen in *KCNJ5* sind bei 38 % der APA zu finden und stellen somit die häufigste Mutation dar (44). Neben verschiedenen somatischen Mutationen konnten auch Keimbahnmutationen in *KCNJ5* nachgewiesen werden. Diese Mutationen sind ursächlich für den Familiären Hyperaldosteronismus Typ III (45).

#### 1.2.6.2 Die Kalziumkanäle - *CACNA1D* und *CACNA1H*

Mutationen in den *CACNA1D*- und *CACNA1H*-Genen führen über eine verlängerte Öffnungsdauer von membranständigen Kalziumkanälen zu einem erhöhten Kalziumeinstrom in die betroffene Zelle mit anschließender Steigerung der Aldosteronproduktion. Wenn *CACNA1D* betroffen ist führt dies zu einer verfrühten, bei niedrigeren Potentialen initiierte Aktivierung des spannungsabhängigen Kalziumkanals  $Ca_v1.3$  mit verlängerter Öffnung des Kanals (46, 47).

*CACNA1H* codiert für den spannungsabhängigen Kalziumkanal  $Ca_v3.2$ . Die Mutation führt dazu, dass die Inaktivierung des Kanals verhindert wird und die Aktivierung bei hyperpolarisierten Potentialen stattfinden kann. Auch dies führt zu einer verlängerten Öffnungszeit des Kalziumkanals (48).

#### 1.2.6.3 Die ATPasen – *ATP1A1* und *ATP2B3*

*ATP1A1* codiert für eine  $Na^+/K^+$ -ATPase, die im Austausch gegen zwei  $K^+$ -Ionen drei  $Na^+$ -Ionen aus der Zelle herausbefördert unter hydrolytischem Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP). Dies baut einen elektrochemischen Gradienten über die Zellmembran auf, der für andere Ionentransporte benötigt wird. Bei den von Beuschlein et al. beschriebenen Mutationen in *ATP1A1* ist die Aktivität der ATPase vermindert und die Nebennierenzellen zeigen eine höhere Membranpolarisation auf. Dies führt zur Öffnung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle (46, 49).

---

Ein alternatives Erklärungsmodell für die erhöhte Aldosteronproduktion in *ATP1A1*-mutierten APA beschreibt, dass eine Mutation der ATPase zu einem Protoneneinstrom in die Zelle und einer Steigerung der Aldosteronproduktion ohne Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt (50).

*ATP2B3* codiert für eine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, die unter Verbrauch von ATP Kalziumionen gegen den Konzentrationsgradienten aus der Zelle transportiert und somit die Kalziumhomöostase aufrechterhält. Beim mutationsbedingten Ausfall der Pumpfunktion kommt es somit zum Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit darauffolgendem Anstieg der Aldosteronproduktion (49, 51).

#### 1.2.6.4 PRKACA

Die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) wird durch *PRKACA* codiert. Die Mutation, die auch in Cortisol-produzierenden Nebennierentumoren und NNR-Hyperplasien nachgewiesen werden konnte, führt zu einer dauerhaften Aktivierung der PKA (52). Diese führt zu einer abnormen Proliferation von pluripotenten Zellen (53). Verschiedene Mutationen in *PRKACA* konnten ebenfalls in APA nachgewiesen werden, sind jedoch sehr selten (54).

#### 1.2.6.5 CTNNB1

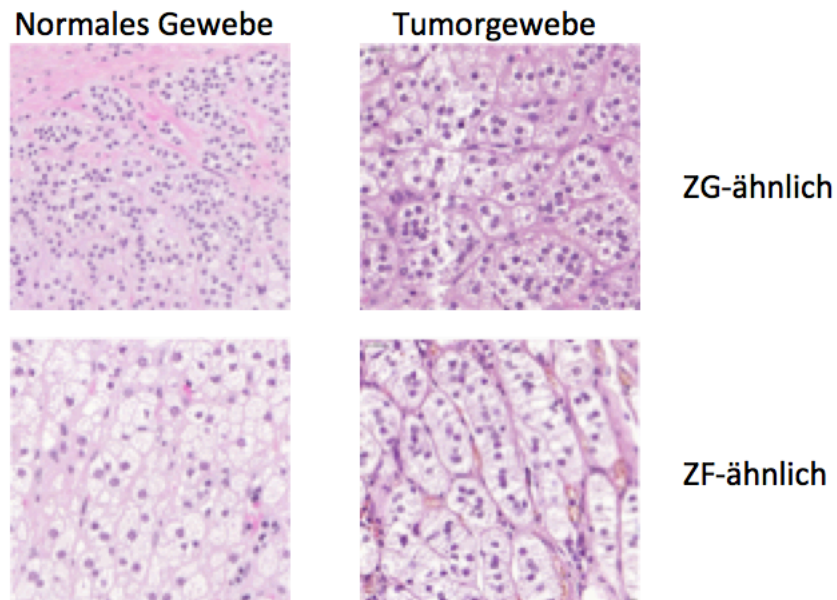
*CTNNB1* codiert für das Signalprotein  $\beta$ -Catenin, welches als intrazellulärer Transmitter im WNT/  $\beta$ -Catenin-Signalweg die Translation vieler Gene induziert. Der WNT/  $\beta$ -Catenin-Signalweg spielt allgemein eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung wie auch der Proliferation vieler Tumore (55). Auch in der Nebenniere ist dieser Signalweg wichtig für das Wachstum und die Zonierung der Nebennierenrinde, besonders der Zona glomerulosa (56).  $\beta$ -Catenin ist auch beteiligt an der Regulation der Expression von *CYP11B2*, und somit auch der Aldosteronsynthese (57, 58). Mutationen in *CTNNB1* sind ein seltener Befund bei APA (59).

### 1.3 Morphometrie und Immunhistochemie

#### 1.3.1 Morphologie von APA

Die Morphologie von APA kann ausgehend von der Morphologie der Zellen der gesunden Nebennierenrinde, welche in Abschnitt 1.1.1. näher erklärt wird, beschrieben werden. So sind in APA sowohl Zellen zu finden, die eher groß und klarzellig erscheinen und somit ZF-ähnlich

sind, als auch eher kleine, lipidarme ZG-ähnliche Zellen. Auch mittelgroße, kompakte, ZR-ähnliche Zellen können enthalten sein. Die meisten APA weisen ein heterogenes Bild mit unterschiedlichen Anteilen an diesen Zellmustern auf (4, 60). Die Zuordnung zu einem dieser Typen wird üblicherweise mit mikroskopisch unterstütztem Augenmaß durchgeführt und unterliegt somit Beobachter-abhängigen Varianzen.



**Abb. 5** Vergleich von normalem und Tumorgewebe  
Eigene Abbildung

### 1.3.2 Immunhistochemie von APA

Die Aminosäuresequenzen von *CYP11B1* und *CYP11B2* stimmen zu 93 % überein, weswegen es lange Zeit nicht möglich war, spezifische Antikörper herzustellen. 2013 gelang es erstmals monoklonale Antikörper gegen diese Gene herzustellen. Diese können nun für immunhistochemische Untersuchungen und für Western-Blot-Analysen benutzt werden (8).

Nach diesen immunhistochemischen Färbungen weisen APA eine intratumorale Heterogenität der Expressionsmuster von *CYP11B1* und *CYP11B2* auf. So konnten Tumore mit alleiniger *CYP11B1*- und *CYP11B2*-Expression, Tumore mit Co-Expression und ohne Expression eines der Enzyme nachgewiesen werden (61). Die Beurteilung der Expression der Antikörper erfolgt üblicherweise mittels visuell bestimmtem semi-quantitativem H-Score nach McCarty (62).

---

### 1.3.3 Digitale Bildanalyse

Um Beobachter-abhängige Unterschiede in der Betrachtung von histologischen Schnitten zu verringern, besteht heute die Möglichkeit, die morphometrische Analyse mit digitalen Bildanalyseprogrammen durchzuführen. Morphometrie erlaubt eine computer-gestützte Mustererkennung. Durch interaktives Training des Programmes können Zielstrukturen, wie nukleäre oder zytoplasmatische Strukturen wie Form, Farbe oder Farbintensität erkannt und definiert werden. Dabei werden nicht nur mit bloßem Auge sichtbare Strukturen aufgedeckt, sondern auch solche, die nur durch das Programm erkennbar sind, wie die genaue Zusammensetzung der Farbkomposition eines Bildes. Die digitale Bildanalyse ist reproduzierbarer als die stets subjektive Wahrnehmung eines Beobachters. Die in dieser Arbeit verwendete Software erwies sich der mikroskopischen Beobachtung überlegen in der Differenzierung zwischen benignen Onkozytomen der Niere und malignen Subtypen von Nierentumoren, wie dem klarzelligen, dem papillären und dem chromophoben Nierenzellkarzinom (63, 64).

Auch die Definition von Farbeintensitäten kann mittels digitaler Bildanalyse durchgeführt werden. Hiermit kann anstelle eines visuellen semi-quantitativen Scores wie dem H-Score nach McCarty eine quantitative Betrachtung der Intensität und des Anteils am Gesamtbild der immunhistochemischen Färbung durchgeführt werden (64, 65).

## 1.4 Ziele der Arbeit

Es wurde in vorangegangenen Studien gezeigt, dass die Genotypen mit klinischen Parametern wie dem Geschlecht, dem Alter, der Tumorgroße und den Kaliumspiegeln im Patientenserum korrelieren (44). Auch für die Histopathologie wurde in einigen Studien ein Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp vorgeschlagen. So ähneln Aldosteron-produzierende Adenome, in denen eine *KCNJ5*-Mutation nachgewiesen wurde, visuell eher Zellen vom Zona-fasciculata-Typ, während Tumore mit Mutationen in den *CACNA1D*-, *ATP1A1*- und *ATP2B3*-Genen eher Zellen vom Zona-glomerulosa-Typ gleichen (23).

Diese wissenschaftliche Arbeit sollte eine Korrelation zwischen der Morphologie und der IHC-Expression von Aldosteron-produzierenden Nebennierenadenomen mit dem genetischen Profil der Tumore und den klinischen Daten der Patienten untersuchen. Die morphometrische Analyse sollte mit dem computerbasierten Bildanalyseprogramm Definiens Developer XD erstellt werden, um eine quantitative Beurteilung der Morphologie und der IHC-Expression zu erlauben, anstelle einer semi-quantitativen Bewertung mittels eines visuellen Scores.



Die Co-Expression von *CYP11B1* und *CYP11B2* wurde als korrelierend mit einem ZG-ähnlichen Zellbild beschrieben, während ZF-ähnliche Zellen eher einer vermehrten Expression von *CYP11B1* entsprechen (61).

Die Korrelation zwischen histopathologischem Phänotyp und klinischer Präsentation der Krankheit sollte hier durch eine objektive, computerbasierte Quantifikation der Morphologie und der immunhistochemischen Expression mit einer Vielzahl an klinischen, biochemischen und genetischen Parametern dargestellt werden.

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendetes Gewebe und eingeschlossene Patienten

Zur Durchführung dieser Arbeit wurden APAs von 135 Patienten aus München und Würzburg mit gemäß der Guidelines der Endocrine Society diagnostiziertem primären Hyperaldosteronismus verwendet (32). Die Diagnosestellung, Differenzierung des Subtyps, unilaterale Adrenalectomie und postoperative Verlaufskontrolle wurden zwischen 2005 und 2015 am Klinikum der Universität München beziehungsweise am Universitätsklinikum Würzburg durchgeführt. Die klinischen und biochemischen Daten der Patienten wurden prospektiv im Rahmen des Deutschen Conn-Registers erhoben. Die operativ entnommenen Präparate wurden routinemäßig am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums München hinsichtlich ihrer Dignität, Lokalisation, Größe und Morphologie untersucht. Hierbei wurde auch die Diagnose eines APA histologisch bestätigt. Die in dieser Arbeit verwendeten Tumore wurden vom Pathologischen Institut als FFPE-Gewebe (engl. *formalin-fixed, paraffin-embedded*, Formalin-fixiert, in Paraffin eingebettet) zur Verfügung gestellt.

Sämtliche Patienten gaben eine schriftliche Einverständniserklärung zur wissenschaftlichen Verwendung ihres Nebennierengewebes und ihrer klinischen Daten. Die Ethikkommissionen der beteiligten Institutionen stimmten der Durchführung der Studie zu.

### 2.2 Herstellung eines Tissue Microarray (TMA)

Aus den für diese Arbeit verwendeten FFPE-Nebennierengewebeblöcken wurde ein Tissue Microarray (TMA) konstruiert. Dies ist eine *high-throughput*-Technik, die es erlaubt, durch die Auswahl von repräsentativen Gewebeproben eine schnellere und effizientere Analyse der Charakteristika von Tumoren durchzuführen (66).

Anhand repräsentativer HE-Schnitte der Gewebeblöcke wurde durch den Pathologen Herrn Prof. Dr. med. Axel Karl Walch vom Helmholtz-Zentrum München das Tumorgewebe identifiziert und mit einem Filzstift markiert. Anschließend wurde der TMA mit einem manuellen Tissue Arrayer MTA-1 (AlphaMetrix Biotech, Rödermark, Deutschland) erstellt. Es wurden aus jedem Tumor-Spenderblock 3 repräsentative Gewebezyylinder mit einem Durchmesser von 1 mm mit Arrayer Punches (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA) entnommen und in einen Empfängerblock übertragen. Die Position im Empfängerblock wurde manuell auf einer verstellbaren X-Y-Achse des Arrayers bestimmt und auf einem Plan mit der Identität des Spenderblocks festgehalten. Insgesamt wurden 7 Empfängerblöcke hergestellt,

---

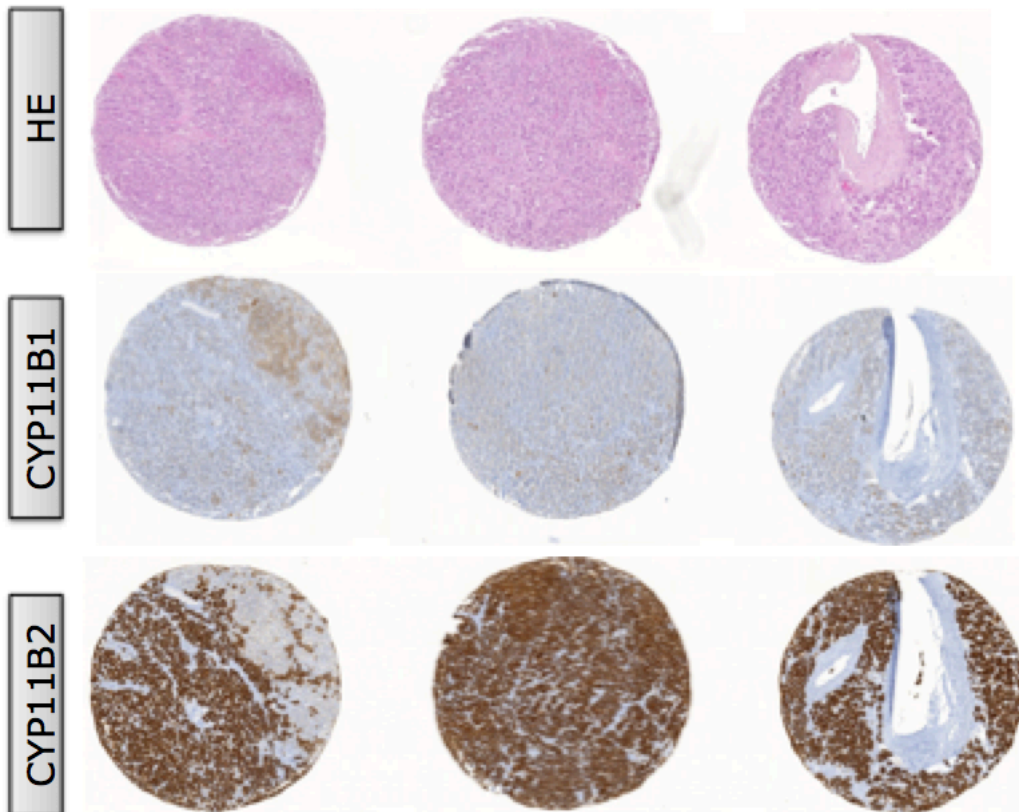
mit 18 bis 27 Gewebetriplets pro Empfängerblock. Zur Kontrolle und Markierung wurden unterschiedliche Orientierungsgewebe, wie Maus- oder Rattenleber hinzugefügt.

Mit Hilfe eines halbautomatischen Rotationsmikrotoms (Microm HM 355S, Thermofisher®, Walldorf, Deutschland) wurden 3 µm dicke Schnitte des Microarrays angefertigt und auf Objektträger (Superfrost Plus, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) übertragen.

Zur Kontrolle der korrekten Entnahme der Gewebezylinder wurde anschließend ein weiterer HE-Schnitt des Spenderblocks angefertigt.

### **2.3 HE- und immunhistochemische Färbung**

Die HE – und immunhistochemischen Färbungen wurden unter standardisierten Bedingungen mit Hilfe eines automatischen Discovery XT Stainers (Roche Diagnostics Switzerland /Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) durchgeführt. Hierzu wurden monoklonale Antikörper gegen humanes CYP11B1 und CYP11B2 verwendet, die von Dr. Celso Gomez-Sanchez, Jackson, MS, USA zur Verfügung gestellt wurden. Die Objektträger wurden mit primären Antikörpern behandelt. Der monoklonale Antikörper gegen CYP11B1 entstammte der Ratte (rat monoclonal anti-hCYP11B1 clone 80-2-2) und wurde in einem Verhältnis von 1:20 in der Verdünnungslösung Dako REAL (Dako REAL antibody dilution, Cat.-No. S2022, Dänemark) verdünnt. Der monoklonale Antikörper gegen CYP11B2 hat als Ursprungsspezies die Maus (mouse monoclonal anti-hCYP11B2 clone 41-17B) und wurde in der gleichen Verdünnungslösung im Verhältnis 1:100 verdünnt (8). Dann folgte die Detektion durch das Discovery® DAB Map Kit (Roche Diagnostics, Switzerland / Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA), einschließlich Inkubation mit den jeweiligen Sekundärantikörpern (Anti-Ratte: Vector BA 4001, 1:300; Anti-Ratte: universal secondary antibody REF 760-4205, rtu; Roche Diagnostics, Schweiz/Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA).



**Abb. 6**            **Alle Tumorproben eines Patienten.**

Oben: HE-Färbung. Mitte: IHC-Färbung gegen CYP11B1. Unten: IHC-Färbung gegen CYP11B2.

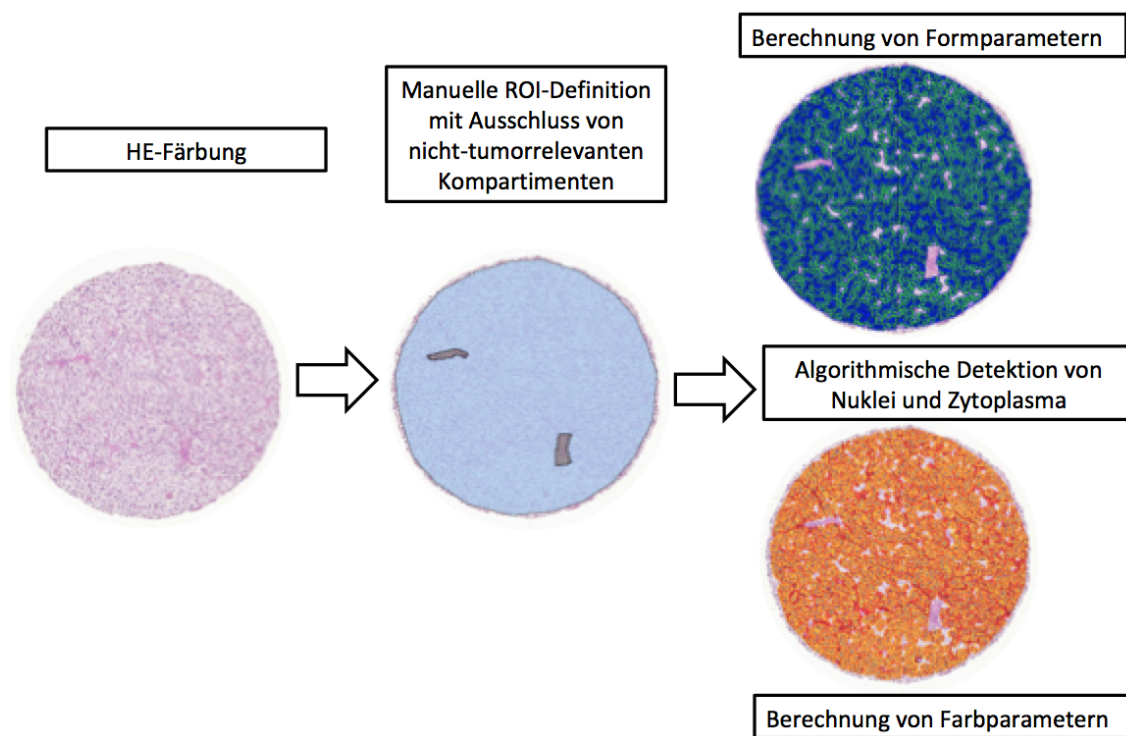
## 2.4 Computergestützte Bildanalyse

Die HE- und immunhistochemisch gefärbten Objektträger wurden in 20-facher Vergrößerung mit einem digitalen Mirax Desk® Slide Scanner (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland) und der Software Panoramic Desk (3DHistech Ltd., Budapest, Ungarn) eingescannt. Die Bildqualität der gescannten Dateien wurde mit dem Panoramic Viewer (3DHistech Ltd., Budapest, Ungarn) kontrolliert. Die Dateien wurden anschließend in das Bildanalyseprogramm Definiens Developer XD2 (Definiens AG, München, Deutschland) importiert.

Sowohl bei den HE- als auch bei den immunhistochemisch gefärbten Tumorproben wurden manuell Regions of Interest (ROI) definiert. Dadurch konnten für die nachfolgende Bildanalyse nicht-tumorrelevante Kompartimente, wie Färbeartefakte, Nerven, Blutgefäße oder Bindegewebe von der Analyse ausgeschlossen werden. Diese Selektion wurde ohne Kenntnis des genetischen und klinischen Hintergrundes der betroffenen Patienten getroffen.

### 2.4.1 Bildanalyse der HE-Schnitte

Die Bildanalyse wurde mit dem Programm Definiens Developer XD 2 Tissue Studio 3.6.1 (Definiens AG, München, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurde nach Definition der ROI mit Hilfe einer vordefinierten Applikation des Programmes (Definiens Tissue Studio) Grenzwerte definiert für die Detektion von Bildparametern. Diese wurden auf alle Proben einer Serie angewendet. Nuklei und Zytoplasma wurden durch den Thresholding- und Segmentationsalgorithmus identifiziert. (Abb. 7)



**Abb. 7** Bildanalyse eines Probenkerns in HE-Färbung

Es wurden insgesamt 180 Parameter gesammelt, die Farbe, Form und Textur auf verschiedenen Betrachtungsebenen beschreiben. In Tab. 1 wird ein Überblick über die Herkunft der gesammelten Parameter gegeben.

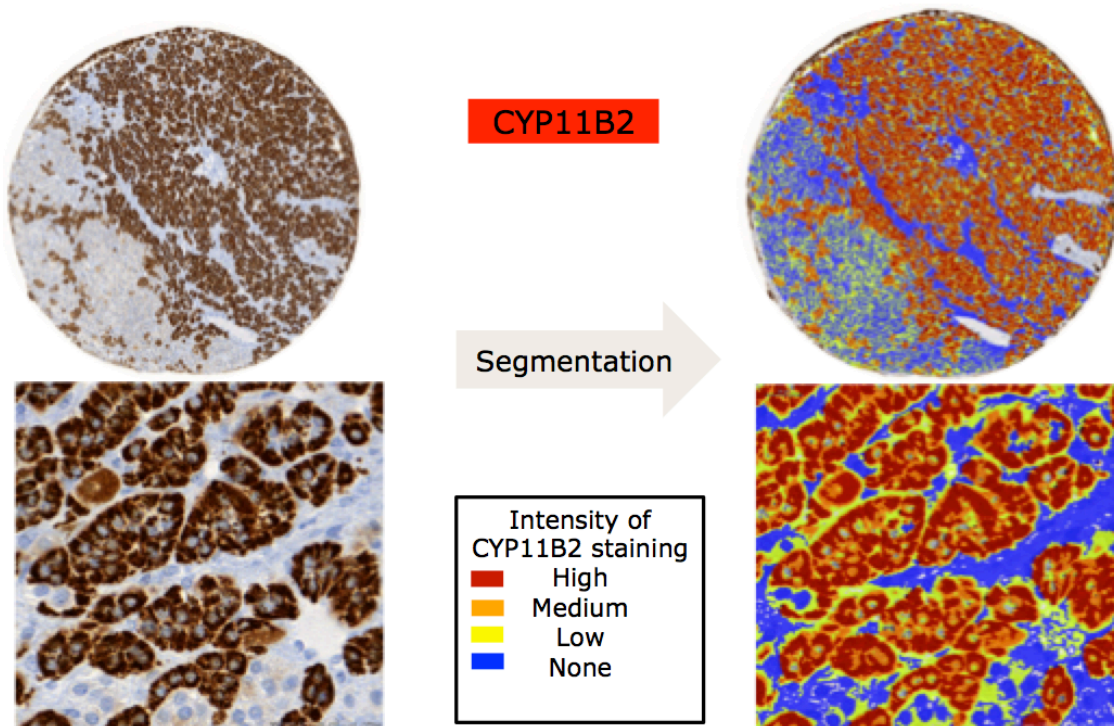
beschriebene Ebene	Anzahl der Farbparameter	Anzahl der Formparameter	Anzahl der Texturparameter
Gesamte ROI vor weiterer Analyse	/	/	7
Detektion des Zytoplasma	20	3	/
Detektion der Zellkerne	28	35	4
Gesamte ROI nach Segmentierung	35	35	5
Verhältnis Zellkerne/Zytoplasma nach Segmentierung	/	/	8
<b>Gesamt</b>	<b>83</b>	<b>73</b>	<b>24</b>

**Tabelle 1:** Zusammensetzung aller erfassten morphometrischen Parameter.

Formparameter beschreiben zum Beispiel, wie rund, elliptisch, rechteckig oder asymmetrisch die detektierte Zelle oder der Zellkern ist, welche Fläche der entdeckte Zellbestandteil hat oder wie das Verhältnis von Rand zu Fläche ist. Farbparameter beschreiben die Bräune, die Eosin-Intensität, bildanalytisch errechnete Werte für den Anteil an rot, grün und blau in einem RGB-Farbmodell oder die optische Dichte. Die Segmentierung erlaubt eine in der Helligkeit und optischen Dichte der untersuchten Zellbestandteile basierte Unterteilung in hell, moderat und dunkel. Die relative Fläche der jeweiligen Kategorien wurde berechnet und als Texturparameter extrahiert (63).

#### 2.4.2 Bildanalyse der IHC-Schnitte

Auch die Bildanalyse der IHC-Schnitte wurde mit dem Programm Definiens Developer XD 2 Tissue Studio 3.6.1 (Definiens AG, München, Deutschland) durchgeführt. Mithilfe dieses Programms wurde ein Regelsatz zur Entdeckung und Quantifikation der Intensität der braunen IHC-Färbung definiert, der eine Unterteilung in hohe („high“), mittlere („medium“) und niedrige („low“) Intensität der Färbung sowie keine Färbung („none“) erlaubt. Dieser Regelsatz wurde auf alle Dateien der CYP11B2-Färbung angewendet. Die Dateien der CYP11B1-Färbung wurden anschließend dem selben Prozedere unterzogen.



**Abb. 8** Applikation des Regelsatzes auf die IHC-Schnitte am Beispiel eines Probenkerns nach CYP11B2-Färbung

---

Anhand dieser Segmentation wurden danach mit Definiens Developer XD2 die Bildanalyse durchgeführt. Es wurden 17 immunhistochemische Parameter zu jeder der beiden Färbungen berechnet. Vier davon beschreiben die durchschnittliche Intensität der Antikörperfärbung gesamt und bezogen auf die einzelnen Stufen. Vier weitere repräsentieren den Anteil der Färbung an der Tumorprobe, ebenfalls unterteilt in die Intensitätsstufen und die gesamte Färbefläche. Sechs Parameter geben das Verhältnis einer gefärbten Fläche zur gesamten Tumorfläche an. Zwei Parameter beschreiben die Bräune der Färbung und ein Parameter errechnete einen histologischen Score.

Diese Werte bezogen sich stets auf das gesamte TMA-Tumormaterial eines Patienten.

## 2.5 Erhebung der klinischen, biochemischen und tumorspezifischen

### Daten

Die Erhebung der klinischen und biochemischen Daten im Rahmen dieser Arbeit basiert auf der Datenbank des deutschen Conn-Registers. Dieses wurde 2006 in München etabliert und erfasste bis 2007 retrospektiv die klinischen Daten von Patienten mit der Diagnose PA. Ab 2008 wurden die Daten von neu-registrierten Patienten prospektiv eingespeichert (67).

Patienten mit dem Verdacht auf einen primären Hyperaldosteronismus wurden einer leitliniengerechten Diagnostik gemäß der *Endocrine Society* in den beteiligten endokrinologischen Ambulanzen unterzogen. Ihre Daten wurden präoperativ sowie im Rahmen routinemäßiger postoperativer Nachsorgeuntersuchungen erhoben.

Daten, die zum Zeitpunkt des Abrufs nicht im Conn-Register gefunden wurden, wurden, soweit möglich, mit Hilfe von elektronischen oder physischen Patientenakten aus dem Klinikarchiv eruiert. Diese Arbeit befasst sich mit klinischen, biochemischen sowie tumorbezogenen Daten.

Sämtliche Daten wurden mit einer Microsoft Excel-2011-Tabelle (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) erfasst.

#### 2.5.1 Klinische Daten

Die klinischen Daten umfassen den systolischen ( $RR_{sys}$ ) und diastolischen Blutdruck ( $RR_{dia}$ ), die antihypertensive Medikation (aHTM), gemessen als *defined daily doses* (DDD) nach Kriterien des ATC/DDD Index 2010 ([http://www.whocc.no/atc\\_ddd\\_index/2010](http://www.whocc.no/atc_ddd_index/2010)) und den Body-Mass-Index (BMI). Die Blutdruckmessungen wurden dreimal an beiden Armen bei den prä- und postoperativen Routineuntersuchungen durchgeführt. Die hier benutzten Werte entsprechen

---

dem Mittelwert der zweiten und dritten Messung beider Arme. Weiterhin wurden Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose (ED) des Bluthochdrucks, Alter bei Adrenalektomie und Dauer zwischen ED und Adrenalektomie registriert.

### 2.5.2 *Biochemische Daten*

Die biochemischen Daten umfassen den Serumkaliumwert ( $K_s^+$ ), die Plasma-Aldosteron-Konzentration (*plasma aldosterone concentration*, PAC), die Reninaktivität und den Aldosteron-Renin-Quotienten (ARQ). Der präoperative  $K_s^+$  entspricht dem Nadir, dem niedrigsten im Verlauf gemessenen Wert. Die für die statistischen Berechnungen verwendeten PAC, Renin und ARQ entsprechen den Werten des Screeningtests. Zusätzlich wurden jene Werte von PAC, Renin und ARQ, die im Rahmen des Salz-Belastungstests erhoben wurden, für die Berechnung der Outcomes erfasst. Bei einigen wenigen Patienten waren keine Werte des Screeningtest zu eruieren, so dass hier PAC, Renin und ARQ vor dem Bestätigungstest für die Auswertung verwendet wurden.

Zusätzlich konnten bei einigen Patienten präoperative Cortisolwerte erhoben werden, welche bei der endokrinologischen Diagnostik miterfasst wurden. Diese Arbeit beschäftigt sich mit mitternächtlichen Speichelcortisol (*late night salivary cortisol*, LNSC) und Cortisol im 24-Stunden-Sammelurin.

### 2.5.3 *Tumor-spezifische Daten*

Zu den Tumor-spezifischen Daten, die erfasst wurden, gehören die Tumorgröße, der Lateralisationsindex (LI) und die Genotypisierung. Die Bestimmung des Tumorgenotyps wird näher in Kapitel 2.6 beschrieben. Die Tumorgröße wurde den Berichten des pathologischen Instituts, das die Routineuntersuchung des Adrenalektomie-Gewebes durchgeführt hatte, entnommen. Der Lateralisationsindex wurde aus den Berichten der endokrinologischen Ambulanz oder aus den Berichten der interventionellen Radiologie nach Katheterisierung der Nebennieren entnommen. Da üblicherweise beide Nebennierenvenen untersucht wurden, wurde für die Auswertung in dieser Arbeit darauf geachtet, dass stets die Werte der später operativ entfernten Nebenniere als Nenner des Seitenvergleiches des Lateralisationsindex verwendet wurden.



#### 2.5.4 Outcomes

In dieser Arbeit wurden die von Williams et al. beschriebenen und von der PASO-Gruppe (Primary Aldosteronism Surgery Outcome) definierten Outcome-Kriterien für den Therapieerfolg nach Adrenalektomie verwendet (38). Diese wurden in klinische und biochemische Outcomes unterteilt. Die verwendeten Grenzwerte sind in Tab. 2 zu finden.

Parameter [Einheit]	Referenzwerte	Anmerkung
RR <sub>sys</sub> [mmHg]	< 140	
RR <sub>dia</sub> [mmHg]	< 90	
K <sub>s</sub> <sup>+</sup> [mmol/L]	3,5 – 5,0	
PAC [ng/L]	< 236	Im Liegen
Renin [mU/L]	2,8 – 39,9	Im Liegen
ARQ [ng/mU]	≤ 12	Entspricht PAC/Renin

**Tabelle 2: Referenzwerte der klinischen und biochemischen Parameter für die Outcome-Berechnung.** Die Blutdruckwerte entsprechen den Richtlinien der *European Society of Hypertension* und der *European Society of Cardiology* von 2013 (68). Die biochemischen Grenzwerte entsprechen jenen des Instituts für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München (02/2017) und des Endokrinologischen Labors der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Universität München (12/2016).

##### 2.5.4.1 Klinisches Outcome

- **Komplette klinische Remission:** Normaler Blutdruck ohne aHTM.
- **Partielle klinische Remission:** Keine Veränderung des Blutdrucks im Vergleich zu präoperativ mit weniger aHTM **oder** Senkung des Blutdrucks mit der gleichen Anzahl an aHTM oder weniger aHTM.
- **Fehlende klinische Remission:** Keine Veränderung oder Erhöhung des Blutdrucks mit der gleichen Anzahl an aHTM oder mehr aHTM.

Steigerung oder Senkung der Blutdruckwerte sind definiert als prä- zu postoperativer Unterschied des RR<sub>sys</sub> ≥ 20 mmHg, des RR<sub>dia</sub> ≥ 10 mmHg, oder beide gemeinsam. Wenn die Veränderung von RR<sub>sys</sub> und RR<sub>dia</sub> in unterschiedliche Richtungen stattgefunden hat, wurde die Veränderung des RR<sub>sys</sub> betrachtet. Eine postoperativ unveränderte Anzahl an aHTM (DDD) wird definiert als eine Veränderung von weniger 0,5 mal der DDD der präoperativen aHTM.

##### 2.5.4.2 Biochemisches Outcome

- **Komplette biochemische Remission:** Normalisierung der Hypokaliämie, wenn diese präoperativ bestand und Normalisierung des ARQ. Bei weiterhin erhöhtem ARQ musste die Aldosteronsekretion in einem postoperativen Bestätigungstest, wie dem Salzbelastungstest, supprimiert sein.

- **Partielle biochemische Remission:** Normales  $K_s^+$ , erhöhter ARQ mit entweder  $\geq 50\%$  Verminderung der PAC oder abnormalem aber verbessertem postoperativen Bestätigungstest.
- **Fehlende biochemische Remission:** Weiterhin bestehende Hypokaliämie, erhöhter ARQ oder beide. Keine Aldosteronsuppression im postoperativen Bestätigungstest.

Die verwendeten Referenzwerte entsprechen jenen aus Tab. 2. Im postoperativen Bestätigungstest in Form des Salzbelastungstests bestand eine Suppression der Aldosteronsekretion in einer PAC  $< 5$  ng/dL nach NaCl-Infusion, ein abnormaler aber verbesserter postoperativer Salzbelastungstest musste nach NaCl-Infusion eine PAC von 5 – 10 ng/dL aufweisen.

## 2.6 Bestimmung des Genotyps

Bei den betroffenen APAs wurden somatische Mutationen mittels *whole-exome sequencing* oder direkter bidirektionaler Sanger-Sequenzierung identifiziert. Hierzu wurde Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid* (DNA)) aus peripherem Blut der Patienten und aus dem bei  $-80$  °C gefrorenen Tumorgewebe gewonnen. Hierzu wurden das Maxwell® 16 LEV Extraktor (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) mit dem Maxwell® Tissue DNA Kit (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) und dem Maxwell® Blood DNA Kit (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) benutzt. Die Anwendung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Die Qualität und Konzentration der extrahierten DNA wurden mit dem Spektrophotometer NanoDrop 1000 (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) kontrolliert.

Es wurde nach Mutationen in den Genen *KCNJ5*, *CACNA1D*, *ATP1A1*, *ATP2B3*, *PRKACA* und *CTNNB1* gesucht. Diese Genabschnitte wurden in der extrahierten DNA mit Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) vervielfältigt. Hierzu wurde die GoTaq® DNA-Polymerase (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die extrahierte DNA wurde verdünnt auf 50 ng/ $\mu$ L und dem PCR-Ansatz beigefügt. Die genaue Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist in Tabelle 3 zu finden, die gewählten Primer in Tabelle 4. Das PCR-Programm begann mit einer initialen Denaturierung bei 95 °C während zwei Minuten, 8 Amplifikationszyklen (15 Sekunden Denaturierung bei 95 °C, 15 Sekunden Annealing bei 65 °C mit  $-1$  °C bei jedem neuen Zyklus, und 30 Sekunden Extension bei 72 °C). Dann folgten 30 Amplifikationszyklen (15 Sekunden Denaturierung bei 95 °C, 15 Sekunden Annealing bei 58 °C und 30 Sekunden bei 72 °C) und 5 Minuten finaler Extension bei 72 °C.

Reagenz	Volumen pro Reaktion ( $\mu\text{L}$ )	
	<i>KCNJ5</i>	<i>ATP1A1/ATP2B3/CACNA1D</i>
GoTaq <sup>®</sup> Puffer	5	5
dNTPs	0,5	0,5
Forward Primer	0,75	1
Reverse Primer	0,75	1
H <sub>2</sub> O	16,8	16,3
Taq Polymerase	0,25	0,2
DNA Template (ca. 50 ng/ $\mu\text{L}$ )	1	1
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25</b>	<b>25</b>

**Tabelle 3: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für die DNA-Amplifikation.**

Gen	Exon	Richtung	Sequenz
<i>KCNJ5</i>		fwd	GCTTCATTTGGTGGCTCATT
		rev	GAGATGACTGCGTTGTTGGA
<i>CACNA1D</i>	6	fwd	GTAAAGGAGGCATGGTTAGG
		rev	TGGCTCAGTAAATGTGCTGGT
	8a	fwd	TTGAATTGCCCTGGGTGTAT
		rev	AATGTCTGGCAACCCCTCTT
	8b	fwd	AGCTGCAACTGGGGCTC
		rev	GCAGCTAGGAGACACGCAG
	14/15	fwd	GTCCTGCATGGGTGTTCTGA
		rev	ACGAAGTGCTTTTCGGGGAA
	16	fwd	TAACACTTGGGACGGTCAC
		rev	CCA TGA TCCACAAAGCAGC
	23	fwd	CACGCTAACTGTGCAGGGA
		rev	TCAGCTCTGCCAGAAGAG
	32	fwd	ACGGTTCTTCTCACTGTGC
		rev	CTTCAGCAGAGGCATTTGGCT
<i>ATP1A1</i>	4	fwd	TATATTGCCTTGTAAGTGCTGG
		rev	GAAGTGGGAGACAAAGACGG
	8	fwd	CGTGGCTTCCTTCAGGTTAG
		rev	AGAGTGTAACATTCGTGCAAGC
<i>ATP2B3</i>	8	fwd	TTCTTCCCTCTTCTGTCCC
		rev	TTCTTACCCAGTTTCCGAG
<i>CTNNB1</i>	2	fwd	AAAATCCAGCGTGGACAATGG
		rev	TGTGGCAAGTTCTGCATCATC
	3	fwd	GATTTGATGGAGTTGGACATGG
		rev	TGTTCTTGAGTGAAGGACTGAG
<i>PRKACA</i>	4	fwd	ACTGGGACCCACCTTG
		rev	AGGCATTACGGGGAAATGAGG
	6/7	fwd	GTTTCTGACGGCTGGACTG
		rev	AGTCCACGGCCTTGTTGTTGTAG

**Tabelle 4: Verwendete Primer für die DNA-Amplifikation** Die Annealing-Temperatur lag für sämtliche Primer bei 58 °C.

Die Aufreinigung erfolgte per Gelelektrophorese mit dem Wizard<sup>®</sup> SV PCR and Gel Clean-up System (Promega, Mannheim, Deutschland). Dieses wurde wie in der Herstelleranleitung beschrieben benutzt.

---

Die Sequenzierung erfolgte bei Eurofins / MWG-Biotech. Die Resultate der automatischen bidirektionalen Sanger-Sequenzierung wurden mit der Software Mutation Surveyor (Soft Genetics, State College, PA, USA) analysiert.

Die Exom-Sequenzierung wurde am Institut für Humangenetik des Helmholtz-Zentrum München mit *Next generation sequencing*, einer Sequenzierung mit sehr hohem Durchsatz, durchgeführt.

## 2.7 Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung der Daten und ihre graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm *R*, Version 3.5.2 (69). Es wurden die Erweiterungspakete *readxl*, *ggplot2*, *ggpubr*, *gridExtra*, *xlsx*, *Hmisc*, *psych* und *corrplot* verwendet (70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77).

Die klinischen und tumorspezifischen Messwerte wurden mit dem Shapiro-Wilks-Test auf Normalverteilung untersucht. Normalverteilte Werte wurden als Mittelwert mit Standardabweichung ( $MW \pm SD$ , *SD* für engl. *Standard Deviation*) dargestellt, nicht-normalverteilte als Median mit Interquartilabstand (IQA) unter der Form „Median (IQA)“ präsentiert.

Nominalskalierte Werte wurden untereinander mit dem Exakten Test nach Fisher verglichen.

Zwei Gruppen von intervall- oder verhältnisskalierten Merkmalen wurden bei Normalverteilung mit dem T-Test untersucht, bei Nicht-Normalverteilung mit dem Mann-Whitney-U-Test. Bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen wurde für normalverteilte Werte eine einfache Analyse der Varianzen (ANOVA) durchgeführt, nicht-normalverteilte Werte wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test untersucht. Wenn signifikante Abweichungen der Varianzen oder Rangsummen auffielen, wurden anschließend paarweise Testungen mit dem T-Test oder dem Whitney-U-Test durchgeführt.

Korrelationen von verhältnis- und intervallskalierten Variablen wurden mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman  $\rho_s$  berechnet.

Bei multipler paarweiser Testung wurden die p-Werte mit der Methode nach Benjamini-Hochberg korrigiert.

P-Werte wurden mit maximal 4 signifikanten Nachkommastellen aufgeführt. Werte, die kleiner als 0,0001 waren, wurden als  $p < 0,0001$  dargestellt.

Bei allen statistischen Tests wurde ein p-Wert von 0,05 oder weniger als signifikant angesehen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Beschreibung der Kohorte

#### 3.1.1 Erhobene Daten

Am OP-Material von 135 Patienten konnten sowohl komplette morphometrische als auch immunhistochemische Daten bestimmt werden. Die Genotypen konnten bei 131 dieser Patienten erhoben werden. Bei 126 Patienten konnte ein biochemischer Outcome errechnet werden, während ein klinischer Outcome nur bei 120 Patienten verfügbar war. Bei allen Patienten, für die ein klinischer Outcome bestimmt wurde, wurde auch ein biochemischer errechnet. Insgesamt konnten bei 116 Patienten sowohl die Genetik, als auch die Outcomes bestimmt werden.

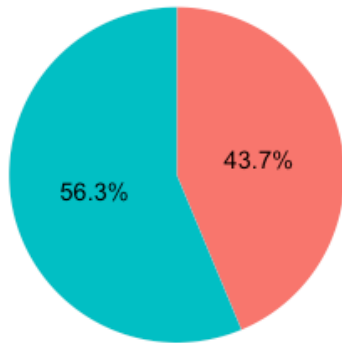
Die klinischen, biochemischen und tumorspezifischen Parameter, die nicht relevant für die Bestimmung der Outcomes waren, konnten teilweise nicht komplett erhoben werden. Die Anzahl der jeweils eruierten Parameter wird in Tab. 7 in Kapitel 3.1.4 beschrieben.

#### 3.1.2 Geschlechts- und Genotypverteilung

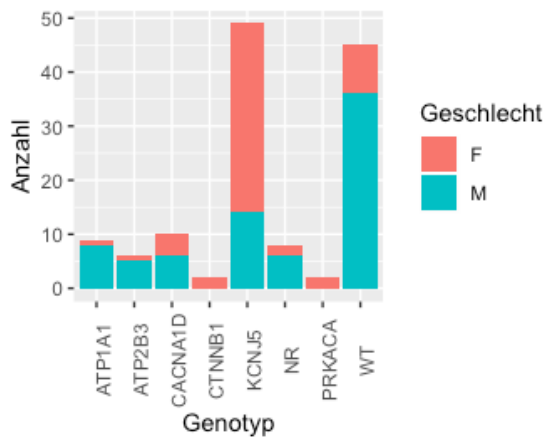
Unter den 135 Patienten dieser Studie waren 59 Frauen (43,7 %) und 76 Männer (56,3 %). Die Geschlechtsverteilung ist in Abb. 9a) zusammengestellt.

Gemäß dem Exakten Test nach Fisher war die Geschlechtsverteilung über die Genotypen nicht unabhängig ( $p < 0,0001$ ). So wiesen Frauen häufiger Mutationen in *KCNJ5* auf. Auch waren jeweils die beiden Patienten mit Mutationen in *PRKACA* und *CTNNB1* weiblichen Geschlechts. Patienten ohne nachweisbare Mutation, mit nicht-rekurrenten Mutationen, sowie mit Mutationen in *ATP1A1*, *ATP2B3* und *CACNA1D* waren häufiger Männer. Dies ist auch in Abb. 9b) dargestellt.

a) Aufteilung nach Geschlechtern



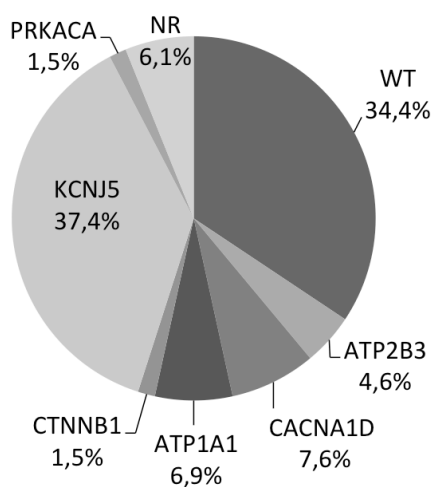
b) Aufteilung nach Genotypen



**Abb. 9 Geschlechtsverteilungen.** a) Aufteilung nach Geschlechtern. Von 135 Patienten waren 59 (43,7 %) weiblich und 76 (56,3 %) männlich. b) Aufteilung der Patienten nach Geschlecht und Genotyp (Legende: F = weiblich, M = männlich)

Bei 4 der 135 Patienten konnte kein Genotyp erhoben werden. Es handelte sich hierbei um drei Frauen und einen Mann.

In etwas weniger als zwei Dritteln der APAs (65,6 %) konnte eine somatische Mutation nachgewiesen werden. Am häufigsten waren mit 49 Exemplaren Mutationen in *KCNJ5* (37,4 %). Zehn APAs wiesen eine somatische Mutation in *CACNA1D* auf (7,6 %), 9 Adenome (6,9 %) in *ATP1A1*, 6 (4,6 %) in *ATP2B3* und jeweils 2 (1,5 %) in *CTNNB1* und *PRKACA*. 9 (6,1 %) Mutationen ohne weitere Häufung wurden im Folgenden als nicht-rekurrente Mutationen (NR) bezeichnet. In 45 Adenomen (34,4 %) konnten keine somatischen Mutationen nachgewiesen werden. Diese wurden im Folgenden als „Wildtyp“ (WT) bezeichnet.

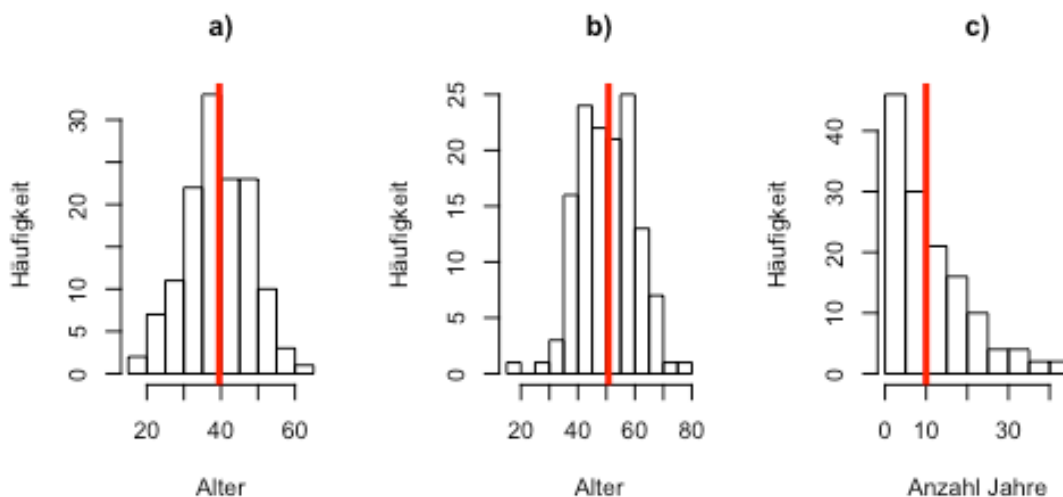


**Abb. 10 Häufigkeiten der Genotypen.** In 34,4% der APAs konnte keine Mutation nachgewiesen werden. Am häufigsten waren Mutationen in *KCNJ5* zu sehen (37,4%), gefolgt von *CACNA1D* (7,6 %), *ATP1A1* (6,9 %) und *ATP2B3* (4,6 %). *PRKACA* und *CTNNB1* wurden je zweimal (1,5%) gefunden. 6,1% konnten nur in jeweils einem APA nachgewiesen werden und sind hier als nicht-rekurrent (NR) aufgeführt.

### 3.1.3 Altersverteilung

Die Werte für das Alter bei Erstdiagnose des aHT und bei Adrenalektomie sowie die Dauer der aHT konnten für alle 135 Patienten erhoben werden.

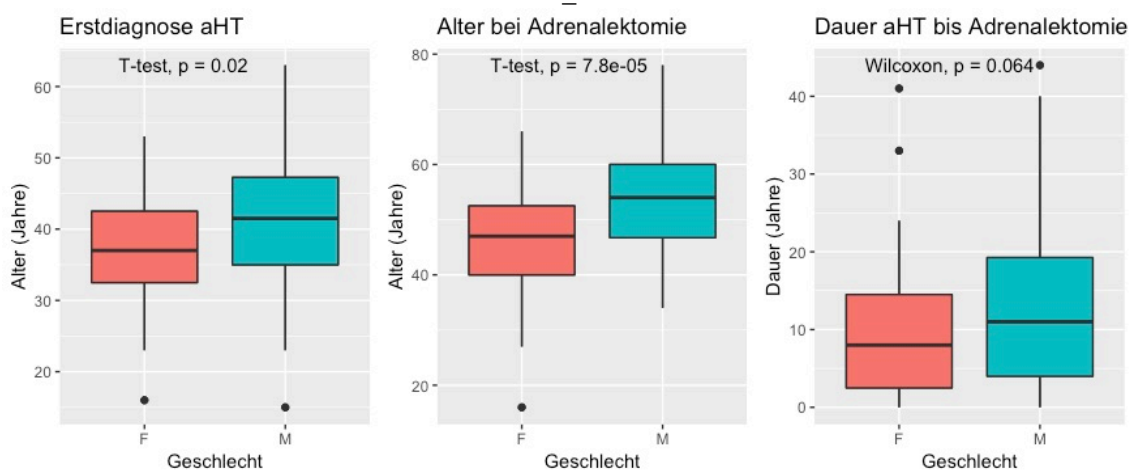
Der Shapiro-Wilk-Test zeigte, dass das Alter bei Erstdiagnose der arteriellen Hypertonie ( $p = 0,952$ ) und das Alter bei Adrenalektomie ( $p = 0,192$ ) normalverteilt waren, die Dauer der aHT jedoch nicht ( $p < 0,0001$ ). Die Verteilungen sind in Abb. 11 dargestellt.



**Abb. 11** Histogramme der Altersverteilungen: a) Alter in Jahren bei Erstdiagnose der aHT. b) Alter in Jahren bei Adrenalektomie. c) Dauer in Jahren der aHT bis zur Adrenalektomie. In roter Farbe sind bei a) und b) dargestellt die Mittelwerte, da diese normalverteilt sind. Bei dem nicht-normalverteilten c) ist der Median rot markiert.

Das Alter bei Erstdiagnose des arteriellen Bluthochdrucks lag zwischen 15 und 63 Jahren mit einem Mittelwert von  $39,6 \pm 8,9$  Jahren. Die Altersverteilung bei der Operation lag zwischen 16 und 78 Jahren mit einem Mittelwert von  $50,7 \pm 10,0$  Jahren. Zwischen der erstmaligen Feststellung eines erhöhten arteriellen Hypertonus und der Adrenalektomie vergingen zwischen 0 und 44 Jahren. Hier lag der Median bei 10 Jahren, mit einem IQA von 13 Jahren (Abb. 11).

Die Altersverteilungen unterschieden sich im Geschlechtsvergleich wie in Abb. 12 und Tab. 5 dargestellt. Frauen waren sowohl bei der Erstdiagnose des arteriellen Hypertonus ( $37,6 \pm 7,7$  Jahre vs.  $41,1 \pm 9,4$  Jahre,  $p = 0,0201$ ) als auch zum Zeitpunkt der Adrenalektomie ( $46,9 \pm 9,7$  Jahre vs.  $53,7 \pm 9,3$  Jahre,  $p < 0,0001$ ) jünger als Männer. Die Geschlechter unterschieden sich hingegen nicht signifikant in der Dauer des Bluthochdrucks bis zur operativen Therapie.



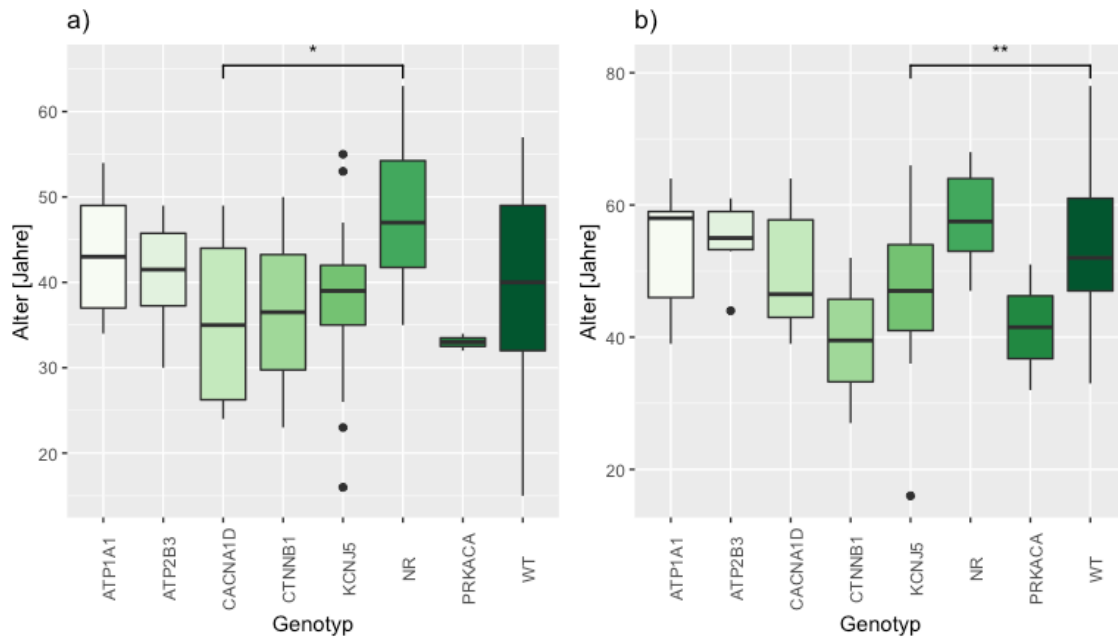
**Abb. 12 Vergleich der Altersverteilungen nach Geschlecht.** Es zeigt sich bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  ein Unterschied nach Geschlechtern in der Altersverteilung. Frauen waren sowohl bei der Erstdiagnose der aHT als auch bei Adrenalectomie signifikant jünger als Männer

	Gesamt [Jahre]	Nach Geschlecht [Jahre]		
		Weiblich (W)	männlich (M)	p-Wert
Alter bei ED aHT	39,6 ± 8,9	37,6 ± 7,7	41,1 ± 9,4	<b>0,0201</b>
Alter bei Adrenalectomie	50,7 ± 10,0	46,9 ± 9,7	53,7 ± 9,3	<b>&lt;0,0001</b>
Dauer aHT	10 (13)	8 (12)	11 (14)	0,0640

**Tabelle 5: Altersverteilung der Patienten im Gesamten und nach Geschlecht.** Die Werte sind für normalverteilte Parameter als MW ± SD angegeben, für nicht-normalverteilte als Median (IQA). Die p-Werte für das Alter bei ED aHT und Alter bei Adrenalectomie wurden mit dem T-Test ermittelt, jene für die Dauer der aHT mit dem Wilcoxon-Test.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den Altersverteilungen im Vergleich zum Genotyp (Tab. 6, Abb. 13). Die Varianzanalysen des Alters bei Erstdiagnose des Bluthochdrucks ( $p = 0,0353$ ) und bei Adrenalectomie ( $p = 0,0043$ ) unterschieden sich nach dem Genotyp. In der anschließenden paarweisen Testung wurde bei Patienten mit einer Mutation im Gen *CACNA1D* signifikant früher ein arterieller Hypertonus festgestellt als bei Patienten mit einer nicht-rekurrenten Mutation ( $p = 0,021$ ). Ebenfalls zeigte sich in der paarweisen Testung, dass Patienten mit einer Mutation in *KCNJ5* bei der Operation signifikant jünger waren als Patienten, bei denen keine Mutation festgestellt wurde ( $p = 0,0022$ ).





**Abb. 13** Vergleich der Altersverteilungen nach Genotyp. **a) Vergleich der Altersverteilungen bei Erstdiagnose des arteriellen Hypertonus nach Genotyp. b) Vergleich der Altersverteilungen bei Adrenalectomie nach Genotyp.** Die Altersverteilungen bei Erstdiagnose des arteriellen Hypertonus ( $p = 0,0353$ ) und bei Adrenalectomie ( $p = 0,0043$ ) unterscheiden sich in den Varianzanalysen. Die Dauer des arteriellen Hypertonus bis Adrenalectomie zeigt keinen signifikanten Unterschied in den Rangsummen der unterschiedlichen Genotypen und ist hier nicht dargestellt.

	Gesamt [Jahre]	Nach Genotyp [Jahre]								p-Wert
		KCNJ5	CACNA1A	ATP1A1	ATP2B3	CTN1B1	PRKACA	NR	WT	
Alter bei ED aHT	39,6 ± 8,9	38,3 ± 6,9	35,2 ± 9,7 *	43,6 ± 7,4	40,8 ± 7,0	36,5 ± 19,1	33,0 ± 1,4	48,3 ± 9,3*	40,4 ± 9,8	<b>0,0353</b>
Alter bei Adrenalectomie	50,7 ± 10,0	47,3 ± 9,2 **	49,7 ± 9,1	53,2 ± 9,2	54,7 ± 6,1	39,5 ± 17,7	41,5 ± 13,4	58,3 ± 7,4	53,6 ± 10,1 **	<b>0,0043</b>
Dauer aHT	10 (13)	7 (9)	14 (6,3)	5 (13)	12,5 (6)	3 (1)	8,5 (8,5)	9,5 (6,5)	10 (17)	0,2703

**Tabelle 6: Altersverteilung der Patienten nach Genotyp** Die Werte sind für normalverteilte Parameter als MW ± SD angegeben, für nicht-normalverteilte als Median (IQA). Die p-Werte für das Alter bei ED aHT und Alter bei Adrenalectomie wurden mit ANOVA ermittelt, jene für die Dauer der aHT mit dem Kruskal-Wallis-Test. \*In paarweisen Vergleichen des Alters bei ED aHT zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Genotypen CACNA1D und NR ( $p = 0,021$ ). \*\* In paarweisen Vergleichen des Alters bei Adrenalectomie zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Genotypen KCNJ5 und WT ( $p = 0,0022$ ).

### 3.1.4 Präoperative klinische und laborchemische Parameter

Alle prä- und postoperativen klinischen und biochemischen Parameter bis auf den präoperativen Cortisolwert im Sammelurin ( $p = 0,1753$ ) erwiesen sich im Shapiro-Wilks-Test als nicht-normalverteilt. Die ermittelten Werte sind in Tab. 7 zusammengefasst.

Parameter	n	Gesamt	Nach Geschlecht		p-Wert
			weiblich	männlich	
<b>Werte mit Relevanz für die Outcome-Bestimmung</b>					
RR <sub>sys</sub> [mmHg]	135	150 (25,8)	148,5 (19,5)	155,6 (27,5)	<b>0,0142</b>
RR <sub>dia</sub> [mmHg]	135	100 (23,3)	102 (24,8)	98,6 (23)	0,7110
aHTM [DDD]	133	4,33 (3,5)	3,17 (3,9)	5 (2,9)	<b>0,0070</b>
K <sub>s</sub> <sup>+</sup> [mmol/L]	134	2,9 (0,7)	2,8 (0,6)	3 (0,7)	0,7753
PAC [ng/L]	134	268,5 (303,6)	271 (292,6)	257 (297)	0,5245
Renin [mU/L]	134	3,05 (4,0)	2,6 (3,6)	3,2 (5,05)	0,2861
ARR [ng/mU]	134	75,1 (101,0)	85,8 (86,8)	58,2 (112,4)	0,2063
<b>Zusätzliche Werte</b>					
Cortisol [µg/dL]	103	12,6 (8,5)	12,4 (7,3)	13,3 (7,9)	0,3175
LNSC [ng/dL]	61	1 (1,5)	1 (1,4)	1 (1,5)	0,9077
UC [µg/24h]	43	239,0 ± 109,5	243,8 ± 106,9	373,6 ± 728,9	0,8099
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	126	27,4 (5,5)	26,1 (5,8)	29,0 (4,7)	<b>0,0002</b>

**Tabelle 7: Präoperative klinische und biochemische Parameter.** Die Werte sind für normalverteilte Parameter als MW ± SD angegeben, für nicht-normalverteilte als Median (IQA). Es zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern beim RR<sub>sys</sub>, bei der aHTM, sowie beim BMI. Die Tabelle ist in zwei geteilt, wobei der obere Anteil jene Werte aufführt, die relevant für die Bestimmung des Outcomes sind, und der untere Anteil Werte aufweist, die zusätzlich eruiert werden konnten. n gibt die Anzahl der jeweils erhobenen Werte an.

Der Geschlechtsvergleich zeigte, dass einige signifikante Unterschiede in der klinischen Präsentation der Patienten bestehen. So wiesen Männer einen höheren systolischen Blutdruck auf als Frauen ( $p = 0,0142$ ) und nahmen zum Zeitpunkt der Diagnose mehr antihypertensive Medikamente ein ( $p = 0,0070$ ). Des weiteren hatten die in dieser Kohorte untersuchten Männer einen signifikant höheren Körpermassenindex (BMI) als Frauen ( $p = 0,0002$ ). Zwar unterschieden sich auch die biochemischen Parameter nach den Geschlechtern, diese blieben jedoch ohne statistische Signifikanz.

Der Vergleich der Rangsummen nach Kruskal-Wallis der klinischen und biochemischen Parameter zwischen den verschiedenen Genotypen zeigte signifikante Unterschiede im präoperativen Serumkaliumwert ( $p = 0,0282$ ), im präoperativen ARQ ( $p = 0,0472$ ) und im präoperativen BMI ( $p = 0,0280$ ). Die paarweise Testung mit dem Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur des p-Wertes durch die Methode nach Benjamini-Hochberg zeigte jedoch bei keinem dieser drei Parameter einen signifikanten Unterschied auf. Trotzdem kann erwähnt werden, dass der mediane K<sub>s</sub><sup>+</sup>-Wert am höchsten bei Patienten mit nicht-rekurrenten Mutationen und mit Mutationen in *CTNNB1* und am niedrigsten bei Patienten mit Mutationen in den ATPasen-Genen war. Der mediane ARQ war klar am höchsten bei Patienten mit Mutationen in *ATP2B3* und am niedrigsten bei Patienten, bei denen eine nicht-rekurrente Mutation gefunden wurde. Patienten mit einer *CTNNB1*-Mutation weisen den niedrigsten medianen BMI auf, jene mit *ATP2B3*-Mutation den höchsten.

### 3.1.5 Postoperative klinische und laborchemische Parameter

Alle postoperativen klinischen und biochemischen Parameter bis auf den postoperativen diastolischen Blutdruck ( $p = 0,0743$ ) und den postoperativen BMI ( $p = 0,2088$ ) waren gemäß dem Shapiro-Wilks-Test nicht normalverteilt.

Postoperativ unterschieden sich die gleichen klinischen und biochemischen Parameter signifikant zwischen den Geschlechtern wie präoperativ (Tab. 8). Frauen hatten nach der Adrenalektomie weiterhin einen niedrigeren  $RR_{sys}$  ( $p = 0,0056$ ), einen niedrigeren BMI ( $p = 0,0019$ ) und einen niedrigeren Bedarf an aHTM ( $p = 0,0181$ ) als Männer.

Parameter	n	Gesamt	Nach Geschlecht		p-Wert
			Weiblich	Männlich	
$RR_{sys}$ [mmHg]	124	131 (21,3)	131,5 (18,5)	140 (18,3)	<b>0,0056</b>
$RR_{dia}$ [mmHg]	124	87,0 ± 11,0	85,5 ± 11,9	88,2 ± 10,2	0,1847
aHTM [DDD]	120	2 (3,3)	1 (2,3)	2 (3,13)	<b>0,0181</b>
$K_s^+$ [mmol/L]	130	4,2 (0,5)	4,2 (0,5)	4,3 (0,5)	0,2016
PAC [ng/L]	126	51,5 (48,0)	59,1 (54)	43 (35,8)	0,0872
Renin [mU/L]	126	16,2 (23,2)	16,2 (30,7)	16,3 (20,9)	0,5233
ARQ [ng/mU]	126	3,8 (6,7)	3,8 (6,6)	3,7 (6,0)	0,6854
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	106	28,0 ± 4,5	26,6 ± 4,8	29,3 ± 3,8	<b>0,0019</b>

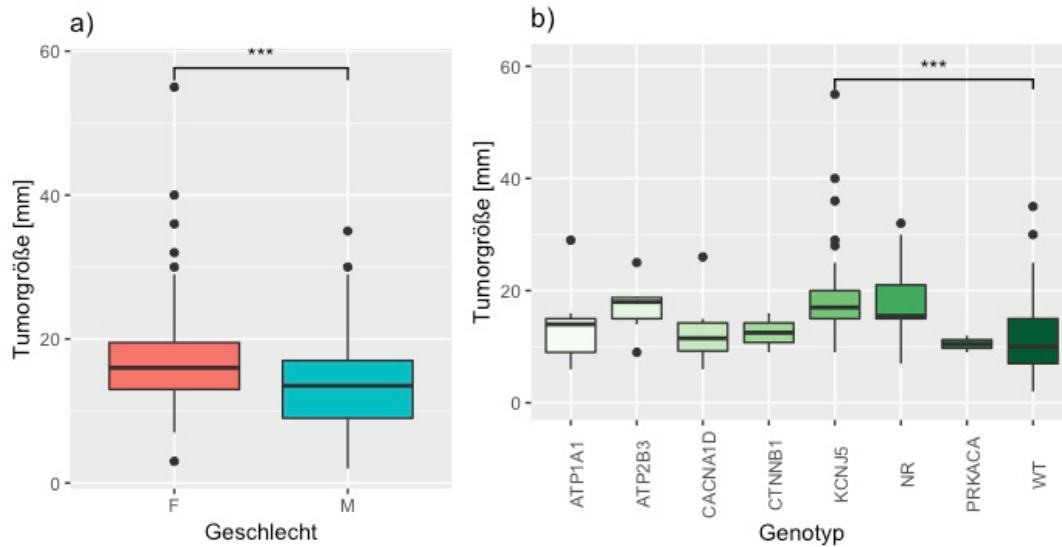
**Tabelle 8: Postoperative klinische und biochemische Parameter.** Die Werte sind für normalverteilte Parameter als MW ± SD angegeben, für nicht-normalverteilte als Median (IQA).

Auch der Vergleich der postoperativen klinischen und biochemischen Parameter zwischen den Genotypen ähnelte dem präoperativen Bild. Der Vergleich der Rangsummen zeigt signifikante Abweichungen bei  $RR_{sys}$  ( $p = 0,0384$ ) und beim BMI ( $p = 0,0058$ ). Der paarweise Vergleich der einzelnen Genotypen mit Korrektur der p-Werte nach Benjamini-Hochberg wies keine Auffälligkeiten bei  $RR_{sys}$  auf, wohl jedoch beim BMI. So hatten Patienten mit Mutation in *ATP2B3* einen signifikant höheren BMI als Patienten mit *KCNJ5*-Mutation ( $p = 0,019$ ).

### 3.1.6 Tumorgröße und Lateralisationsindex

Die Tumorgröße konnte bei allen 135 Patienten aus dem Bericht des Pathologischen Institutes erhoben werden. Sie war laut Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt und hatte einen Median von 15 mm mit einem IQA von 8 mm. Der größte erfasste Tumor hatte einen Durchmesser von 55 mm, der kleinste maß 2 mm. Die Tumorgröße unterschied sich signifikant nach Geschlechtern ( $p = 0,0006$ ). Frauen hatten mit 16 (6,5) mm im Median größere Tumore als Männer mit einer medianen Tumorgröße von 13,5 (8) mm. Im Vergleich nach Genotypen der

Tumorgrößen zeigte sich eine stark signifikante Abweichung der Rangsummen ( $p < 0,0001$ ). Der paarweise Vergleich zeigte, dass APAs mit Mutation in *KCNJ5* signifikant größer waren als Wildtyp-Tumore ( $p = 0,0003$ ).



**Abb. 14** Vergleich der Tumorgröße mit dem Geschlecht und dem Genotyp a) Vergleich der Tumorgröße mit dem Geschlecht. Bei Frauen wurden signifikant ( $p = 0,0006$ ) größere APAs festgestellt als bei Männern. b) Vergleich der Tumorgröße mit dem Genotyp. Im paarweisen Vergleich sind APAs mit *KCNJ5*-Mutation signifikant ( $p = 0,0003$ ) größer als Wildtyp-APAs.

Parameter	n	Gesamt	Nach Geschlecht		p-Wert
			weiblich	männlich	
Tumorgröße [mm]	135	15 (8)	16 (6,5)	13,5 (8)	<b>0,0006</b>
iLI	121	12,3 (28,9)	12,9 (30,8)	11,4 (22,8)	0,6385

**Tabelle 9: Tumor-spezifische Parameter im Geschlechtsvergleich.** Die Werte sind für normalverteilte Parameter als MW  $\pm$  SD angegeben, für nicht-normalverteilte als Median (IQA). Da iLI ein Index ist, ist dieser Wert ohne Einheit.

	Gesamt	Nach Genotyp [Jahre]								p-Wert
		<i>KCNJ5</i>	<i>CACNA1D</i>	<i>ATP1A1</i>	<i>ATP2B3</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>PRKACA</i>	<i>NR</i>	<i>WT</i>	
Tumorgröße [mm]	15 (8)	17 (5) *	11,5 (5)	14 (6)	18 (3,8)	16 (8,5)	10,5 (1,5)	15,5 (6)	*10 (8)	<b>&lt;0,0001</b>
iLI	12,3 (28,9)	16,2 (34,0)	5,0 (26,0)	12,0 (9,0)	9,9 (68,3)	10,5 (12,6)	15,7 (8,5)	12,4 (11,3)	11,7 (21,3)	0,6705

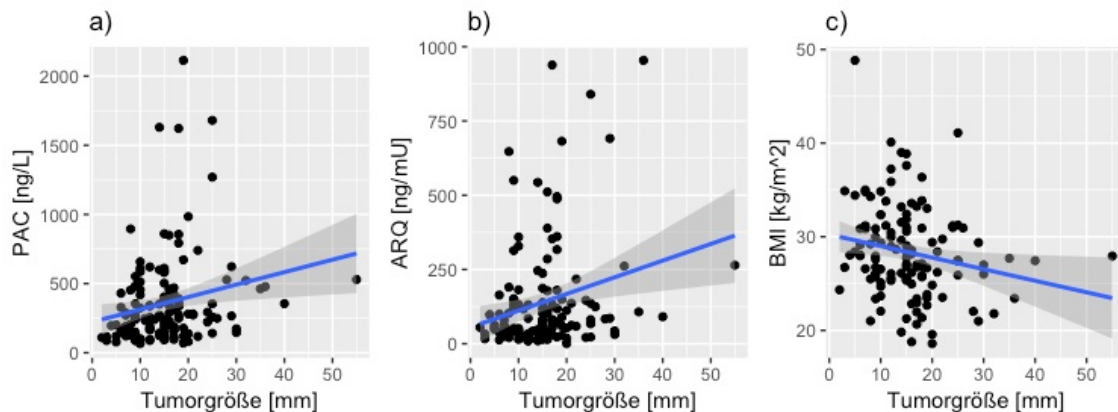
**Tabelle 10: Tumor-spezifische Parameter im Vergleich mit den Genotypen.** Die Werte sind für normalverteilte Parameter als MW  $\pm$  SD angegeben, für nicht-normalverteilte als Median (IQA). \* Im paarweisen Vergleich unterscheiden sich APAs mit Mutation in *KCNJ5* und WT-APAs signifikant in der Größe ( $p = 0,0003$ ).

Die ipsilateralen Lateralisationsindices unterschieden sich nicht nach Geschlechtern oder Genotypen.

Die Untersuchung, ob die Tumorgröße mit den präoperativen klinischen und biochemischen Parametern zusammenhängt, zeigte Korrelationen der Tumorgröße mit der PAC ( $p = 0,0122$ ), mit dem ARQ ( $p = 0,0056$ ) und mit dem BMI ( $p = 0,0247$ ). Die nach Spearman errechneten Korrelationskoeffizienten und die dazugehörigen p-Werte sind in Tab. 11 aufgeführt. Patienten mit einem größeren Tumordurchmesser wiesen höhere PAC und ARQ sowie einen niedrigeren BMI auf.

Parameter	Spearman's Rho ( $\rho_s$ )	p-Wert
RR <sub>sys</sub>	-0,0873	0,3137
RR <sub>dia</sub>	0,0154	0,8592
aHTM	-0,0702	0,4218
K <sub>s</sub> <sup>+</sup>	-0,1601	0,0647
PAC	0,2133	<b>0,0133</b>
Renin	0,0485	0,578
ARQ	0,2378	<b>0,0056</b>
Cortisol	-0,0597	0,5492
LNSC	0,2075	0,1085
UC	0,1717	0,2709
BMI	-0,2001	<b>0,0247</b>

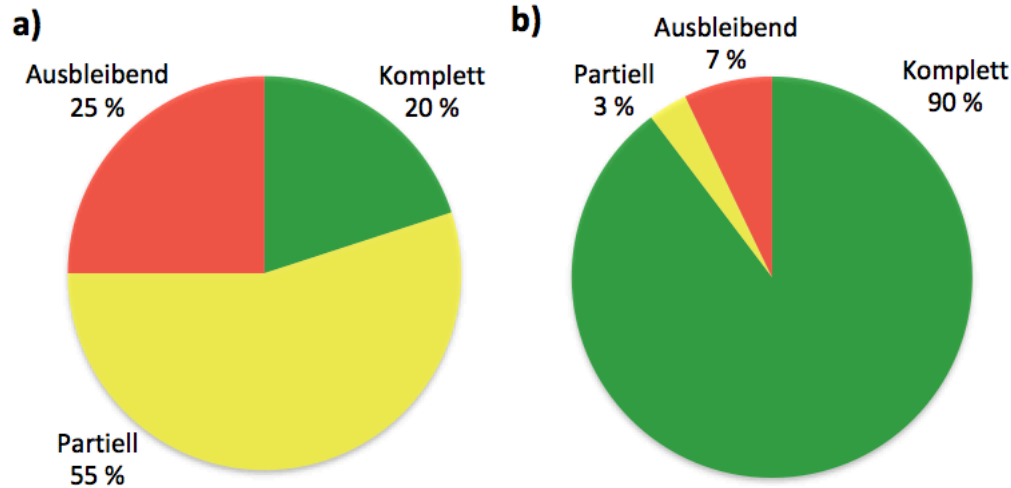
**Tabelle 11: Korrelation der Tumorgröße mit den präoperativen klinischen und biochemischen Parametern.**



**Abb. 15 Korrelationen der Tumorgröße. a) Korrelation der Tumorgröße mit der PAC.** Die Tumorgröße korrelierte positiv mit der PAC ( $\rho_s=0,2133$ ;  $p=0,0133$ ). **b) Korrelation der Tumorgröße mit dem ARQ.** Auch hier bestand eine positive Korrelation ( $\rho_s=0,2378$ ;  $p=0,0056$ ). **c) Korrelation der Tumorgröße mit dem BMI.** Diese beiden Parameter korrelierten negativ ( $\rho_s=-0,2001$ ;  $p=0,0247$ ).

### 3.1.7 Klinisches und biochemisches Outcome nach Adrenalektomie

Der klinische Therapieerfolg konnte bei 120 Patienten ermittelt werden, der biochemische bei 126 Patienten. Bei 119 Patienten konnten beide Outcomes bestimmt werden. Die Verteilung ist in Abb. 16 dargestellt.



**Abb. 16** Verteilung des Therapieerfolgs. a) Verteilung des klinischen Therapieerfolgs (n = 120). b) Verteilung des biochemischen Therapieerfolgs (n = 126). Darstellung der Anteile der jeweiligen Outcome-Kategorien.

Bei 30 von 120 Patienten (25%) blieb der klinische Therapieerfolg aus. Bei 66 Patienten (55%) war die Adrenaektomie partiell klinisch erfolgreich, bei 24 (20%) komplett.

Hundertdreizehn von 126 (89,7%) Patienten waren postoperativ biochemisch geheilt. Vier Patienten (3,2%) wiesen einen partiellen biochemischen Therapieerfolg auf und bei 9 (7,1%) blieb dieser aus.

Der klinische und der biochemische Therapieerfolg unterschieden sich im exakten Test nach Fisher nicht nach Geschlechtern, wie in Tab. 12 dargestellt. Trotzdem fiel auf, dass mehr Frauen als Männer einen kompletten Therapieerfolg hatten, obwohl die Kohorte mehr Männer als Frauen umfasste. Auch der Vergleich des klinischen ( $p = 0,0861$ ) und biochemischen ( $p = 0,8696$ ) Outcomes nach Genotypen wies keinen signifikanten Unterschied auf.

Therapieerfolg	Geschlecht		Exakter Test nach Fisher
	weiblich	männlich	
<b>Klinisch (n)</b>	55	65	p=0,186
Komplett	14	10	
Partiiell	31	35	
Ausbleibend	10	20	
<b>Biochemisch (n)</b>	56	74	p=0,3838
Komplett	48	65	
Partiiell	3	1	
Ausbleibend	5	4	

**Tabelle 12: Geschlechtsvergleich des klinischen und biochemischen Therapieerfolgs.** Es zeigten sich keine signifikanten Geschlechtsunterschiede im Therapieerfolg nach Fishers exaktem Test.

In der Analyse des Zusammenhangs des biochemischen Outcomes mit den präoperativen klinischen, biochemischen und tumor-spezifischen Parametern zeigte sich, wie in Tab. 13 dargestellt, einzig ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Kategorien bei den Rangsummen des präoperativen diastolischen Blutdrucks ( $p = 0,0219$ ). Der paarweise Vergleich war hier jedoch unauffällig.

Parameter	Biochemisches Outcome (p-Wert)	Klinisches Outcome (p-Wert)
Alter bei ED aHT	0,367	0,543
Alter bei Adrenalektomie	0,557	<b>**&lt;0,0001</b>
Dauer aHT	0,4726	0,436
RR <sub>sys</sub>	0,7024	0,4357
RR <sub>dia</sub>	<b>*0,0219</b>	0,2455
aHTM	0,9937	0,1025
K <sub>s</sub> <sup>+</sup>	0,2258	0,9447
PAC	0,5095	0,4854
Renin	0,6581	0,4608
ARR	0,5089	0,5003
Cortisol	0,3014	0,4343
LNSC	0,25	0,1983
UC	0,633	0,256
BMI	0,7415	0,3924
Tumorgroße	0,6199	<b>***0,0463</b>
iLI	0,5366	0,4841

**Tabelle 13: Vergleich des biochemischen und klinischen Outcomes mit präoperativen klinischen, biochemischen und tumor-spezifischen Parametern.** Die Vergleiche des Outcomes mit dem Alter bei Erstdiagnose aHT und bei Adrenalektomie sowie mit UC wurden wegen der Normalverteilung dieser Parameter mit dem ANOVA-Test durchgeführt, alle anderen mit dem Kruskal-Wallis-Test.

\*RR<sub>dia</sub> und das biochemische Outcome wiesen in den paarweisen Vergleichen keine Signifikanz auf.

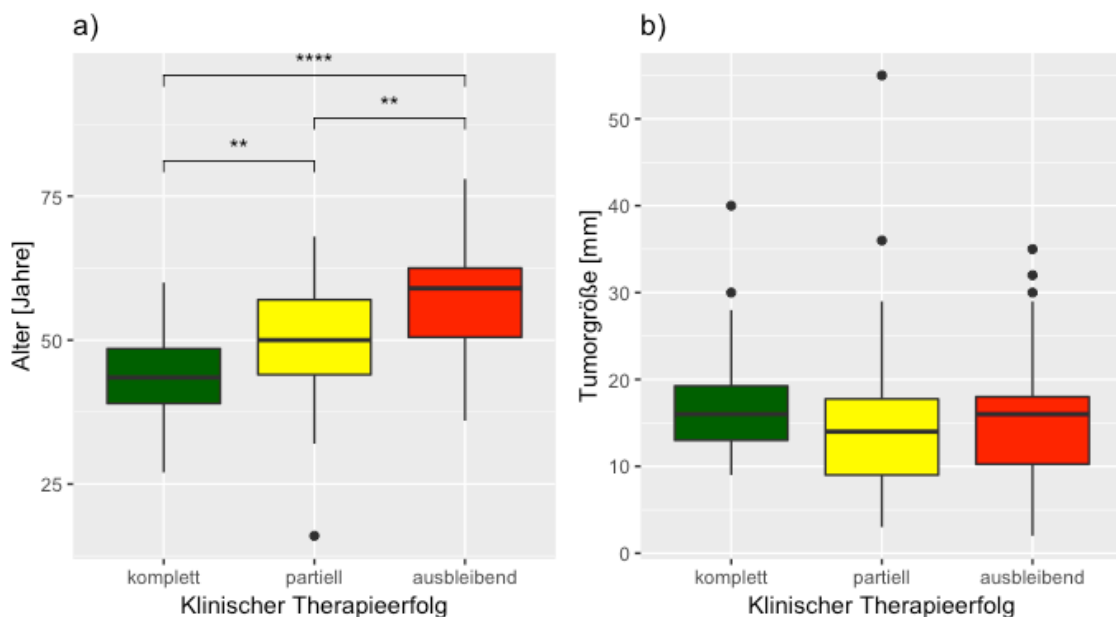
\*\*In den paarweisen Vergleichen wiesen alle Kombinationen ein Signifikanzniveau  $p < 0,05$  auf. „komplett“ vs. „partiell“ ( $p = 0,0061$ ); „partiell“ vs. „ausbleibend“ ( $p = 0,0047$ ); „komplett“ vs. „ausbleibend“ ( $p < 0,0001$ ).

\*\*\*Die Tumorgroße und das klinische Outcome wiesen im paarweisen Vergleich mit p-Wert-Korrektur nach Benjamini-Hochberg keine signifikanten Unterschiede auf.

Beim Vergleich des klinischen Therapieerfolgs mit den präoperativen klinischen, biochemischen und tumor-spezifischen Parametern wiesen die Rangsummen der Tumorgroße signifikante Differenzen ( $p = 0,043$ ) zwischen den Gruppen auf. Im paarweisen Vergleich erwiesen sich die Größenunterschiede der APAs zwischen den Outcome-Kategorien jedoch nicht als signifikant. Die Tumoren von Patienten, die später eine komplette klinische Remission hatten, waren mit einem medianen Durchmesser von 16 (6,3) mm zwar größer als die 14 (8,8) mm großen APAs von Patienten mit partieller Remission des PA, dieser Unterschied erreichte jedoch kein statistisch relevantes Signifikanzniveau. APAs von Patienten mit

ausbleibendem klinischen Therapieerfolg maßen im Median 16 (7,8) mm. Dies wird auch in Abb. 17b) dargestellt.

Bei der Varianzanalyse des Alters bei Adrenalektomie in den verschiedenen Outcome-Kategorien zeigten sich stark ausgeprägte Differenzen mit hohem Signifikanzniveau ( $p < 0,0001$ ). Patienten, die später einen kompletten Therapieerfolg hatten, waren im Mittel zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs mit  $44,3 \pm 7,7$  Jahren signifikant jünger als Patienten mit partieller Remission ( $p = 0,0047$ ). Diese waren bei der Adrenalektomie im Durchschnitt  $49,9 \pm 9,5$  Jahre alt. Patienten, bei denen die Remission postoperativ ausblieb, waren mit  $56,4 \pm 9,1$  Jahren am ältesten zum Zeitpunkt des Eingriffs. Diese Vergleiche sind auch in Abbildung 17a) graphisch dargestellt mit Aufführung der jeweiligen Signifikanzniveaus.



**Abb. 17** Vergleiche des klinischen Therapieerfolgs mit Alter und Tumorgröße. **a) Vergleich des Alters bei Adrenalektomie mit dem klinischen Therapieerfolg.** Patienten mit klinischem Therapieerfolg waren bei der Operation signifikant jünger als Patienten mit partiellem Erfolg ( $p = 0,0047$ ) und als jene mit weiterbestehender klinischer Symptomatik ( $p < 0,0001$ ). Auch jene Patienten mit partiellem klinischen Therapieerfolg waren jünger als die mit ausbleibendem Erfolg. **b) Vergleich der Tumorgröße mit dem klinischen Therapieerfolg** Zwar unterschieden sich die Rangsummen der Tumorgößen der unterschiedlichen Kategorien des Therapieerfolgs ( $p = 0,0463$ ), der paarweise Vergleich wies jedoch keine signifikanten Differenzen auf.

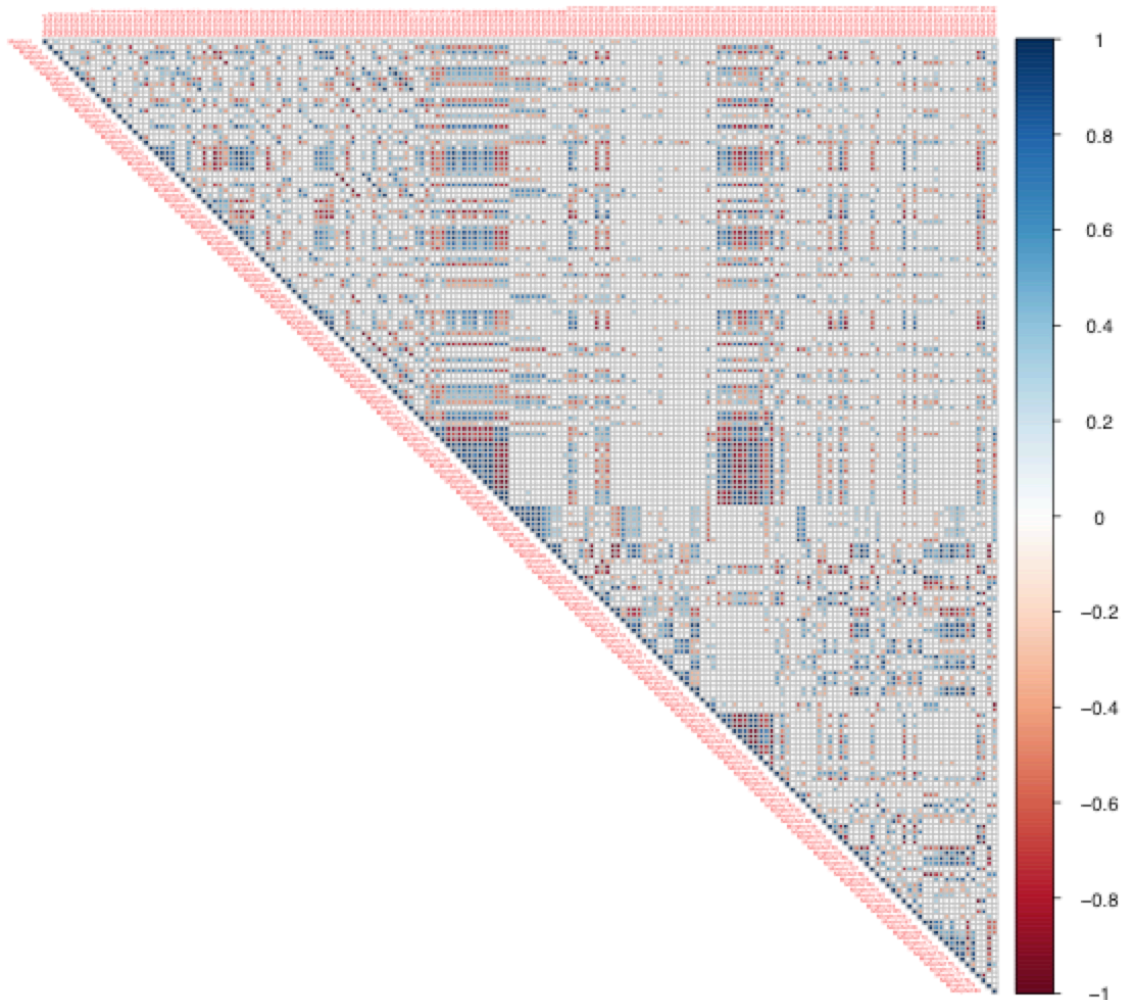
## 3.2 Morphometrische Analyse

### 3.2.1 Erhobene Parameter und interne Korrelationen

Der Vergleich der 180 erhobenen morphometrischen Parameter untereinander ergab 16110 Korrelationspaare. Von diesen korrelierten 8465 auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ ,



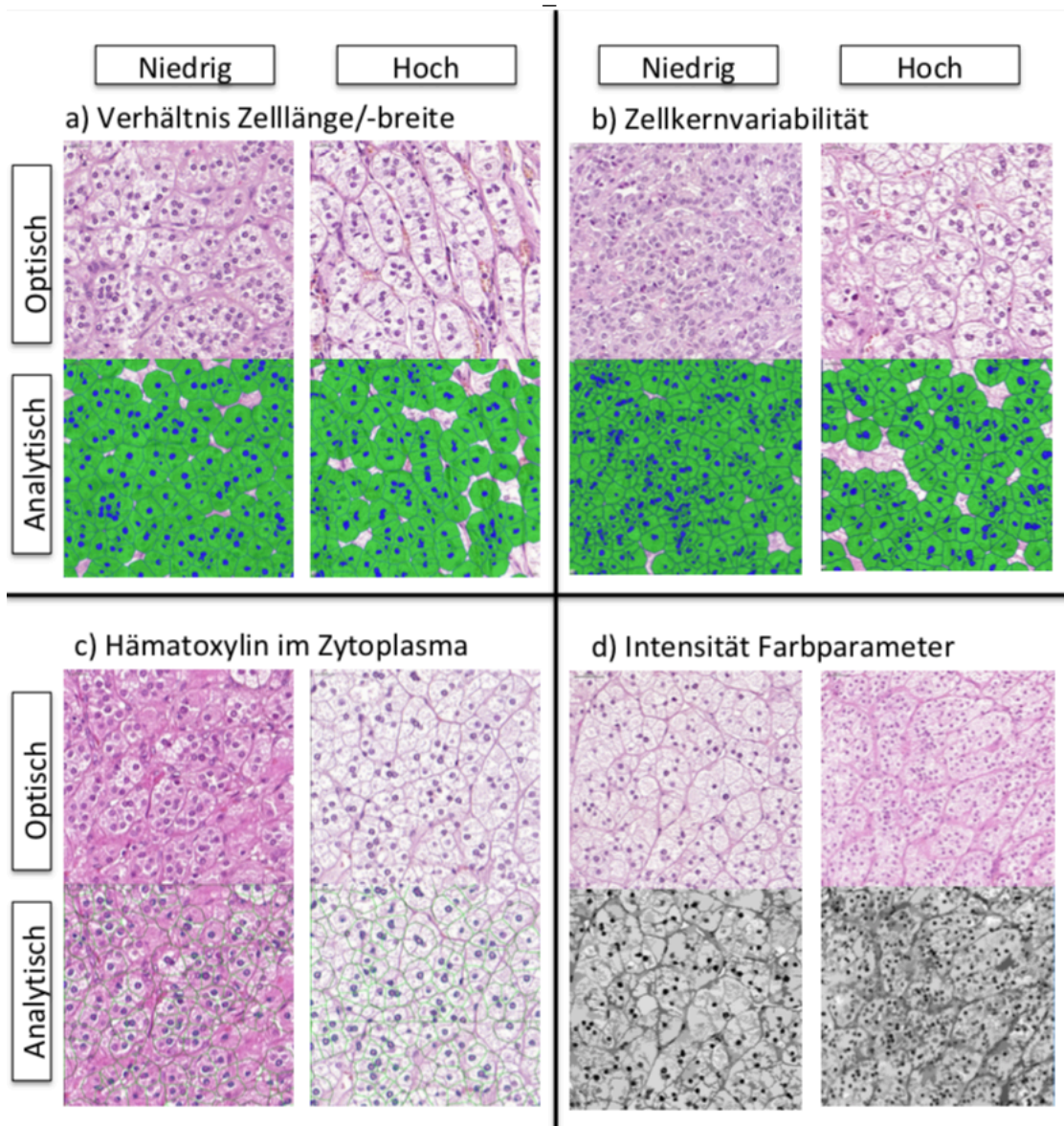
5875 waren hoch signifikant mit einem P-Wert  $< 0,001$ . Der Korrelationsplot ist in Abb. 18 dargestellt.



**Abb. 18** Korrelationsplot der internen Korrelationen der morphometrischen Parameter untereinander. Positive Korrelationen nach Spearman sind in blauer Farbe dargestellt, negative rot. Die Intensität beschreibt, wie in der seitlich abgebildeten Skala dargestellt, die Ausprägung des Korrelationskoeffizienten. Nur Korrelationen mit  $p < 0,001$  sind hier aufgeführt.

Diese internen Korrelationen bildeten die Grundlage für die im Folgenden getroffenen Entscheidungen, welche morphometrischen Parameter weitergehend exploriert wurden.

Einige dieser genauer untersuchten Parameter werden in Abb. 19 mit Darstellung repräsentativer Areale ihrer hohen und niedrigen Ausdrucksform vorgestellt.



**Abb. 19** Beispielbilder der Morphometrie. a) Vergleich von zwei APAs mit hohem und niedrigem Verhältnis der Zelllänge zur Zellbreite. b) Vergleich von zwei Tumoren mit niedriger und hoher Zellkernvariabilität. c) Vergleich von zwei Tumoren mit niedriger und hoher Intensität der zytoplasmatischen Hämatoxylinfärbung. d) Vergleich von zwei APAs mit hoher und niedriger Ausprägung des Farbparameters „Layer 2“. Dieser beschreibt den Anteil der grünen Farbe in einer RGB-Palette.

### 3.2.2 Geschlechtsunterschiede in der Morphometrie

Keiner der 180 untersuchten morphometrischen Parameter wies im Mann-Whitney-U-Test nach Korrektur der p-Werte mit der Methode nach Benjamini-Hochberg einen signifikanten Geschlechtsunterschied auf.

---

### 3.2.3 Unterschiede in der Morphometrie nach Genotyp

Siebenundsechzig der untersuchten morphometrischen Messwerte wiesen einen signifikanten Unterschied in ihren Rangsummen nach den Genotypen auf. Die Untersuchung wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test mit p-Wert Korrektur nach Benjamini-Hochberg durchgeführt.

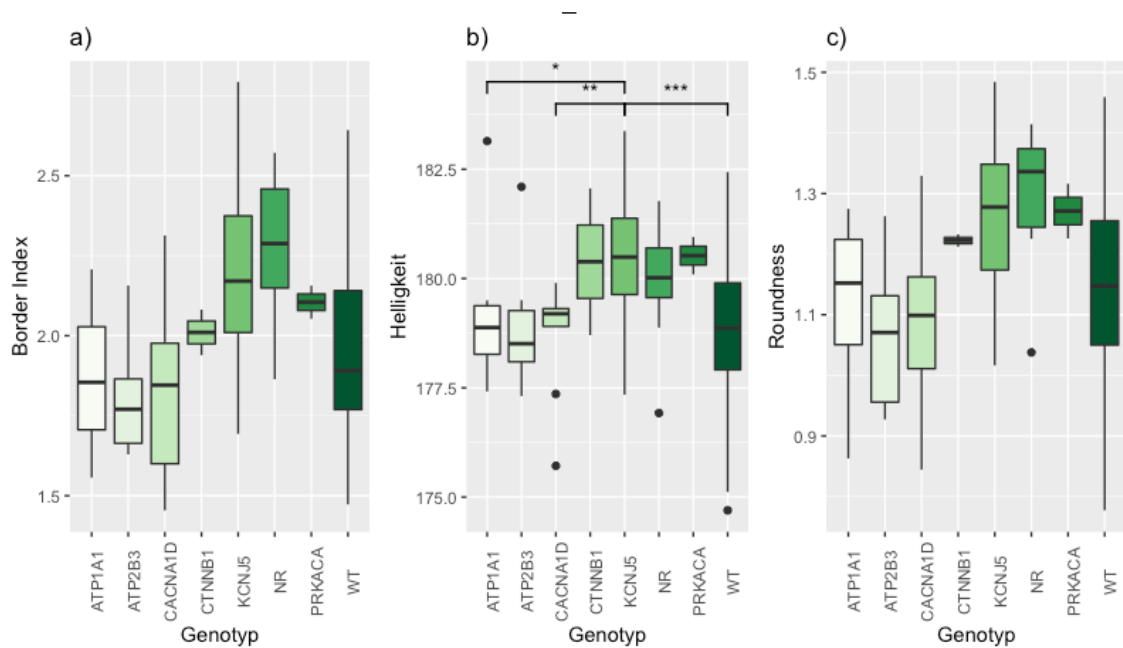
Um einen möglichst korrekten Überblick über die tatsächliche Phänotyp-Genotyp-Korrelation zu erhalten, wurden 7 Parameter, die unterschiedliche Aspekte der Morphologie beschreiben und eine möglichst hohe Signifikanz aufweisen, genauer untersucht. Dazu gehören 2 Formparameter und 1 Farbparameter, die sich auf die detektierten Zellen beziehen. Ein Parameter beschreibt die zytoplasmatische Farbe und einer bezieht sich auf die Textur der Zellkerne.

Die morphometrischen Parameter der Zellform sind der „Border Index“ und die „Roundness“. Der erstgenannte beschreibt, wie zerklüftet die Form der Zellen ist. Je zerklüfteter, desto höher ist der Wert. Der zweitgenannte beschreibt, wie rund eine identifizierte Zelle ist: Hierzu wird der Radius des größtmöglichen Kreises innerhalb der Zellgrenzen vom Radius des kleinstmöglichen Kreises, der die ganze Zelle umkreist, subtrahiert. Je kleiner also der Wert ist, desto runder ist die Form. Der Farbparameter auf dem Niveau der ganzen Zelle beschreibt die Helligkeit. Ein höherer Wert entspricht hier einem helleren Aspekt. Der zytoplasmatische Farbparameter misst die Intensität der Hämatoxylinfärbung und der nukleäre Texturparameter gibt die Standardabweichung der Zellkerngröße an. Diese wird gleichgesetzt mit der Variabilität der Größe des Zellkerns.

Aus Abb. 20a) ist ersichtlich, dass die APAs sich in ihrem „Border Index“ nach den Genotypen unterschieden ( $p = 0,0002$ ). Zellen von APAs mit Mutation in *KCNJ5* waren zerklüfteter als solche von Tumoren mit *ATP1A1*- ( $p = 0,0046$ ), *AT2B3*- ( $p = 0,0055$ ), *CACNA1D*- ( $p = 0,0051$ ) und Wildtyp-APAs ( $p = 0,0002$ ). Tumore mit nicht-rekurrenten Mutationen waren zerklüfteter als *ATP1A1*- ( $p = 0,0138$ ), *ATP2B3*- ( $p = 0,0163$ ), *CACNA1D*- ( $p = 0,0163$ ) und Wildtyp-Adenome ( $p = 0,0156$ ).

In Abb. 20b) zeigte sich, dass die Tumore sich auch nach der Helligkeit ihres Gewebes unterschieden ( $p = 0,0018$ ). Das Gewebe von *KCNJ5*-Tumoren war signifikant heller als jenes von *ATP1A1*- ( $p = 0,0395$ ), *CACNA1D* ( $p = 0,0053$ ) und Wildtyp-APAs ( $p < 0,0001$ ).

Wie in Abb. 20c) dargestellt, war auch die „Rundheit“ der Zellen zwischen den verschiedenen Genotypen unterschiedlich ( $p = 0,0005$ ). APAs mit *KCNJ5*-Mutation waren signifikant weniger rund als *ATP1A1*- ( $p = 0,0091$ ), *AT2B3*- ( $p = 0,0074$ ), *CACNA1D*- ( $p = 0,0036$ ) und Wildtyp-APAs ( $p = 0,0015$ ). *ATP1A1*- ( $p = 0,0443$ ), *ATP2B3*- ( $p = 0,0443$ ), *CACNA1D*- ( $p = 0,0246$ ) und Wildtyp-Adenome ( $p = 0,0352$ ) waren signifikant runder als Tumore mit nicht-rekurrenten Mutationen.



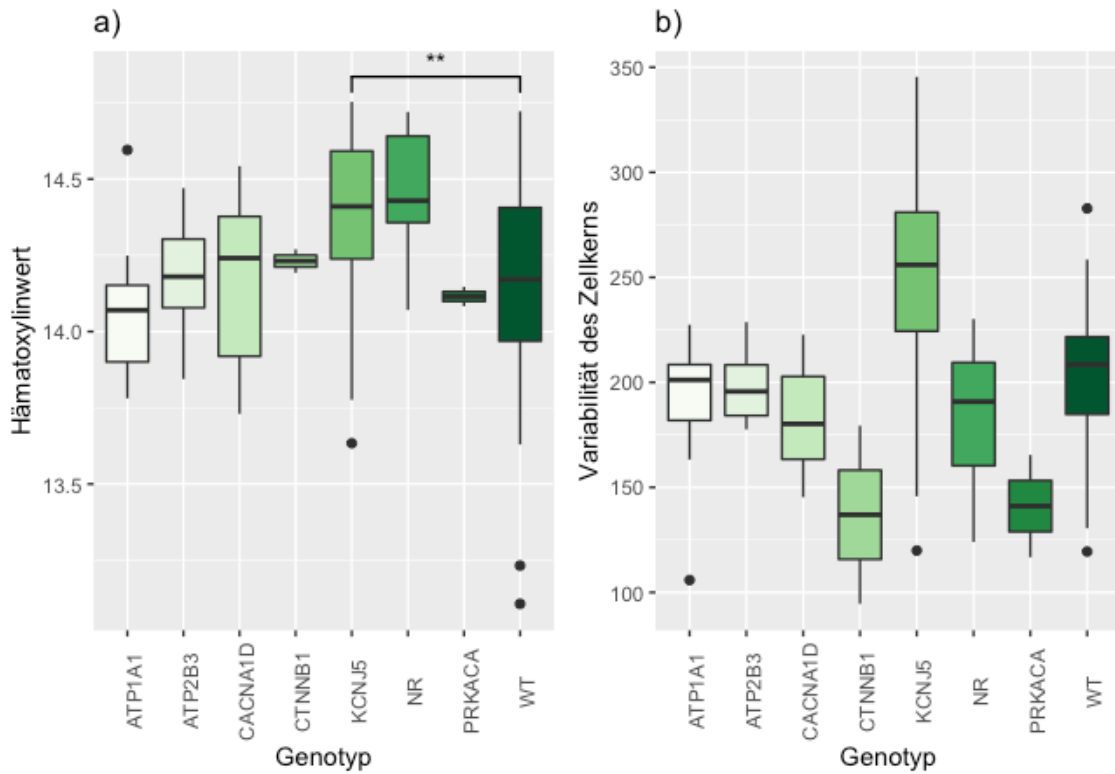
**Abb. 20** Vergleiche von morphometrischen Parametern nach Genotyp. **a) Vergleich des „Border Index“ mit den Genotypen ( $p = 0,0002$ )** Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die paarweisen Vergleiche nicht in der Abbildung, sondern in Tabelle 14 dargestellt. **b) Vergleich der Helligkeit des Gewebes nach Genotypen ( $p = 0,0018$ )** Im paarweisen Vergleich unterschieden sich APAs mit Mutation in *KCNJ5* signifikant von Tumoren mit Mutation in *ATP1A1* ( $p = 0,0395$ ), in *CACNA1D* ( $p = 0,0053$ ) und von Wildtyp-APAs ( $p < 0,0001$ ). **c) Vergleich der Rundheit der Zellen nach Genotypen ( $p = 0,0005$ )** Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die paarweisen Vergleiche nicht in der Abbildung, sondern in Tab. 14 dargestellt.

Zu Abb.	KCNJ5 vs.				NR vs.			
	<i>ATP1A1</i>	<i>ATP2B3</i>	<i>CACNA1D</i>	WT	<i>ATP1A1</i>	<i>ATP2B3</i>	<i>CACNA1D</i>	WT
<b>20a)</b>	0,0046	0,0055	0,0051	0,0002	0,0138	0,0163	0,0163	0,0156
<b>20c)</b>	0,0091	0,0074	0,0036	0,0015	0,0443	0,0443	0,0246	0,0352

**Tabelle 14: Signifikante p-Werte der paarweisen Vergleiche zu Abb. 20.**

Aus den in Abb. 21a) zusammengefassten Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die zytoplasmatische Hämatoxylinfärbung von Tumoren mit *KCNJ5*-Mutation signifikant intensiver war als die von Wildtyp-Adenomen ( $p = 0,0086$ ).

Die Variabilität der detektierten Zellkerne unterschied sich ebenfalls nach Genotypen ( $p < 0,0001$ ). Dies ist in Abb. 21b) dargestellt. In den paarweisen Vergleichen zeigte sich, dass insbesondere *KCNJ5*-mutierte Adenome eine größere Variabilität der Zellkerne aufwies als die meisten anderen Genotypen. So waren die Zellkerne von *ATP1A1*- ( $p = 0,0012$ ), *ATP2B3*- ( $p = 0,0125$ ), *CACNA1D*- ( $p = 0,0002$ ), *PRKACA*- ( $p = 0,0439$ ), nicht-rekurrent-mutierten ( $p = 0,0012$ ) und Wildtyp-APAs ( $p < 0,0001$ ) signifikant weniger variabel als die Nuklei von Adenomen mit Mutation in *KCNJ5*.



**Abb. 21** Weitere Vergleiche der Morphometrie nach Genotyp. a) Vergleich des Hämatoxylinwertes mit den Genotypen ( $p = 0,0002$ ) b) Vergleich der Variabilität der Zellkerngröße nach Genotypen ( $p = 0,0018$ ) Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die paarweisen Vergleiche nicht in der Abbildung, sondern in Tab. 15 dargestellt.

	<i>KCNJ5 vs.</i>						
	<i>ATP1A1</i>	<i>ATP2B3</i>	<i>CACNA1D</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>NR</i>	<i>PRKACA</i>	<i>WT</i>
Abb. 21b)	<b>0,0012</b>	<b>0,0125</b>	<b>0,0002</b>	0,0565	<b>0,0012</b>	<b>0,0439</b>	<b>&lt;0,0001</b>

**Tabelle 15:** P-Werte der paarweisen Vergleiche von *KCNJ5*-APAs zu Abb. 21.

### 3.2.4 Korrelationen der Morphometrie mit klinischen, biochemischen und Tumor-spezifischen Parametern

Der Vergleich der Korrelationen der 29 biochemischen, klinischen und Tumor-spezifischen Parameter mit den 180 morphometrischen Messwerten ergab insgesamt 5220 Paare. Von diesen wiesen 164 einen signifikanten Zusammenhang auf. Die Korrelationen sind in Abb. 22 dargestellt. Eine Auswahl dieser signifikanten Korrelationen wird im Weiteren genauer beschrieben.





**Abb. 22** Plot der Korrelationen der biochemischen, klinischen und tumor-spezifischen Messwerte mit den morphometrischen Parametern. Positive Korrelationen nach Spearman sind in blauer Farbe dargestellt, negative rot. Die Intensität beschreibt, wie in der seitlich abgebildeten Skala dargestellt, die Ausprägung des Korrelationskoeffizienten. Nur Korrelationen mit einem p-Wert < 0,05 sind hier dargestellt. Der Plot ist auf der x-Achse zweigeteilt: Jeweils 90 morphometrische Parameter sind in der oberen und unteren Bildhälfte dargestellt. Auf der Y-Achse sind in jeder Bildhälfte die 29 biochemischen, klinischen und Tumor-spezifischen Parameter abgebildet.

Das Alter bei Adrenalektomie korrelierte signifikant mit 4 morphometrischen Parametern, die Dauer des aHT bis zur operativen Versorgung mit 6. Zwei Farbparameter und ein Formparameter, der das Verhältnis der Länge zur Breite beschreibt, korrelierten mit den beiden Zeitangaben.

Jeweils eine Korrelation mit der Morphometrie wiesen der präoperative systolische Blutdruck, die präoperative PAC und der präoperative ARQ auf. Die präoperative antihypertensive Medikation, der postoperative Serumkaliumwert und der postoperative systolische Blutdruck korrelierten mit jeweils zwei morphometrischen Messwerten, der postoperative diastolische Blutdruck mit 5 und der präoperative BMI mit 6.

Auffallend waren die Korrelationen der präoperativen Cortisolmessungen mit der Morphometrie durch ihre relativ hohen Korrelationskoeffizienten, dargestellt in Abb. 22 durch die intensivere Farbe. Der präoperative Cortisolwert im Sammelurin korrelierte mit 13 morphometrischen Messungen, das mitternächtliche Speichelcortisol mit 7.

Der postoperative BMI korrelierte mit 22 bildanalytischen Messungen, die postoperative antihypertensive Medikation mit 27. Weiterhin konnten 29 signifikante Korrelationen des

ipsilateralen Lateralisationsindex und 33 der Tumorgröße mit der Morphometrie festgestellt werden.

Eine möglichst repräsentative Auswahl dieser Korrelationen wird im Folgenden tiefergehend beschrieben.

#### 3.2.4.1 Altersverteilung

Die Helligkeit, dargestellt durch den Parameter „Brightness“ ( $\rho_s = -0,2567$ ;  $p = 0,008$ ) und die Intensität der Hämatoxylinfärbung der Zellen ( $\rho_s = -0,2595$ ;  $p = 0,0072$ ) korrelierten negativ mit dem Alter bei Adrenalektomie. Je älter die Patienten also beim operativen Eingriff waren, desto dunkler waren die Zellen und desto stärker die Intensität des Hämatoxylins.

Die Intensität der Hämatoxylinfärbung korrelierte auch negativ mit der Dauer des arteriellen Hypertonus bis zur OP ( $\rho_s = -0,2179$ ;  $p = 0,0293$ ). Dies ist auch in Abb. 23a) graphisch aufbereitet. Ebenso korrelierte ein Formparameter, der das Verhältnis des Randes einer Zelle zu ihrer berechneten Fläche ausdrückt, negativ mit der Bluthochdruckdauer ( $\rho_s = -0,2696$ ;  $p = 0,0049$ ).

Diese Auswahl an Korrelationen wird in Tab. 16 aufgezählt.

Morphometrischer Parameter		Anderer Messwert	$\rho_s$	p-Wert
Morpho16	Farbparameter "Brightness"	Alter bei Adrenalektomie	-0,2567	0,008
Morpho51	Farbparameter "Hämatoxylin"	Alter bei Adrenalektomie	-0,2595	0,0072
Morpho14	Formparameter "Rand/Fläche"	Dauer aHT	-0,2179	0,0293
Morpho51	Farbparameter "Hämatoxylin"	Dauer aHT	-0,2696	0,0049

**Tabelle 16: Auswahl signifikanter Korrelationen zwischen der Morphometrie und der Altersverteilung.**

#### 3.2.4.2 Klinische Parameter

Auch mit den klinischen Messwerten korrelierte eine Vielzahl an morphometrischen Parametern. Eine Auswahl wird in Tab. 17 präsentiert. Da nur vereinzelte Korrelationen zwischen den präoperativen klinischen Messwerten und der Morphometrie bestanden, werden diese im Folgenden nicht weiter beschrieben.

Bei Patienten, die hellere APAs aufwiesen, hatten postoperativ einen niedrigeren diastolischen Blutdruck, ausgedrückt durch die negative Korrelation ( $\rho_s = -0,2326$ ;  $p = 0,0251$ ) der beiden Parameter. Die postoperative Dosis der antihypertensiven Medikation wies ebenso einige negative Korrelationen mit morphometrischen Parametern auf, darunter mit dem auch in Abb. 23e) dargestellten bildanalytischen Farbparameter „Layer 2 Class 4“ ( $\rho_s = -0,2877$ ;  $p = 0,0248$ ), einem Formparameter, der das Verhältnis der Zellränder zur Zellfläche beschreibt ( $\rho_s = -$

0,2757;  $p = 0,0332$ ) und einem, der das Verhältnis der Länge zur Weite der detektierten Zellen beschreibt ( $\rho_s = -0,2727$ ;  $p = 0,0355$ ).

Weiterhin korrelierte der postoperative BMI mit dem gleichen Farbparameter „Layer 2 Class 4“ wie die postoperative Medikation ( $\rho_s = -0,2692$ ;  $p = 0,015$ ), sowie mit einem Texturparameter, der mit Hilfe der Standardabweichung der gefundenen Zellkernfläche die Variabilität der Zellkerne ausdrückt ( $\rho_s = -0,2683$ ;  $p = 0,0153$ ). Diese Korrelation der Textur mit dem BMI wird auch in Abbildung 23d) präsentiert. Der Formparameter „Roundness“ hing ebenfalls negativ mit dem postoperativen BMI zusammen ( $\rho_s = -0,2559$ ;  $p = 0,0221$ ). Ein weiterer Formparameter, „Rectangular Fit“, der beschreibt wie gut die Zellen in eine rechteckige Form passen, korrelierte positiv mit dem BMI nach Adrenaektomie ( $\rho_s = -0,2683$ ;  $p = 0,0153$ ).

Morphometrischer Parameter		Anderer Messwert	$\rho_s$	p-Wert
Morpho19	Farbparameter "Brightness"	Postoperativer RR <sub>dia</sub>	-0,2326	0,0251
Morpho14	Formparameter "Rand/Fläche"	Postoperative aHTM	-0,2757	0,0332
Morpho39	Farbparameter "Layer2"	Postoperative aHTM	-0,2877	0,0248
Morpho49	Formparameter "Länge/Breite"	Postoperative aHTM	-0,2727	0,0355
Morpho39	Farbparameter "Layer2"	Postoperativer BMI	-0,2692	0,015
Morpho59	Formparameter "Rectangular Fit"	Postoperativer BMI	0,2518	0,0248
Morpho64	Formparameter "Roundness"	Postoperativer BMI	-0,2559	0,0221
Morpho144	Texturparameter "Zellkernvariabilität"	Postoperativer BMI	-0,2683	0,0153

**Tabelle 17: Auswahl signifikanter Korrelationen zwischen der Morphometrie und den klinischen Messwerten.**

### 3.2.4.3 Biochemische Parameter

Bei den Korrelationen zwischen den biochemischen Messwerten mit den morphometrischen Merkmalen waren besonders jene mit den präoperativen Cortisolwerten auffällig. Einige von diesen sind in Tab. 18 aufgeführt.

Morphometrischer Parameter		Anderer Messwert	$\rho_s$	p-Wert
Morpho50	Formparameter "Länge/Weite"	Präoperatives LNSC	0,4707	0,0005
Morpho65	Formparameter "Roundness"	Präoperatives LNSC	0,3625	0,012
Morpho18	Farbparameter "Brightness"	Präoperatives UC	0,5604	0,0004
Morpho65	Formparameter "Roundness"	Präoperatives UC	0,4159	0,0157
Morpho107	Farbparameter "Optische Dichte"	Präoperatives UC	0,4272	0,0124

**Tabelle 18: Auswahl signifikanter Korrelationen zwischen der Morphometrie und den biochemischen Messwerten.**



Der Formparameter „Länge/Breite“ korrelierte positiv mit dem spätabendlichen Cortisol im Speichel ( $\rho_s = 0,4707$ ;  $p = 0,0005$ ). Dies ist in Abb. 23c) abgebildet. Die Farbparameter „Brightness“ ( $\rho_s = 0,5604$ ;  $p = 0,0004$ ) und „Optische Dichte“ (des Zellkerns) ( $\rho_s = 0,4272$ ;  $p = 0,0124$ ) wiesen positive Zusammenhänge mit dem Cortisol im 24-Stunden-Sammelurin auf. Die Korrelation der „Brightness“ mit dem UC wird auch in Abb. 23b) dargestellt.

Zusätzlich war der Formparameter „Roundness“ sowohl mit dem LNSC ( $\rho_s = 0,3625$ ;  $p = 0,012$ ) als auch mit dem UC ( $\rho_s = 0,4159$ ;  $p = 0,0157$ ) korreliert.

#### 3.2.4.4 Tumor-spezifische Messwerte

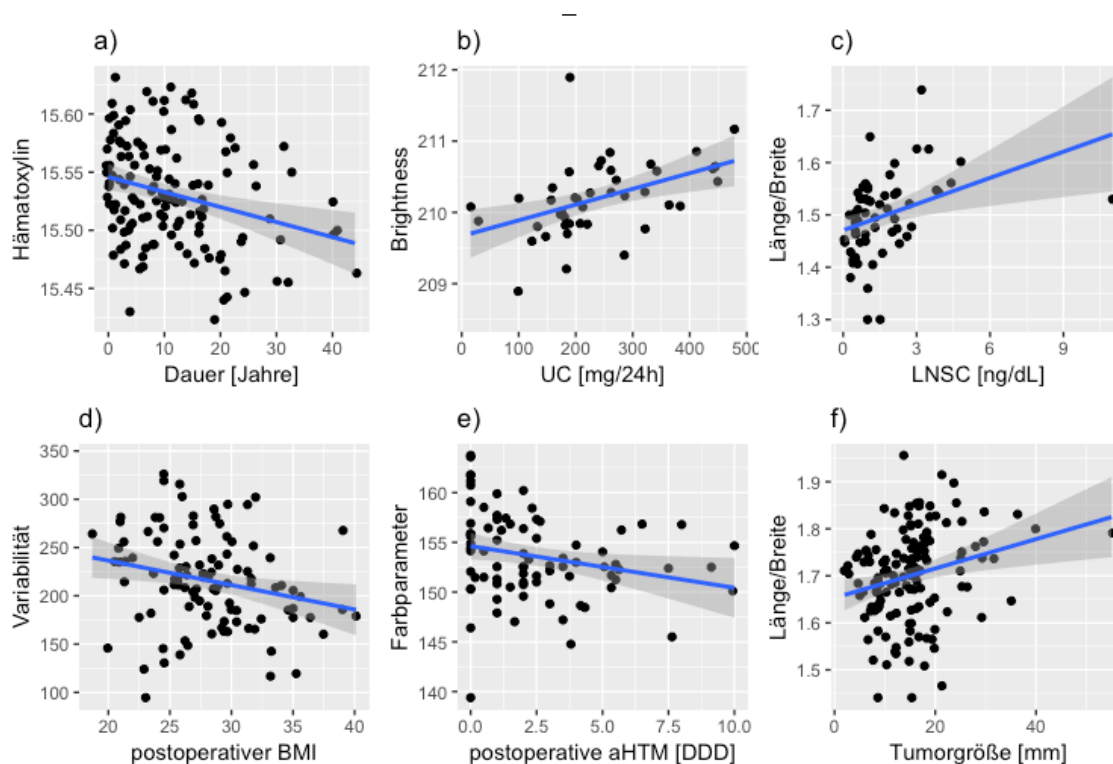
Eine Auswahl der Korrelationen der Morphometrie mit den Tumor-spezifischen Messwerten ist in Tab. 19 dargestellt.

Die Helligkeit der Tumore ( $\rho_s = 0,2758$ ;  $p = 0,0039$ ) und der Farbparameter „Layer 2“ ( $\rho_s = 0,2439$ ;  $p = 0,0127$ ) korrelierten positiv mit der Größe. Ebenso hingen das Verhältnis der Länge der Zellen zu ihrer Breite ( $\rho_s = 0,2766$ ;  $p = 0,0038$ ) und der „Shape Index“ ( $\rho_s = 0,2671$ ;  $p = 0,0054$ ), ein Parameter, der beschreibt wie glatt der Rand eines Objektes, also hier der entdeckten Zellen ist, mit der Tumorgöße zusammen. Der Zusammenhang des Verhältnisses Länge/Breite zur Tumorgöße ist auch in Abb. 23f) dargestellt. Zudem korrelierte auch die Zellkernvariabilität mit der Tumorgöße ( $\rho_s = 0,2546$ ;  $p = 0,0073$ ).

Es korrelierten weiterhin mehrere Parameter, insbesondere solche, die den Zellkern beschreiben, mit dem ipsilateralen Lateralisationsindex. Darunter sind die Zellkernvariabilität ( $\rho_s = 0,2546$ ;  $p = 0,0139$ ), die nukleäre „Roundness“, also die Beschreibung, wie rund die detektierten Nuklei sind ( $\rho_s = 0,2739$ ;  $p = 0,0072$ ) und der nukleäre Shape Index ( $\rho_s = 0,3197$ ;  $p = 0,0006$ ).

Morphometrischer Parameter		Anderer Messwert	$\rho_s$	p-Wert
Morpho19	Farbparameter "Brightness"	Tumorgöße	0,2758	0,0039
Morpho39	Farbparameter "Layer2"	Tumorgöße	0,2439	0,0127
Morpho49	Formparameter "Länge/Breite"	Tumorgöße	0,2766	0,0038
Morpho66	Formparameter "Shape Index"	Tumorgöße	0,2671	0,0054
Morpho144	Texturparameter "Zellkernvariabilität"	Tumorgöße	0,2546	0,0073
Morpho96	Formparameter "nukleäre Roundness"	iLI	0,2739	0,0072
Morpho98	Formparameter "nukleärer Shape Index"	iLI	0,3197	0,0006
Morpho144	Texturparameter "Zellkernvariabilität"	iLI	0,2546	0,0139

**Tabelle 19: Auswahl signifikanter Korrelationen zwischen der Morphometrie und den Tumor-spezifischen Messwerten**



**Abb. 23** Korrelationen der Morphometrie zu klinischen, biochemischen und Tumorspezifischen Parametern. a) Korrelation der Dauer des aHT bis zur Adrenalectomie zur Intensität der Hämatoxylinfärbung ( $\rho_s = -0,2696$  ;  $p = 0,0049$ ) b) Vergleich des Sammelurincortisols mit dem Parameter „Brightness“ ( $\rho_s = 0,5604$  ;  $p = 0,0004$ ) c) Zusammenhang zwischen dem spätabendlichen Speichelcortisol und dem Verhältnis der Länge zur Breite der detektierten Zellen ( $\rho_s = 0,4707$  ;  $p = 0,0005$ ) d) Korrelation zwischen dem postoperativen BMI und der nukleären Variabilität ( $\rho_s = -0,2683$  ;  $p = 0,0153$ ). e) Zusammenhang der postoperativen aHTM mit einem berechneten Farbparameter ( $\rho_s = -0,2877$  ;  $p = 0,0248$ ). f) Korrelation der Tumorgroße mit dem Längen-Breiten-Verhältnis der entdeckten Zellen ( $\rho_s = 0,2766$  ;  $p = 0,0038$ ). Es sind die Korrelationskoeffizienten nach Spearman und die p-Werte nach Benjamini-Hochberg-Korrektur dargestellt.

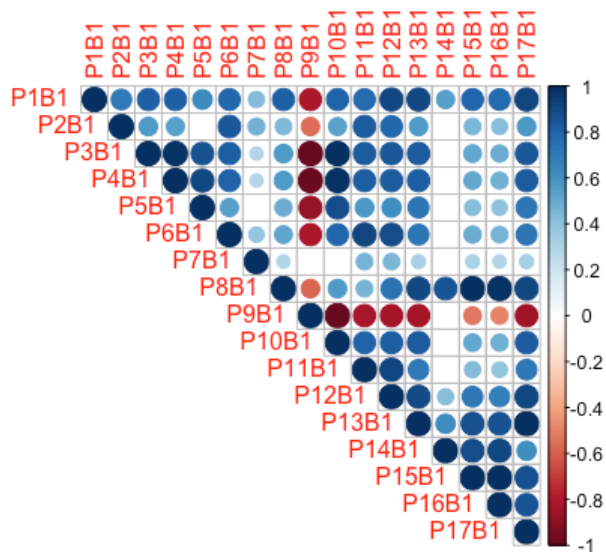
### 3.2.5 Korrelationen der Morphometrie mit dem Therapieerfolg

Weder beim klinischen noch beim biochemischen Therapieerfolg wiesen die Outcome-Gruppen signifikante Unterschiede in ihren Rangsummen der Werte der Morphometrie auf.

### 3.3 Immunhistochemische Analyse der CYP11B1-Expression

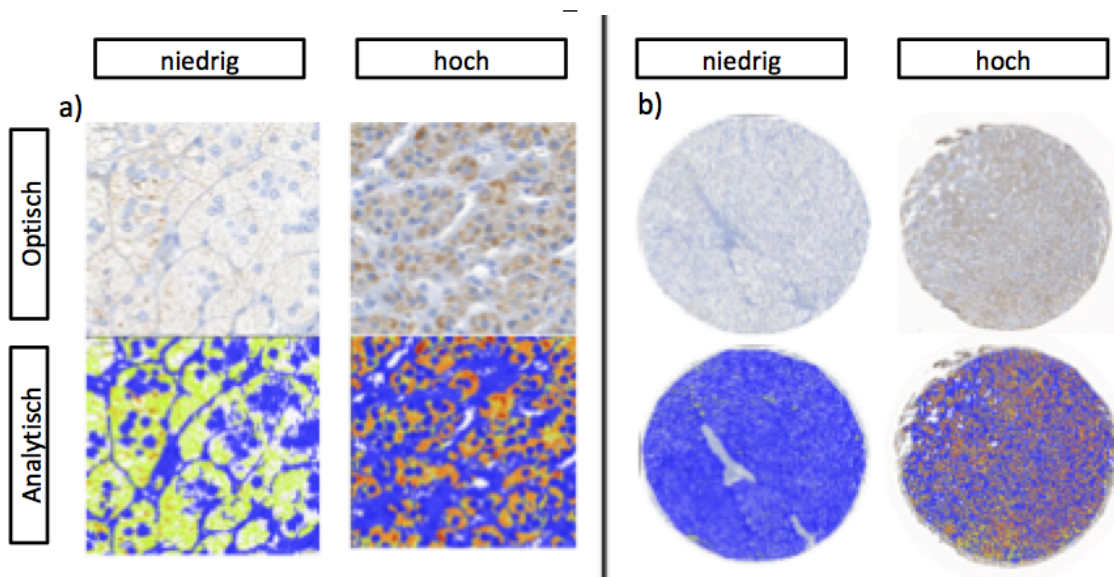
#### 3.3.1 Erhobene Parameter und interne Korrelationen

Der in Abb. 24 dargestellte Korrelationsplot zeigt, dass die IHC-Parameter der *CYP11B1*-Expression stark untereinander korrelieren. P4B1 (Durchschnittliche Intensität der Markerfärbung) wies starke Korrelationen mit sämtlichen anderen Parametern bis auf P14B1 (Ratio der Färbung zur gesamten als ROI definierten Tumorfläche) auf. Weiterhin ist ersichtlich, dass P14B1 die wenigsten Korrelationen mit anderen Parametern hat.



**Abb. 24** Korrelationsplot der immunhistochemischen Parameter der *CYP11B1*-Expression untereinander. Positive Korrelationen nach Spearman sind in blauer Farbe dargestellt, negative rot. Die Intensität beschreibt, wie in der seitlich abgebildeten Skala dargestellt, die Ausprägung des Korrelationskoeffizienten. Das Signifikanzniveau wird durch die Größe des jeweiligen Kreises dargestellt: Je größer, desto höher ist das Signifikanzniveau. Nur Korrelationen mit  $p < 0,001$  sind hier aufgeführt.

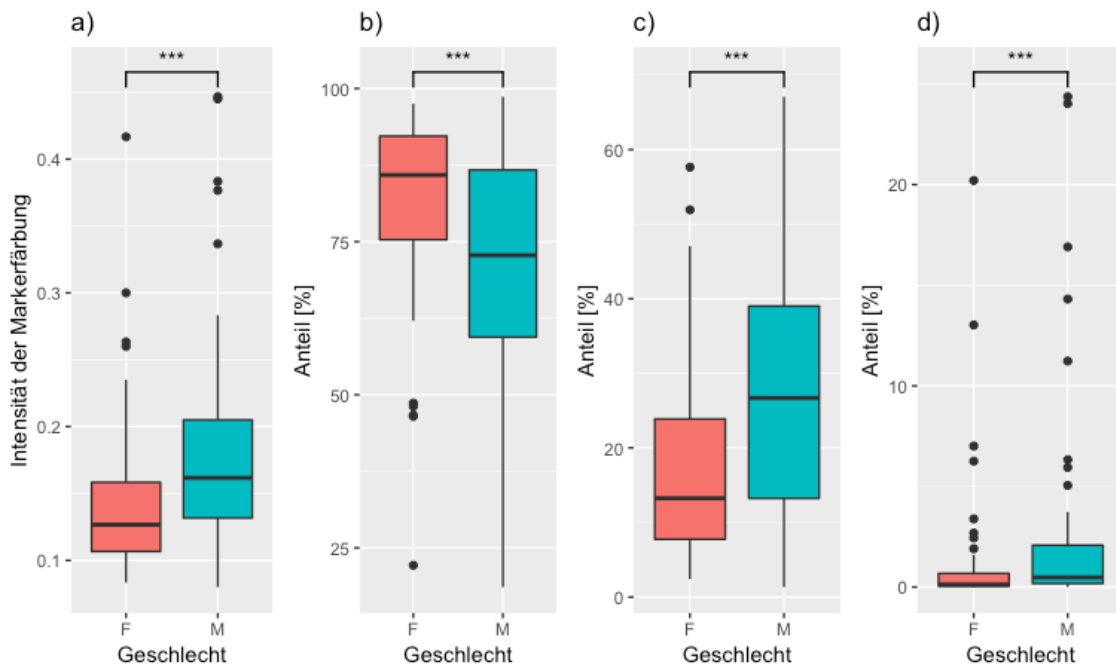
Zwar wird bei allen Analysen stets angegeben wie viele der untersuchten Parameter korrelierten, aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden jedoch nur die durchschnittliche Intensität der Färbung und die Ratio der Färbung zur gesamten Tumorfläche im Weiteren detaillierter dargestellt. Diese bildliche Darstellung dieser beiden Parameter ist auch in Abb. 25 beispielhaft gezeigt. Teilweise wurden zusätzlich weitere Parameter in dieser Arbeit analysiert, wenn sich dies aus Gründen einer klareren Darstellung anbot.



**Abb. 25** Beispielbilder der *CYP11B1*-Färbung a) Vergleich von Tumoren mit niedriger und hoher *CYP11B1*-Färbeintensität. b) Vergleich von APAs mit niedriger und hoher Ratio der *CYP11B1*-gefärbten zur gesamten ROI-Fläche.

### 3.3.2 Geschlechtsunterschiede in der *CYP11B1*-Expression

Der Vergleich der ermittelten immunhistochemischen Parameter, welche die *CYP11B1*-Expression der APAs beschreiben, mit dem Geschlecht der zugehörigen Patienten zeigte, dass 11 der 17 ermittelten Parameter sich nach dem Geschlecht unterschieden. Darunter befanden sich die durchschnittliche Intensität der Immunfärbung, sowie die Anteile der Intensitätsabstufungen „niedrig“, „mittel“ und „hoch“ an der gesamten Färbefläche. Wie in Abb. 26a) zu sehen ist, hatten Präparate von männlichen Patienten insgesamt eine höhere durchschnittliche Intensität der Immunfärbung als solche von Frauen ( $p = 0,0025$ ). Auch waren bei Männern die Anteile an den Färbeintensitätsklassen „mittel“ und „hoch“ signifikant größer als bei Frauen. Die APAs von Frauen hingegen wiesen einen höheren Anteil der Klasse „niedrig“ auf als Tumore männlichen Ursprungs. Die Ratio der Färbung zur Tumorphäche korrelierte nicht signifikant mit dem Geschlecht ( $p = 0,4339$ ).



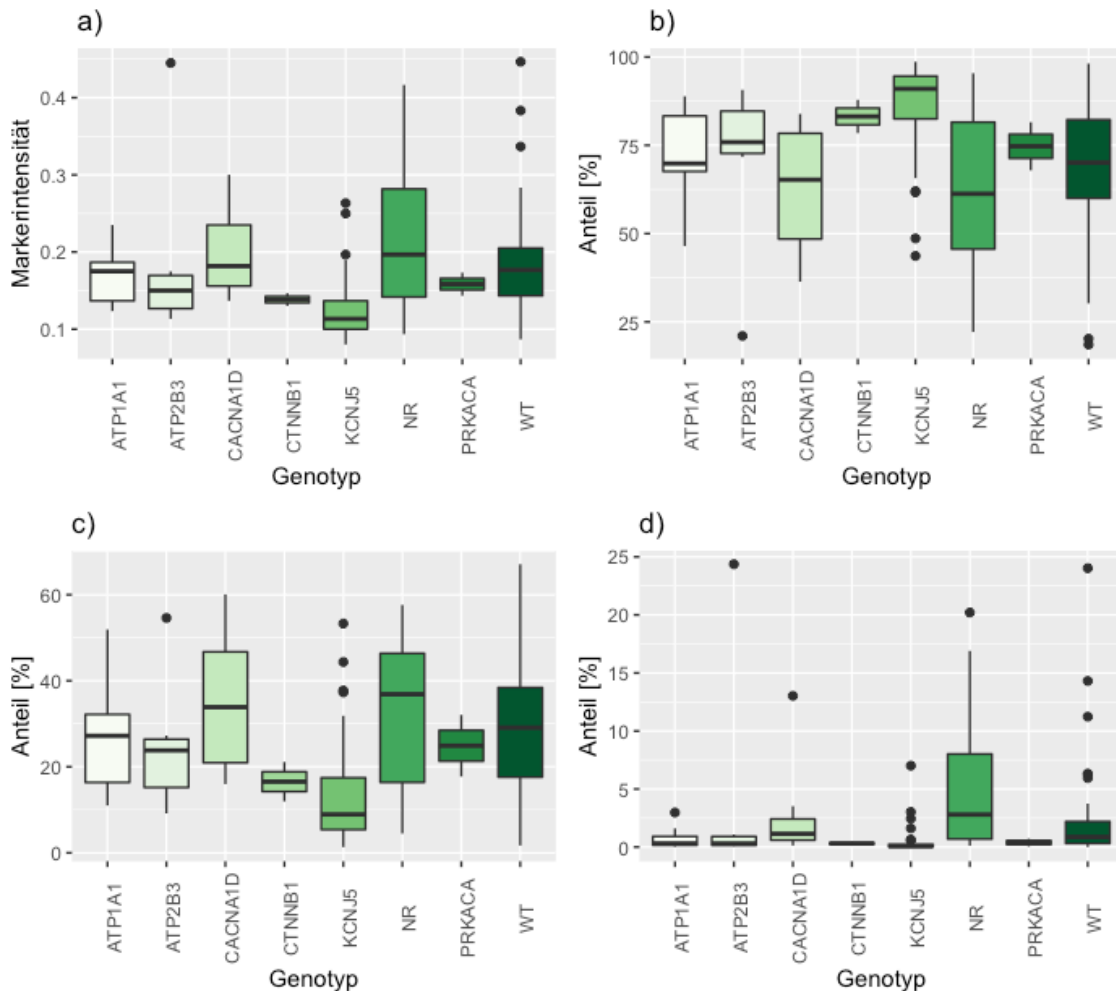
**Abb. 26 Geschlechtsvergleich der CYP11B1-Färbung.** a) Geschlechtsvergleich der durchschnittlichen Intensität der immunhistochemischen Färbung (p-Wert nach Benjamini-Hochberg-Korrektur = 0,0025). b) Anteil der Intensitätsklasse „niedrig“ an der markierten Fläche (p-Wert nach Benjamini-Hochberg-Korrektur = 0,0025). c) Anteil der Intensitätsklasse „mittel“ an der markierten Fläche (p-Wert nach Benjamini-Hochberg-Korrektur = 0,0025). d) Anteil der Intensitätsklasse „hoch“ an der markierten Fläche (p-Wert nach Benjamini-Hochberg-Korrektur = 0,0025).

### 3.3.3 Unterschiede in der CYP11B1-Expression nach Genotyp

Zwölf der 17 untersuchten immunhistochemischen Parameter unterschieden sich in ihren Rangsummen nach den Genotypen.

Die durchschnittliche Markerintensität und die Anteile der Intensitätsgradienten an der Färbefläche unterschieden sich allesamt hochsignifikant ( $p < 0,0001$ ) nach den Genotypen. Der paarweise Vergleich zeigte, dass APAs mit Mutation in *KCNJ5* eine niedrigere Intensität der CYP11B1-Markierung hatten als APAs mit Mutation in *ATP1A1* ( $p = 0,0094$ ), *CACNA1D* ( $p = 0,0009$ ), mit nicht-rekurrenter Mutation ( $p = 0,0482$ ) und mit *Wildtyp*-Genotyp ( $p < 0,0001$ ). *KCNJ5*-APAs wiesen einen signifikant höheren Anteil der niedrigen Intensitätsklasse an der gesamten Färbung auf als *ATP1A1*- ( $p = 0,0145$ ), *CACNA1D*- ( $p = 0,0004$ ), *NR*- ( $p = 0,0400$ ) und *WT*-Tumore ( $p < 0,0001$ ). Der Anteil der mittleren Intensitätsklasse war bei *KCNJ5*-Tumoren dagegen niedriger als bei *ATP1A1*- ( $p = 0,0121$ ), *CACNA1D*- ( $p = 0,0004$ ), *NR*- ( $p = 0,0433$ ) und *WT*-Tumoren ( $p < 0,0001$ ). Auch der Anteil der höchsten Färbintensitätsklasse war bei *KCNJ5*-Tumoren signifikant niedriger als bei *CACNA1D*- ( $p = 0,0013$ ), *NR*- ( $p = 0,0023$ ) und *WT*-APAs ( $p < 0,0001$ ). Dies wird auch in Abb. 27 und der

dazugehörigen Tab. 20 dargestellt. Das Verhältnis der markierten zur gesamten Tumorphäche unterschied sich nicht signifikant nach Genotypen ( $p = 0,2778$ ).



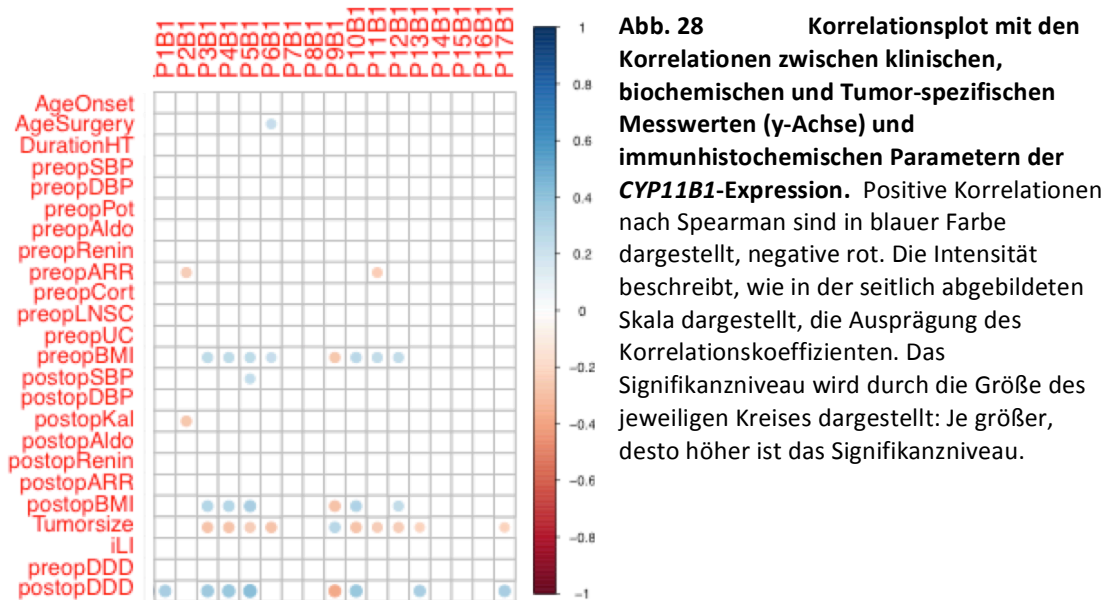
**Abb. 27** Vergleich der *CYP11B1*-Färbung nach Genotypen. a) Vergleich der durchschnittlichen Markerintensität nach Genotypen. ( $p < 0,0001$ ) b) Vergleich des Anteils der Intensitätsklasse „niedrig“ an der markierten Fläche nach Genotypen. ( $p < 0,0001$ ) c) Vergleich des Anteils der Intensitätsklasse „mittel“ an der markierten Fläche nach Genotypen. ( $p < 0,0001$ ) d) Vergleich des Anteils der Intensitätsklasse „hoch“ an der markierten Fläche nach Genotypen. ( $p < 0,0001$ ) Die hier aufgeführten p-Werte entsprechen dem Rangsummenvergleich der unterschiedlichen Genotypen nach Kruskal-Wallis mit p-Wert-Korrektur nach Benjamini-Hochberg. Die Signifikanzniveaus der paarweisen Vergleiche der Genotypen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in dieser Abbildung dargestellt, sondern werden in Tab. 20 aufgeführt.

	Zugehörige Abbildung	<i>KCNJ5</i> vs. <i>ATP1A1</i>	<i>KCNJ5</i> vs. <i>CACNA1D</i>	<i>KCNJ5</i> vs. <i>NR</i>	<i>KCNJ5</i> vs. <i>WT</i>
Intensität	Abb. 27a)	<b>0,0094</b>	<b>0,0009</b>	<b>0,0482</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Anteil „niedrig“	Abb. 27b)	<b>0,0145</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,0400</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Anteil „mittel“	Abb. 27c)	<b>0,0121</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,0433</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Anteil „hoch“	Abb. 27d)	0,0864	<b>0,0013</b>	<b>0,0023</b>	<b>&lt;0,0001</b>

**Tabelle 20:** P-Werte nach Benjamini-Hochberg-Korrektur der sich signifikant unterscheidenden paarweisen Vergleichen von *CYP11B1*-spezifischen IHC-Parametern nach Genotypen.

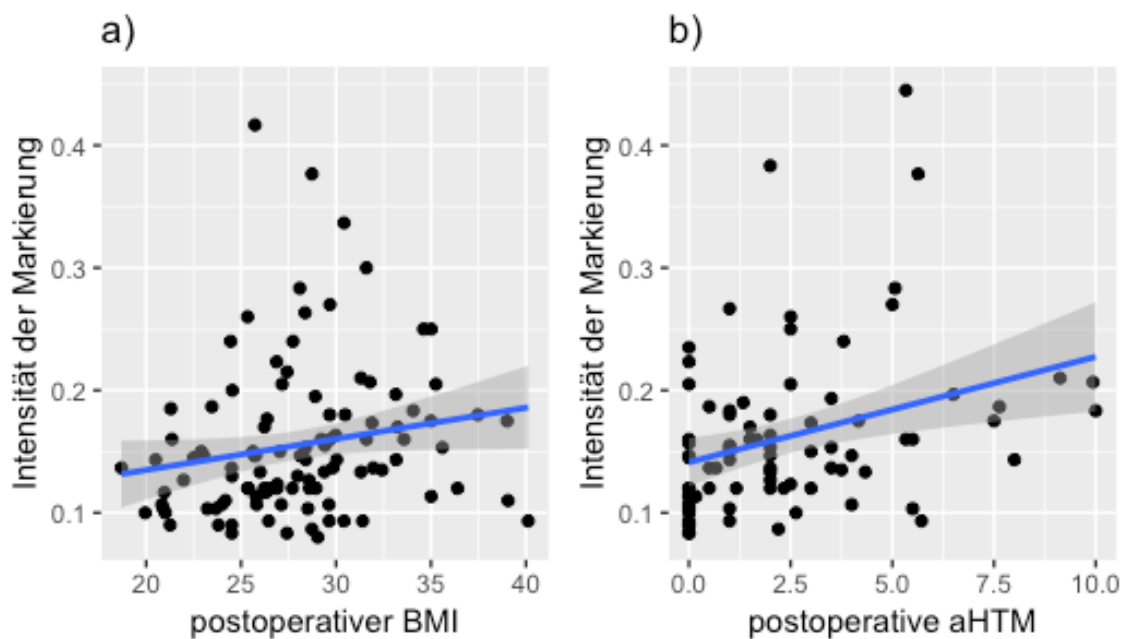
### 3.3.4 Korrelationen der CYP11B1-Expression mit klinischen und biochemischen Parametern

Beim Vergleich der 24 klinischen, biochemischen und tumor-spezifischen Parameter mit den 17 Parametern der CYP11B1-Expression wurde insgesamt bei 408 Paaren ein Korrelationskoeffizient nach Spearman und der dazugehörige p-Wert berechnet. Hierbei zeigten sich wie im Korrelationsplot in Abb. 28 dargestellt 37 signifikante p-Werte.



Im Folgenden werden, bedingt durch die in Kapitel 3.3.1. beschriebenen internen Korrelationen der Parameter der CYP11B1-Expression, nur die Ratio der gefärbten Fläche zur gesamten Tumorfläche sowie die durchschnittliche Intensität der Markierung dargestellt.

Die Ratio korrelierte mit keinem der biochemischen, klinischen und tumor-spezifischen Messwerte. Die durchschnittliche Intensität der Markerfärbung korrelierte positiv mit dem präoperativen BMI ( $\rho_s = 0,2503$ ;  $p = 0,0214$ ), dem postoperativen BMI ( $\rho_s = 0,2825$ ;  $p = 0,0160$ ) und der Anzahl der postoperativ benötigten antihypertensiven Medikation ( $\rho_s = 0,3756$ ;  $p = 0,0032$ ). Dieser IHC-Parameter korrelierte zudem negativ mit der Tumorgröße ( $\rho_s = -0,2757$ ;  $p = 0,0065$ ). Die Korrelationen des IHC-Parameters mit dem postoperativen BMI und der postoperativen aHTM sind exemplarisch in Abb. 29a) und 29b) dargestellt.



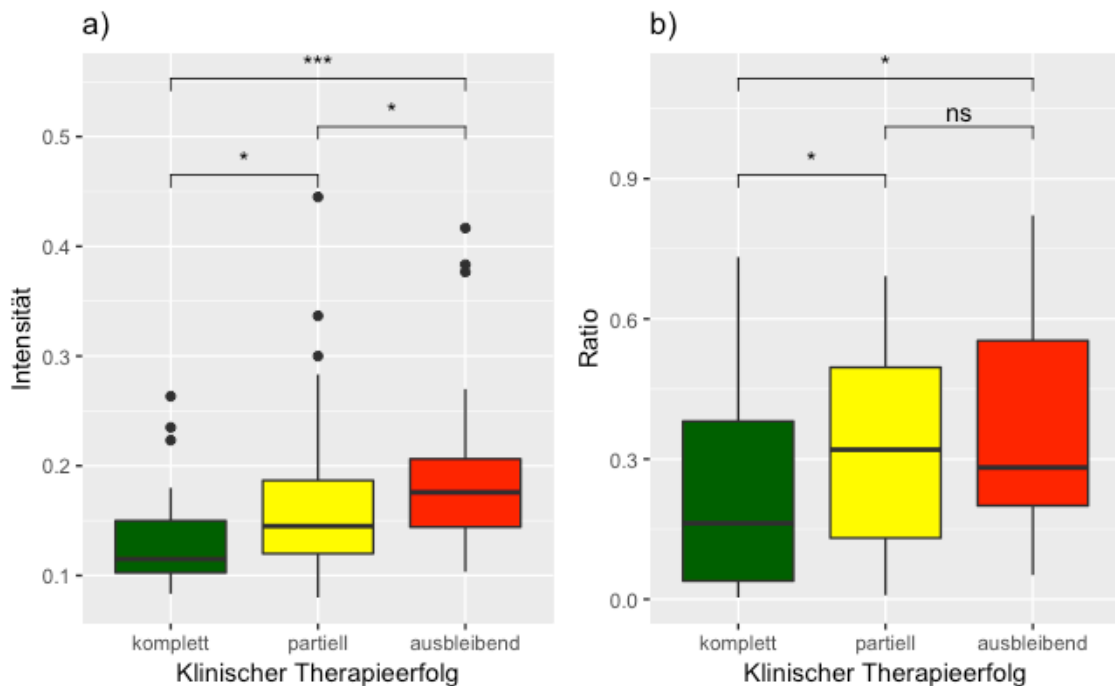
**Abb. 29** Korrelationen der CYP11B1-Expression mit klinischen Parametern. a) Korrelation der durchschnittlichen Markerintensität mit dem postoperativen BMI ( $\rho_s = 0,2825$ ;  $p = 0,0160$ ) b) Korrelation der durchschnittlichen Markerintensität mit der postoperativen aHTM ( $\rho_s = 0,3756$ ;  $p = 0,0032$ )

### 3.3.5 Korrelationen der CYP11B1-Expression mit dem Therapieerfolg

Das biochemische Outcome korrelierte mit keinem der untersuchten immunhistochemischen CYP11B1-Parameter.

Fünfzehn der 17 erhobenen immunhistochemischen Parameter wiesen Unterschiede zwischen den verschiedenen Klassen des klinischen Outcomes auf. Wie in Abb. 30 und Tab. 21 dargestellt, hatten die APAs von Patienten, die nach der Operation eine komplette Remission ihres PA aufwiesen eine signifikant niedrigere durchschnittliche Intensität der IHC-Färbung und einen kleineren immunhistochemisch gefärbten Anteil an der gesamten Tumorfläche als Patienten mit partieller und ausbleibender Heilung. Auch zwischen den Gruppen mit partiellem und ausbleibendem Therapieerfolg unterschied sich die Intensität der Färbung signifikant ( $p = 0,0351$ ).





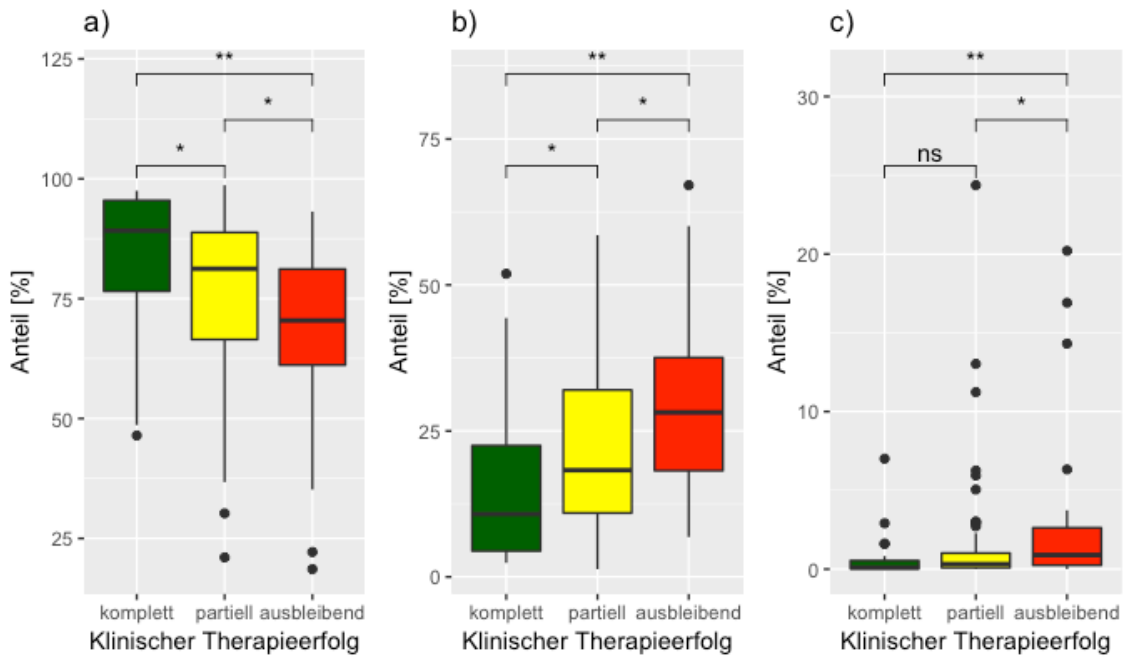
**Abb. 30** Vergleich der *CYP11B1*-Färbung mit dem klinischen Therapieerfolg. a) Vergleich durchschnittlichen Markerintensität nach klinischem Therapieerfolg ( $p = 0,0052$ ). b) Vergleich der Ratio der gefärbten Fläche zur Gesamttumorfläche nach klinischem Outcome ( $p = 0,0245$ ). Die hier aufgeführten p-Werte entsprechen dem Rangsummenvergleich der unterschiedlichen Kategorien des Therapieerfolgs nach Kruskal-Wallis mit p-Wert-Korrektur nach Benjamini-Hochberg. Die paarweisen Vergleiche sind in Tabelle 21 aufgeführt. (ns = nicht signifikant)

Parameter		p-Wert nach Kruskal-Wallis	Komplett vs. partiell	Partiell vs. ausbleibend	Komplett vs. ausbleibend
P4B1	Intensität	<b>0,0052</b>	<b>0,0264</b>	<b>0,0351</b>	<b>0,0025</b>
P9B1	Anteil „niedrig“	<b>0,0061</b>	<b>0,0395</b>	<b>0,0395</b>	<b>0,0032</b>
P10B1	Anteil „mittel“	<b>0,0065</b>	<b>0,043</b>	<b>0,043</b>	<b>0,004</b>
P11B1	Anteil „hoch“	<b>0,0166</b>	0,064	0,064	<b>0,020</b>
P15B1	Markierung/Tumor	<b>0,0245</b>	<b>0,042</b>	0,228	<b>0,028</b>

**Tabelle 21: Vergleich des Therapieerfolgs mit ausgewählten IHC-Parametern für *CYP11B1*.** Der p-Wert nach Kruskal-Wallis bildet den Rangsummenvergleich ab. Es sind weiterhin die paarweisen Vergleiche der Gruppen nach Therapieerfolg abgebildet. Sämtliche p-Werte wurden mit der Methode nach Benjamini-Hochberg korrigiert.

Die Analyse des Vergleichs der Intensitätsklassenanteile mit dem Therapieerfolg zeigte, wie in Abb. 31 dargestellt, dass die APAs von Patienten mit postoperativ komplettem klinischen Therapieerfolg einen größeren Anteil der niedrigen *CYP11B1*-Markierungsklasse und einen kleineren Anteil der mittleren Klasse als die beiden anderen Gruppen hatten. Der Anteil an der niedrigen Klasse war auch bei Patienten mit partiellem Therapieerfolg größer als bei Patienten mit weiterbestehender klinischer Symptomatik. APAs von Patienten mit ausbleibendem

Therapieerfolg wiesen desweiteren einen größeren Anteil an der Markierung der mittleren und hohen Klasse auf als Patienten mit komplettem oder partiellem Therapieerfolg.

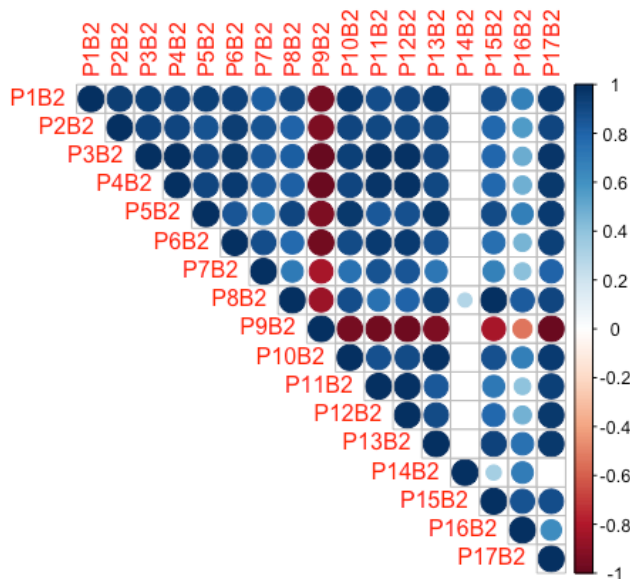


**Abb. 31** Vergleich der anteiligen *CYP11B1*-Färbung mit dem klinischen Therapieerfolg. a) Vergleich des Anteils der Intensitätsklasse „niedrig“ an der markierten Fläche nach klinischem Therapieerfolg ( $p = 0,0061$ ). b) Vergleich des Anteils der Intensitätsklasse „mittel“ an der markierten Fläche nach klinischem Outcome ( $p = 0,0065$ ). c) Vergleich des Anteils der Intensitätsklasse „hoch“ an der markierten Fläche nach Genotypen ( $p = 0,0166$ ). Die hier aufgeführten p-Werte entsprechen dem Rangsummenvergleich der unterschiedlichen Kategorien des Therapieerfolgs nach Kruskal-Wallis mit p-Wert-Korrektur nach Benjamini-Hochberg. Die paarweisen Vergleiche sind in Tab. 21 aufgeführt. (ns = nicht signifikant)

### 3.4 Immunhistochemische Analyse der CYP11B2-Expression

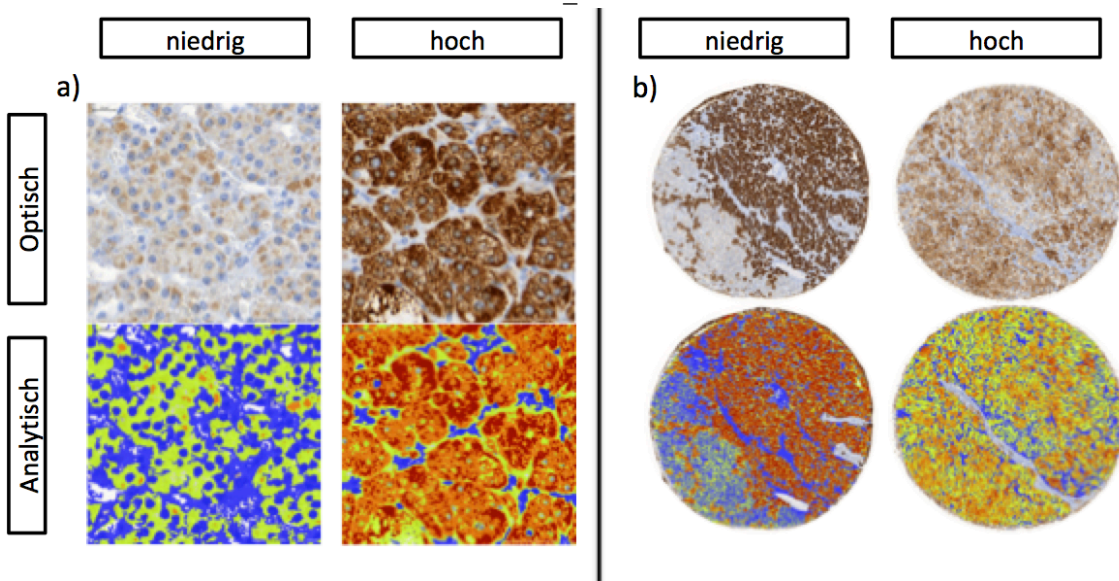
#### 3.4.1 Erhobene Parameter und interne Korrelationen

Analog zum Vorgehen bei den Parametern der *CYP11B1*-Expression, wurden auch die Korrelationen der immunhistochemischen Parameter der *CYP11B2*-Expression in einem Korrelationsplot dargestellt (Abb. 32).



**Abb. 32** Korrelationsplot der immunhistochemischen Parameter der *CYP11B2*-Expression untereinander. Positive Korrelationen nach Spearman sind in blauer Farbe dargestellt, negative rot. Die Intensität beschreibt, wie in der seitlich abgebildeten Skala dargestellt, die Ausprägung des Korrelationskoeffizienten. Das Signifikanzniveau wird durch die Größe des jeweiligen Kreises dargestellt: Je größer, desto höher ist das Signifikanzniveau. Nur Korrelationen mit  $p < 0,001$  sind hier aufgeführt.

Aus diesem ist ersichtlich, dass alle IHC-Parameter sehr stark untereinander korrelieren. P4B2 entspricht der durchschnittlichen Markerintensität und wurde, analog zu der Situation bei den *CYP11B1*-Parametern, als repräsentativer Parameter gewählt. P14B2 (Ratio der Färbung zur gesamten als ROI definierten Tumorfläche) bildet eine Ausnahme und weist wenig Korrelationen mit den anderen immunhistochemischen Parametern auf. Auch dieser Parameter wird im Folgenden genauer analysiert. Diese beiden Parameter werden weiterhin in Abb. 33 dargestellt.



**Abb. 33** Beispielbilder der *CYP11B2*-Färbung. a) Vergleich von Tumoren mit niedriger und hoher *CYP11B2*-Färbeintensität. b) Vergleich von APAs mit niedriger und hoher Ratio der *CYP11B2*-gefärbten zur gesamten ROI-Fläche.

Bei allen Analysen wird angegeben, wie viele der immunhistochemischen Parameter signifikante Korrelationen aufwiesen. Zusätzlich zu den bereits erwähnten IHC-Parametern werden auch besonders auffällige andere genauer analysiert und im Folgenden dargestellt.

### 3.4.2 Geschlechtsunterschiede in der *CYP11B2*-Expression

Die untersuchten immunhistochemischen Parameter der *CYP11B2*-Expression wiesen keine signifikanten Geschlechtsunterschiede auf.

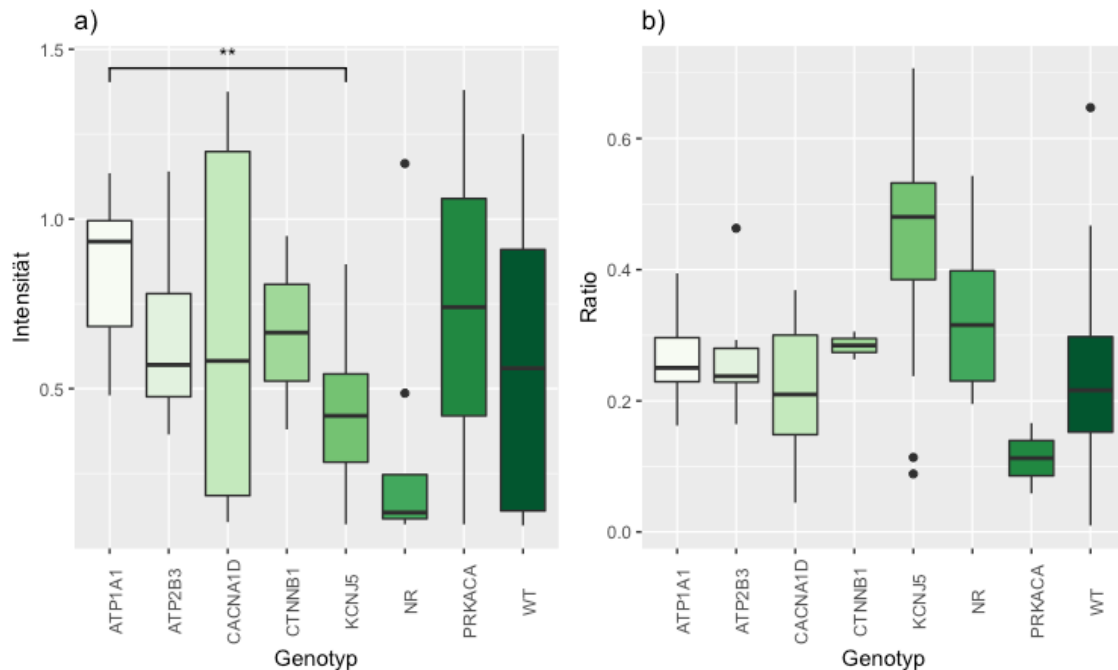
### 3.4.3 Unterschiede in der *CYP11B2*-Expression nach Genotyp

Acht von 17 untersuchten Parametern der *CYP11B2*-Expression wiesen in den Rangsummen Unterschiede nach dem Genotyp auf.

Zu diesen IHC-Parametern gehörte, wie in Abb. 34a) dargestellt, die durchschnittliche Markerintensität ( $p = 0,0454$ ). Der paarweise Vergleich der Genotypen wies hier darauf hin, dass *KCNJ5*-APAs eine signifikant weniger intensive Färbung mit anti-*CYP11B2*-Antikörpern aufweisen als Tumore mit Mutation in *ATP1A1*. Die Ratio der gefärbten Fläche zur gesamten Tumorphäche unterschied sich knapp nicht signifikant nach Genotypen ( $p = 0,0502$ ).

Unter den signifikanten Messwerten fiel besonders jener Parameter auf, der das Verhältnis der Färbefläche der Intensitätsklasse „niedrig“ zur gesamten Tumorgewebefläche repräsentiert. Dieser hatte im Rangsummenvergleich nach Kruskal-Wallis einen p-Wert von  $< 0,0001$  und ist

in Abb. 34b) dargestellt. Der paarweise Vergleich der Genotypen zeigte, dass APAs mit *KCNJ5*-Mutation ein signifikant höheres Verhältnis der Fläche der niedrigen Farbintensität zur Tumorfäche hatten als Tumore mit Mutation in *ATP1A1* ( $p = 0,0002$ ), *ATP2B3* ( $p = 0,0073$ ), *CACNA1D* ( $p < 0,0001$ ) und *PRKACA* ( $p = 0,0351$ ), sowie Wildtyp-APAs ( $p < 0,0001$ ).



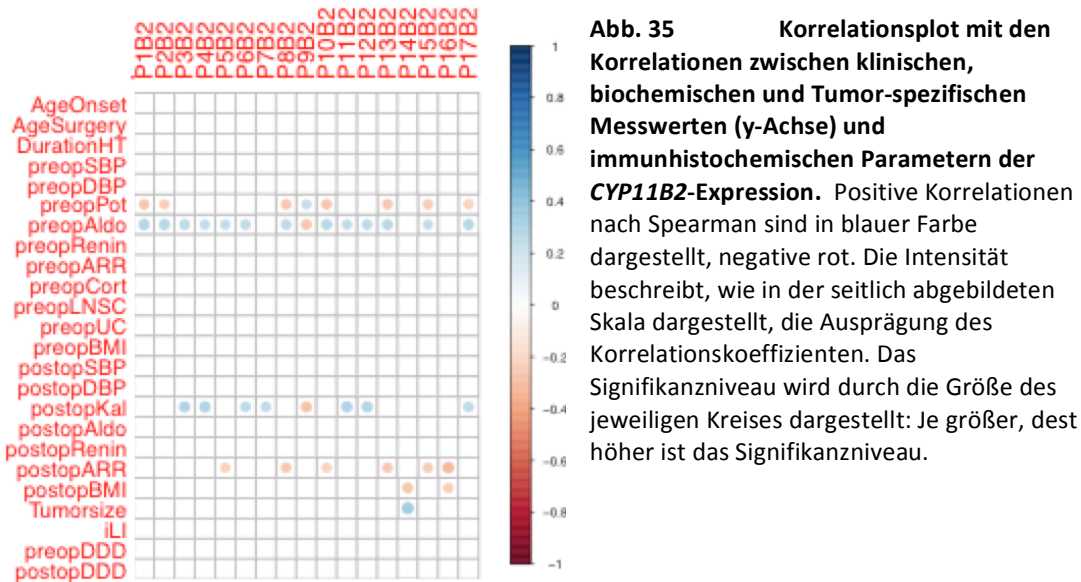
**Abb. 34** Vergleich der CYP11B2-Expression nach Genotypen. **a)** Vergleich der durchschnittlichen Markerintensität nach Genotypen ( $p = 0,0454$ ). Im paarweisen Vergleich unterschieden sich Tumore mit Mutation in *ATPA1A* signifikant von Tumoren mit Mutation in *KCNJ5* ( $p = 0,0019$ ). **b)** Verhältnis der Markerfläche der Klasse „niedrig“ zur Gesamtumorfläche nach Genotypen ( $p < 0,0001$ ). Die Signifikanzniveaus der paarweisen Vergleiche der Genotypen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in dieser Abbildung dargestellt, sondern werden in Tab. 22 aufgeführt.

	<i>ATP1A1</i>	<i>ATP2B3</i>	<i>CACNA1D</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>KCNJ5</i>	<i>NR</i>	<i>PRKACA</i>
<i>ATP2B3</i>	0,8044	/	/	/	/	/	/
<i>CACNA1D</i>	0,3646	0,5455	/	/	/	/	/
<i>CTNNB1</i>	0,6516	0,5455	0,5656	/	/	/	/
<i>KCNJ5</i>	<b>0,0002</b>	<b>0,0073</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,1373	/	/	/
<i>NR</i>	0,5455	0,5455	0,1851	0,8889	0,0576	/	/
<i>PRKACA</i>	0,1851	0,3077	0,5455	0,5455	<b>0,0351</b>	0,1351	/
<i>WT</i>	0,4677	0,5456	0,7959	0,5455	<b>&lt;0,0001</b>	0,1358	0,2763

**Tabelle 22:** Paarweise Vergleiche des Verhältnisses der Markerfläche der Klasse „niedrig“ zur Gesamtumorfläche nach Genotypen mit p-Wert-Korrektur nach Benjamini-Hochberg

### 3.4.4 Korrelationen der CYP11B2-Expression mit klinischen und biochemischen Messwerten

Zwischen den 24 biochemischen, klinischen und Tumor-spezifischen Parametern sowie den 17 immunhistochemischen Parametern der CYP11B2-Expression wurden insgesamt 408 paarweise Korrelationen nach Spearman untersucht. Insgesamt wiesen 39 dieser Paare eine signifikante Korrelation auf.



Wie in Abb. 35 dargestellt, wies der Parameter P4B2, die durchschnittliche Intensität der Markerfärbung, eine positive Korrelation mit dem präoperativen PAC ( $\rho_s = 0,2380$ ;  $p = 0,0253$ ) und mit dem postoperativen  $K_s^+$  ( $\rho_s = 0,2948$ ;  $p = 0,0038$ ) auf.

Die Ratio der gefärbten Fläche zur ROI-Tumorfläche (P14B1) hatte einen negativen Zusammenhang mit dem postoperativen BMI ( $\rho_s = -0,2641$ ;  $p = 0,0275$ ) und einen positiven mit der Tumorgröße ( $\rho_s = 0,3387$ ;  $p = 0,0003$ ).

### 3.4.5 Korrelationen der CYP11B2-Expression mit dem Therapieerfolg

Der Vergleich der Parameter der CYP11B2-Expression der APAs wies weder für den klinischen noch für den biochemischen Therapieerfolg signifikante Unterschiede in den Rangsummen nach Kruskal-Wallis der jeweiligen Klassen auf.

### 3.5 Zusammenhänge der bildanalytischen Parametern

#### 3.5.1 Korrelationen zwischen der Morphometrie und der CYP11B1-Expression

Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden in diesem Kapitel ausschließlich die Korrelationen zwischen der durchschnittlichen Intensität der Markerfärbung und der Ratio der Färbung am Tumorgewebe mit den morphometrischen Parametern zusammengefasst. Zum Vergleich dieser ebengenannten Parameter mit der Morphometrie wurde eine Auswahl an morphometrischen Parameter auf Basis der in den vorangehenden Kapiteln dieser Arbeit getroffen und in Tab. 23 dargestellt.

Morphometrie		P4B1		P14B1	
Parameter	Charakter	$\rho_s$	p-Wert	$\rho_s$	p-Wert
Morpho6	Formparameter "Border Index"	-0,3695	<0,0001	0,2224	0,0463
Morpho14	Formparameter "Rand/Fläche"	-0,0633	0,5518	-0,1572	0,1842
Morpho19	Farbparameter "Brightness"	-0,1364	0,1721	0,0322	0,8717
Morpho39	Farbparameter "Layer2"	-0,3394	0,0002	0,0583	0,7006
Morpho49	Formparameter "Länge/Breite"	-0,1123	0,2748	-0,1026	0,4256
Morpho51	Farbparameter "Hämatoxylin"	-0,3026	0,0011	-0,0242	0,8918
Morpho59	Formparameter "Rectangular Fit"	-0,0568	0,6030	0,1550	0,1897
Morpho61	Formparameter "Roundness"	-0,3371	0,0002	0,1563	0,1897
Morpho66	Formparameter "Shape Index"	-0,3930	<0,0001	0,2184	0,0505
Morpho96	Formparameter "nukleäre Roundness"	-0,0274	0,8112	0,0153	0,9284
Morpho98	Formparameter "nukleärer Shape Index"	-0,1751	0,0739	0,0428	0,8234
Morpho128	Farbparameter "Hämatoxylin Zellkern"	-0,4787	<0,0001	0,1683	0,1582
Morpho144	Texturparameter "Zellkernvariabilität"	-0,3325	0,0003	-0,0798	0,5657

**Tabelle 23: Auswahl von Korrelationen zwischen Morphometrie und CYP11B1-Expression.**

Der Parameter P4B1, die durchschnittliche Intensität der CYP11B1-IHC-Färbung, korrelierte mit 92 morphometrischen Parametern auf einem signifikanten Niveau. APAs mit einer stärkeren CYP11B1-Färbung hatten einen signifikant niedrigeren Border Index ( $\rho_s = -0,3965$ ;  $p < 0,0001$ ) und Shape Index ( $\rho_s = -0,3325$ ;  $p < 0,0001$ ), waren also weniger zerklüftet als weniger stark gefärbte Tumore. Zudem wiesen die stärker gefärbten Tumore weniger Hämatoxylin auf Ebene des Zellkerns ( $\rho_s = -0,4787$ ;  $p < 0,0001$ ) und insgesamt ( $\rho_s = -0,3026$ ;  $p = 0,0011$ ) auf und hatten einen kleineren Anteil am Farbparameter „Layer 2“ ( $\rho_s = -0,3394$ ;  $p = 0,0002$ ). Auch waren ihre Zellkerne weniger variabel in ihrer Größe ( $\rho_s = -0,3325$ ;  $p = 0,0003$ ).

Der Parameter P14B1, die Ratio der gefärbten zur gesamten ROI-Fläche, korrelierte mit 37 morphometrischen Messwerten auf signifikantem Niveau. Es bestand unter anderem eine positive Korrelation zum Border Index ( $\rho_s = 0,2224$ ;  $p = 0,0464$ ).

### 3.5.2 Korrelationen zwischen der Morphometrie und der CYP11B2-Expression

Auch bei den Korrelationen zwischen der Morphometrie und der CYP11B2-Färbung wurde die Analyse auf die Parameter der durchschnittlichen Markerintensität und auf das Verhältnis der gefärbten zur gesamten ROI-Fläche eingeschränkt. Es wurde eine Auswahl an morphometrischen Parametern mit deren Vergleich mit den genannten immunhistochemischen Messwerten auf Basis der in den vorangehenden Kapiteln dieser Arbeit gewählten Parameter getroffen und in Tab. 24 dargestellt.

Morphometrie		P4B2		P14B2	
Parameter	Charakter	$\rho_s$	p-Wert	$\rho_s$	p-Wert
Morpho6	Formparameter "Border Index"	-0,3225	<b>0,0011</b>	0,4911	<b>&lt;0,0001</b>
Morpho14	Formparameter "Rand/Fläche"	-0,3732	<b>0,0001</b>	0,3172	<b>0,0006</b>
Morpho19	Farbparameter "Brightness"	-0,2687	<b>0,0070</b>	0,4998	<b>&lt;0,0001</b>
Morpho39	Farbparameter "Layer2"	-0,2642	<b>0,0078</b>	0,4608	<b>&lt;0,0001</b>
Morpho49	Formparameter "Länge/Breite"	-0,3111	<b>0,0016</b>	0,3645	<b>&lt;0,0001</b>
Morpho51	Farbparameter "Hämatoxylin"	-0,0573	0,6186	0,2796	<b>0,0029</b>
Morpho59	Formparameter "Rectangular Fit"	0,3109	<b>0,0016</b>	-0,2747	<b>0,0035</b>
Morpho61	Formparameter "Roundness"	-0,2467	<b>0,0124</b>	0,3982	<b>&lt;0,0001</b>
Morpho66	Formparameter "Shape Index"	-0,3003	<b>0,0023</b>	0,4811	<b>&lt;0,0001</b>
Morpho96	Formparameter "nukleäre Roundness"	-0,2237	<b>0,0241</b>	-0,0311	0,7857
Morpho98	Formparameter "nukleärer Shape Index"	-0,1737	0,0863	-0,0045	0,9667
Morpho128	Farbparameter "Hämatoxylin Zellkern"	-0,2206	<b>0,0257</b>	0,4320	<b>&lt;0,0001</b>
Morpho144	Texturparameter "Zellkernvariabilität"	-0,1514	0,1349	0,5031	<b>&lt;0,0001</b>

**Tabelle 24: Auswahl von Korrelationen zwischen Morphometrie und CYP11B2-Expression.**

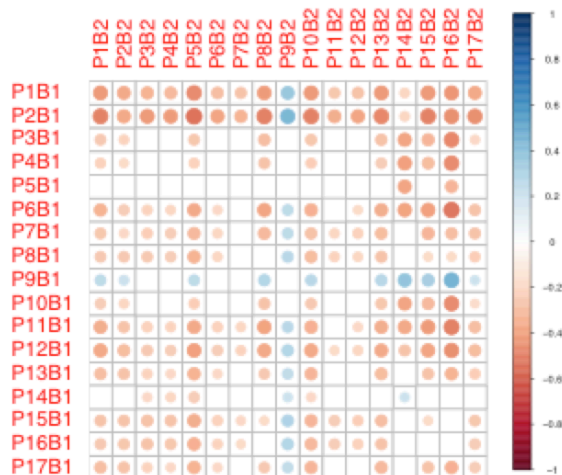
Die durchschnittliche Intensität der CYP11B2-Färbung, ausgedrückt durch P4B2, korrelierte mit 78 morphometrischen Messwerten auf signifikantem Niveau.

Die Ratio der markierten zur gesamten ROI-APA-Fläche, wie durch P14B2 repräsentiert, korrelierte mit 82 Parametern der Morphometrie. Hier war auffällig, dass starke positive Korrelationen zu Formparametern bestanden. Je größer die Ratio der gefärbten Fläche zur gesamten APA-ROI war, desto größer waren die Werte des Border Index ( $\rho_s = 0,4911$ ;  $p < 0,0001$ ), des Shape Index ( $\rho_s = 0,4811$ ;  $p < 0,0001$ ), des Verhältnisses der Länge zur Breite der Zellen ( $\rho_s = 0,3645$ ;  $p < 0,0001$ ) und der Zellkernvariabilität ( $\rho_s = 0,5031$ ;  $p < 0,0001$ ). Diese waren auch heller, wie durch den Farbparameter „Brightness“ ausgedrückt, ( $\rho_s = 0,4998$ ;  $p < 0,0001$ ), und hatten höhere Hämatoxylinwerte im Zellkern ( $\rho_s = 0,4320$ ;  $p < 0,0001$ ) und insgesamt ( $\rho_s = 0,2796$ ;  $p = 0,0029$ ).



### 3.5.3 Korrelationen der immunhistochemischen Färbungen

Die *CYP11B1*- und *CYP11B2*-Färbungen der jeweiligen APAs wiesen untereinander zahlreiche Zusammenhänge auf. Diese sind im Korrelationsplot in Abb. 36 dargestellt.



**Abb. 36** Korrelationsplot mit den Korrelationen zwischen den Parametern der *CYP11B1*-Expression (Y-Achse) und jenen der *CYP11B2*-Expression (X-Achse). Positive Korrelationen nach Spearman sind in blauer Farbe dargestellt, negative rot. Die Intensität beschreibt, wie in der seitlich abgebildeten Skala dargestellt, die Ausprägung des Korrelationskoeffizienten. Das Signifikanzniveau wird durch die Größe des jeweiligen Kreises dargestellt: Je größer, desto höher ist das Signifikanzniveau.

Insgesamt korrelierten 212 von 289 Paaren auf einem signifikanten Niveau. Im Korrelationsplot war auffällig, dass vor allem negative Korrelationen bestanden. Tatsächlich sind nur 23 Korrelationen positiv, 189 hingegen negativ.

Weiterhin fiel auf, dass die Parameter des Ausdrucks der durchschnittlichen Intensitäten der immunhistochemischen Färbungen (P4B1 und P4B2) keine signifikante Korrelation aufwiesen. Die durchschnittliche *CYP11B1*-Markierungsintensität wies jedoch eine Korrelation mit der Ratio der *CYP11B2*-Markierfläche an der gesamten APA-ROI (P14B2) auf ( $\rho_s = -0,2007$ ;  $p = 0,0250$ ). Ebenso korrelierte die durchschnittliche *CYP11B1*-Markierungsintensität negativ mit P14B1, der Ratio der *CYP11B1*-Markierfläche an der gesamten APA-ROI ( $\rho_s = -0,4056$ ;  $p < 0,0001$ ). Auch zwischen den beiden Verhältnissen der Markierungsfläche zur ROI-Tumorfläche bestand ein positiver Zusammenhang ( $\rho_s = 0,1935$ ;  $p = 0,0308$ ).

## 4 Diskussion

### 4.1 Betrachtung der Studienpopulation

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse aus Kapitel 3.1 mit der bestehenden Literatur verglichen und kommentiert.

#### 4.1.1 Geschlechtsverteilung

Unter den 135 untersuchten Patienten dieser Studie befanden sich 59 Frauen (43,7 %) und 76 Männer (56,3 %). In einer größeren multizentrischen Studie von Williams et al. wurden innerhalb unterschiedlicher klinischer Zentren starke Unterschiede der Geschlechtsverteilung mit einem Frauenanteil zwischen 24 und 60 % beschrieben. Neun von 12 Zentren dieser Studie wiesen jedoch mehr Männer als Frauen auf und im Mittel lag der Frauenanteil bei 44 %. Diese Studie schloss Zentren aus mehreren europäischen Ländern, den Vereinigten Staaten, Australien und Japan ein, sodass unterschiedliche Ausgangspopulationen eine Rolle auf die Geschlechtsverteilung gespielt haben können (38). In dieser Studie wurde auch nicht zwischen APAs und unilateraler Hyperplasie der Nebennierenrinde unterschieden, wobei die relative Seltenheit der unilateralen adrenokortikalen Hyperplasie zu beachten ist.

Eine italienische Studie, die die Prävalenz und klinische Manifestation von PA in der Primärversorgung in Turin und Umgebung untersuchte, fand unter 99 PA-Patienten eine Geschlechtsverteilung von 59,6 % Männer und 40,4 % Frauen (78). Hierin waren sowohl Patienten mit APA als auch BAH eingeschlossen.

Die Geschlechtsverteilung in dieser Arbeit ist also sowohl vergleichbar mit dem Mittelwert einer multizentrischen globalen Studie als auch mit der lokalen europäischen Geschlechtsverteilung des PA im Allgemeinen.

#### 4.1.2 Genotypverteilung

Bei 65,6 % der Patienten konnte entweder in der bidirektionalen Sequenzierung nach Sanger oder im *Whole exome sequencing* eine somatische Mutation festgestellt werden. Im Folgenden werden die Häufigkeiten der Genotypen eingehender diskutiert.

---

#### 4.1.2.1 KCNJ5

In 37,4 % der Adenome der aktuellen Studie konnte eine Mutation im *KCNJ5*-Gen nachgewiesen werden. Damit war dies die am häufigsten gefundene Mutation. In der Literatur wurden für europäische und westliche Populationen ähnliche Häufigkeiten dieser Mutation beschrieben. So wurden in einer großen europäischen Multicenter-Studie bei 180 von 474 Proben (38 %) Mutationen in *KCNJ5* gefunden (44). Auch andere Gruppen fanden in westlichen Kohorten ähnliche Prävalenzen, wobei die Häufigkeit von *KCNJ5*-Mutationen zwischen 34 und 47 % variierte (59, 79, 80).

In der Literatur ist beschrieben, dass besonders Frauen Mutationen in *KCNJ5* aufweisen (44, 60, 81, 82). So beschrieben Williams et al. in einer Meta-Analyse, dass 73 % der westlichen Patienten mit *KCNJ5*-Mutation weiblichen Geschlechts sind. Diese Beobachtung konnte auch in dieser Studie gemacht werden (82).

In asiatischen Populationen sind Mutationen in *KCNJ5* wesentlich häufiger. So finden sich hier Häufigkeiten von 65,2 bis 75,4 % in unterschiedlichen ostasiatischen Staaten (83, 84, 85). Der Ursprung dieses ethnischen Unterschieds in der Häufigkeit dieser Mutation ist zur Zeit noch ungeklärt (86).

Der Zusammenhang der *KCNJ5*-Mutation mit dem weiblichen Geschlecht kann in asiatischen Populationen, anders als in westlichen Studiengruppen, nicht beobachtet werden (87).

#### 4.1.2.2 CACNA1D

In dieser Arbeit wurde bei 7,6 % der Patienten eine Mutation in *CACNA1D* gefunden. Fernandes-Rosa et al. fanden diese Mutation in einer großen paneuropäischen Untersuchung bei 9,3 % der Patienten mit APA (44). Auch, dass die Mehrzahl der Patienten mit dieser Mutation männlichen Geschlechts sind, wie auch in dieser Arbeit ermittelt wurde, ist in der Literatur vorbeschrieben (88).

#### 4.1.2.3 Die ATPasen – ATP1A1 und ATP2B3

*ATP1A1* wies in der vorliegenden Arbeit bei 6,9 % der Patienten eine Mutation auf. Bei 4,6 % der Patienten konnte eine Mutation in *ATP2B3* nachgewiesen werden. In der Veröffentlichung von Fernandes-Rosa et al. werden die Häufigkeiten insgesamt mit 5,3 % für *ATP1A1* und 1,7 % für *ATP2B3* angegeben (44).

---

In dieser Arbeit konnten beide Mutationen häufiger bei Männern als bei Frauen nachgewiesen werden. Diese Geschlechtsverteilung wurde ebenfalls bereits vorbeschrieben (88).

#### 4.1.2.4 CTNNB1

In dieser Studie wurde bei zwei Patienten (1,5 %) eine Mutation in *CTNNB1* nachgewiesen. Beide waren weiblich. *CTNNB1*-Mutationen bei APAs sind als seltene Funde vorbeschrieben. Die Prävalenz variiert in der Literatur von 2,1 % bis 3,7 % und die Mehrzahl dieser Mutationen wurde bei Frauen nachgewiesen (46, 81, 89, 90, 91).

#### 4.1.2.5 PRKACA

In der Kohorte, die in dieser Arbeit beschrieben wird, fanden sich zwei APAs (1,5 %) mit Mutation in *PRKACA*. Diese Patienten, die beide weiblich sind, sind genauer in der Arbeit von Rhayem et al. beschrieben (54). Es handelte sich hierbei um die Erstbeschreibung dieses Phänomens, entsprechend kann kein Vergleich mit der Prävalenz in anderen Populationen gezogen werden. Vorher waren Mutationen in *PRKACA* überwiegend bei Patienten mit Cortisol-produzierenden Nebennierentumoren, dem Cushing-Syndrom beschrieben (52, 92, 93).

#### 4.1.2.6 Wildtyp und nicht-rekurrente Mutationen

Etwa 6 % der Tumore wiesen Mutationen auf, die in der gesamten Kohorte nur einmal auftraten und entsprechend als nicht-rekurrent bezeichnet wurden. Bei 34,4 % aller APAs in der vorliegenden Studie konnten keine somatischen Mutationen nachgewiesen werden. Diese wurden als Wildtyp bezeichnet. Es fällt schwer, einen Vergleich der Häufigkeiten von nicht-rekurrenten Mutationen und Wildtyp-Genotypen mit der Literatur zu erzielen, da unterschiedliche Definitionen von „Wildtyp“ benutzt werden.

So fanden Fernandes-Rosa et al. bei 45,2 % der Patienten aus ihrer Kohorte keine Mutation (44). Williams et al. beschrieben bei 45,6 % die Abwesenheit einer somatischen Mutation (82). In beiden Arbeiten war das Procedere jedoch so, dass per direkter Sequenzierung spezifisch nach Mutationen in *KCNJ5*, *CACNA1D*, *ATP1A1* und *ATP2B3* gesucht wurde. Wu et al. fanden einen Wildtyp-Anteil von 40,6 %, jedoch wurde auch hier mit einer direkten Sequenzierung nach Sanger und der Suche nach *KCNJ5*, *CACNA1D*, *ATP1A1*, *ATP2B3* und *CTNNB1* vorgegangen (89).

---

Das in der vorliegenden Arbeit benutzte Vorgehen mit zusätzlichem *Whole exome sequencing* führte zur Bildung einer weiteren Kategorie, jener der APAs mit nicht-rekurrenten Mutationen, welche bei alleiniger direkter Sequenzierung zur Kategorie der nicht-mutierten oder Wildtyp-Tumoren gezählt würden. Bei Beachtung dieser Besonderheit ähnelt die Summe der in unserer Studie gefundenen Häufigkeiten von nicht-rekurrent mutierten und Wildtyp-Adenomen mit etwa 40 % den in der Literatur vorbeschriebenen Zahlen.

#### 4.1.3 Altersverteilung

Die Patienten in dieser Studie waren bei Adrenalektomie im Mittel  $50,7 \pm 10,0$  Jahre alt. Dies liegt im Mittelfeld der von Williams et al. präsentierten Altersdaten, welche je nach Referenzzentrum von  $47,7 \pm 10,3$  bis  $54,4 \pm 11,1$  Jahren reichen (38). Patienten mit Tumoren mit Mutation in *KCNJ5* beim operativen Eingriff waren signifikant jünger als Patienten mit Wildtyp-APA. Auch dies ist vorbeschrieben (86). Der hier festgestellte Geschlechtsunterschied, nachdem Männer bei Adrenalektomie signifikant älter waren als Frauen, basiert vermutlich auf dem in den vorangeegangenen Kapiteln beschriebenen häufigeren Auftreten von *KCNJ5*-Mutationen bei Frauen.

Bei erstmaliger Diagnose der arteriellen Hypertonie waren die Patienten unserer Studie im Durchschnitt  $39,6 \pm 8,9$  Jahre alt. Auch hier waren Frauen jünger als Männer. Zusätzlich waren Patienten, die eine Mutation in *CACNA1D* aufwiesen, bei Erstdiagnose der arteriellen Hypertonie signifikant jünger als Patienten mit nicht-rekurrenter Mutation. Hier war noch auffällig, dass bei *CACNA1D*-Patienten mit 14 (6,3) Jahren die größte Zeitdifferenz zwischen der Erstdiagnose eines arteriellen Hypertonus und der Adrenalektomie lag. Diese Beobachtung wird in Kapitel 4.2.6 erneut aufgegriffen.

#### 4.1.4 Präoperative biochemische und klinische Messwerte

Vor der Adrenalektomie bestanden Unterschiede zwischen den Geschlechtern in der klinischen und laborchemischen Präsentation der Patienten. So hatten Männer einen signifikant höheren systolischen Blutdruck trotz einer höheren täglichen Dosis an antihypertensiver Medikation als Frauen. Frauen wiesen erwartungsgemäß einen niedrigeren BMI auf.

#### 4.1.5 Postoperative biochemische und klinische Messwerte

Auch nach der chirurgischen Intervention unterschieden sich die Geschlechter in ihrer klinischen und biochemischen Präsentation. Männer hatten weiterhin einen signifikant

---

höheren systolischen Blutdruck trotz einer höheren Anzahl an blutdrucksenkenden Medikamenten. Auch wiesen Frauen weiterhin einen niedrigeren BMI auf.

Der postoperative Vergleich zwischen den Genotypen wies darauf hin, dass Patienten, die eine Mutation in *ATP2B3* hatten, einen höheren BMI hatten als jene mit *KCNJ5*-Mutation. An diesem Unterschied ist wahrscheinlich erneut die unterschiedliche Geschlechtsverteilung zwischen den Genotypen mitbeteiligt. So sind *ATP2B3*-Patienten eher männlich, *KCNJ5*-Patienten eher weiblich.

#### 4.1.6 Tumor-spezifische Parameter

Die untersuchten Tumore wiesen eine mediane Größe von 15 (8) mm auf. Es fiel ein signifikanter Größenunterschied zwischen APAs mit Mutation in *KCNJ5* und Wildtyp-Adenomen auf. Erstere maßen im Median 17 (5) mm, letztere 10 (8) mm. Dieser Größenunterschied ist in der Literatur mehrfach vorbeschrieben (44, 60, 86).

Der ebenfalls bestehende Geschlechtsunterschied mit größeren Tumoren bei Frauen als bei Männern wird in der Literatur nicht explizit erwähnt. Da jedoch die große Mehrzahl der *KCNJ5*-mutierten Tumore von Frauen stammt, und mit diesem Genotyp ein höherer Tumordurchmesser assoziiert ist, scheint hier ein Zusammenhang naheliegend. Weiterhin werden in der Literatur eher die verschiedenen Genotypen als die Geschlechter untereinander verglichen.

Ebenfalls beschrieben ist, dass APAs mit Mutation in *CACNA1D* generell am unteren Größenspektrum liegen und speziell kleiner als *KCNJ5*- und Wildtyp-APAs sind (44, 46, 47). Auch in der vorliegenden Kohorte waren Tumoren mit *CACNA1D*-Mutation mit 11,5 (5) mm eher klein, wenngleich Wildtyp und *PRKACA*-APAs noch kleiner waren und keine statistisch signifikanten Unterschiede im Größenvergleich zwischen *CACNA1D*-APAs und Adenomen anderen Genotyps nachgewiesen werden konnten. Besonders der in der Literatur beschriebene Größenunterschied zwischen Wildtyp- und *CACNA1D*-APAs scheint durch die unterschiedlichen Definitionen des „Wildtyps“ fraglich. Die Tatsache, dass *CACNA1D*-APAs oftmals klein sind, kann einen Erklärungsansatz liefern, warum bei diesen, wie in Kapitel 4.2.3. beschrieben, die längste Zeitspanne zwischen erstmaliger Diagnose des arteriellen Hypertonus und der Adrenalectomie besteht. Diese werden nämlich ob ihrer geringen Größe in bildgebenden Verfahren öfter übersehen, und entsprechend kommt es erst später zu einer korrekten Diagnose (46, 94, 95).

---

#### 4.1.7 *Bewertung des Therapieerfolgs*

Die Bestimmung des Therapieerfolgs wurde gemäß der in einem internationalen Konsensus festgelegten Kriterien, welche in Kapitel 2.5.4 zusammengefasst sind, durchgeführt (38). Die von Williams et al. beschriebene PASO-Studie umfasste Patienten aus mehreren Zentren aus verschiedenen Staaten, darunter auch aus München. Die in unserer Studie beschriebene Population deckt sich deswegen in Teilen mit der Münchener Kohorte des PASO-Kollektivs, da beide Rückgriff auf die Patienten des Deutschen Conn-Registers nehmen.

##### 4.1.7.1 *Bewertung des biochemischen Therapieerfolgs*

In der vorliegenden Kohorte hatten 89,7 % der Patienten biochemisch einen kompletten postoperativen Therapieerfolg, 3,2 % einen partiellen während bei 7,1 % der Erfolg ausblieb. Williams et al. fanden ähnliche Anteile: 94 (83 - 100) % mit komplettem, 4 (0 - 15) % mit partiellem und 2 (0 - 5) % mit ausbleibendem Therapieerfolg (38). In der Literatur wird die biochemische Normalisierung aus pathophysiologischen Überlegungen gerne als post-hoc-Kontrolle der korrekten Diagnose eines unilateralen APAs eingesetzt. So hätten Patienten mit partiellem oder ausbleibendem Therapieerfolg eher eine BAH oder bilaterale APAs mit einem Seitenunterschied in der Aldosteronproduktion (37, 38, 96).

Es konnten weder zwischen den Geschlechtern noch zwischen den Genotypen signifikante Unterschiede im biochemischen Outcome gefunden werden. Auch die Altersverteilungen, die biochemischen, die klinischen und die tumor-spezifischen Messwerte zeigten keine Unterschiede zwischen den Kategorien des biochemischen Therapieerfolgs. Einzig die Rangsummen des präoperativen diastolischen Blutdrucks wiesen Unterschiede zwischen den Kategorien auf. Diese waren jedoch im paarweisen Vergleich nicht signifikant, vermutlich bedingt durch die geringe Anzahl an Patienten in den Gruppen mit partiellem und ausbleibendem Therapieerfolg.

##### 4.1.7.2 *Bewertung des klinischen Therapieerfolgs*

In unserer Kohorte hatten 20 % der Patienten einen kompletten, 55 % einen partiellen und 25 % einen ausbleibenden Therapieerfolg. Williams et al. fanden ähnliche Werte. So hatten in der Multicenter-Studie insgesamt 37 % der Patienten einen kompletten Therapieerfolg, wobei die Häufigkeit dieser Outcome-Kategorie nach Zentrum von 17 bis 62 % variierte. Durchschnittlich 47 %, mit Zentren-spezifischen Schwankungen von 35 bis 66 %, hatten einen partiellen

---

Therapieerfolg. Bei 16 % insgesamt und 0 bis 32 % je nach Zentrum blieb der Therapieerfolg aus (38).

Mehrere Arbeiten fanden heraus, dass Frauen ein besseres klinisches Outcome hatten als Männer (37, 38, 97). Dies konnte in der vorliegenden Kohorte zumindest nicht auf einem statistisch signifikanten Niveau repliziert werden. Trotzdem war auch hier auffällig, dass mehr Frauen als Männer einen kompletten klinischen Therapieerfolg hatten, obwohl insgesamt weniger Frauen in der Kohorte eingeschlossen waren. Williams et al. erklären dies durch den vasoprotektiven Effekt von Östrogenen (38). Zu denken ist auch an eine geringere Grundwahrscheinlichkeit für eine essentielle Hypertonie bei Frauen als bei Männern des gleichen Alters. Auch ein vorbeschriebenes besseres Outcome bei Patienten mit APA mit Mutation in *KCNJ5* als mit Wildtyp- oder anderen APAs konnte bei unseren Patienten nicht repliziert werden, wobei jedoch beachtet werden muss, dass in den in der Literaturrecherche gefundenen Arbeiten nicht die PASO-Kriterien verwendet wurden (98, 99).

Der weitere Vergleich des klinischen Outcomes mit den präoperativen biochemischen, klinischen und tumor-spezifischen Messwerten zeigte eine starke Korrelation mit dem Alter bei Adrenalektomie. Je jünger die Patienten waren, desto besser war deren Outcome. Dies spiegelt sich auch in der verfügbaren Literatur wider (37, 38). Williams et al. erklären dies durch die mit steigendem Alter höhere Wahrscheinlichkeit, dass durch den länger bestehenden Einfluss von Aldosteron irreversible Gefäß- und Nierenschäden oder zusätzlich zur Aldosteron-bedingten eine essentielle Hypertonie bestehen (38). Andere Messwerte mit vorbeschriebenen Zusammenhängen mit dem Outcome, wie die präoperative antihypertensive Medikamentendosis und der BMI wiesen hier keine Rangsummenunterschiede zwischen den Kategorien des Therapieerfolgs auf.

## 4.2 Morphometrie

### 4.2.1 Anmerkungen zur Morphometrie

Der größte Unterschied zwischen der vorliegenden Arbeit und der Mehrzahl der vorangegangenen Studien liegt in der Art der Erfassung der Morphometrie. Die meisten anderen Studien stützen sich auf optische Betrachtungen der HE-Färbungen von APAs und klassifizieren die Zellen in ZG- und ZF-ähnlich. Teilweise werden noch Anteile von ZF- und ZG-Zellen am Gesamtbild angegeben. Somit wird die Morphologie meist in kategorialen Daten beschrieben. Die in unserer Arbeit verwendete Bildanalysesoftware detektiert jedoch Parameter, die intervall- und kardinalskaliert sind. Zwar kann nicht von jedem Parameter ein direkter Schluss



---

gezogen werden, ob der Grad seiner Ausprägung eher auf ein ZG- oder ZF-ähnliches Bild hinweist, da nicht immer ein klares optisches Korrelat besteht. Trotzdem wird in der folgenden Diskussion versucht, die hier gefundene Deskription der Morphologie in den bestehenden Kontext der Differenzierung von ZG- und ZF-Zellen und –Tumoren zu überlagern.

#### 4.2.2 Geschlechts- und Genotypverteilung

Unsere Analyse der Morphometrie nach Genotypen ergab, dass die Zellen von *KCNJ5*- und *NR-APAs* zerklüfteter waren als jene von *ATP1A1*-, *ATP2B3*-, *CACNA1D*- und Wildtyp-*APAs*. Tan et al. beschrieben, dass *KCNJ5*-Tumoren mit ZF-Aspekt mehr atypische Zellen aufweisen als ZG-Zellen. Gleichmaßen waren die Zellen von *ATP1A1*-, *ATP2B3*-, *CACNA1D*- und Wildtyp-Tumoren runder als jene von *KCNJ5*- und *NR-APAs* (100). Insbesondere die runde Zellform würde zu der klassischen Beschreibung von ZG-Zellen passen (4). Das Gewebe von *KCNJ5*-Tumoren in unserer Kohorte war heller als jenes von *ATP1A1*-, *CACNA1D*-, und Wildtyp-*APAs*. Dies wiederum passt zum vorbeschriebenen ZF-ähnlichen Aspekt von *KCNJ5*-Tumoren (60, 94). Tumoren mit *KCNJ5*-Mutation wiesen außerdem mehr Hämatoxylin als Wildtyp-Tumoren auf. Da das Hämatoxylin in der HE-Färbung basophile Zellbestandteile, wie den Zellkern und das raue endoplasmatische Retikulum anfärbt, kann vermutet werden, dass davon mehr in *KCNJ5*-Tumoren vorhanden sind. Tan et al. fanden mit größeren Zellkernen bei *KCNJ5-APAs* einen ähnlichen Befund. In dieser Studie fand auch die von uns gefundene größere Variabilität der Zellkerngröße von *KCNJ5*-Tumoren im Vergleich zu *APAs* anderen Genotyps eine Korrespondenz. So beschrieben die Autoren bei ZG-ähnlichen Tumoren mit *ATP1A1*- und *CACNA1D*-Mutation monomorphe, einfache Zellkerne, während ZF-ähnliche *KCNJ5-APAs* große Nuklei mit vielen Nukleoli präsentieren (100). Die hier gefundenen genotypspezifischen Unterschiede in der Morphologie scheinen also die vorbeschriebene Tendenz von *KCNJ5-APAs* zu einem ZF-ähnlichen und von *ATP1A1*-, *CACNA1D*- und Wildtyp-*APAs* zu einem ZG-ähnlichen Bild zu bestätigen. Interessant ist weiterhin, dass Tumore mit nicht-rekurrenten Mutationen teilweise dem morphometrischen Bild von *KCNJ5*-Tumoren entsprechen.

Männer und Frauen unterschieden sich in unserer Kohorte nicht in der Morphometrie. In der Literatur ist keine Assoziation von Geschlecht und Morphologie beschrieben, wenngleich vorstellbar wäre, dass die vorbeschriebenen Assoziationen von *KCNJ5*-Tumoren mit einem ZF-ähnlichen Aspekt und dem weiblichen Geschlecht auch hierauf Effekte hätten (44, 60, 82, 94).

---

#### 4.2.3 *Biochemische, klinische und Tumor-spezifische Parameter in Abhängigkeit vom Therapieerfolg*

In unserer Population war der postoperative diastolische Blutdruck von Patienten niedriger, je heller die Zellen deren APAs waren. Die postoperative antihypertensive Medikation war niedriger, je größer das Verhältnis der Zellen von Länge zu Breite war und je größer jenes des Zellrandes zur –fläche. Je niedriger der postoperative BMI war, desto größer waren die Zellkernvariabilität und die Rundheit der Zellen. Diese Zusammenhänge lassen sich durch die Assoziation von ZF-Zellen mit der *KCNJ5*-Mutation und von dieser mit dem weiblichen Geschlecht erklären.

Der Vergleich der Morphometrie mit den biochemischen Messwerten der Patienten zeigte starke Korrelationen einiger Parameter mit dem präoperativen mitternächtlichen Cortisol und dem Cortisol im 24-Stunden-Sammelurin. Die gefundenen Parameter lassen sich jedoch nicht eindeutig in ZG- und ZF-beschreibend einordnen. So würde das Verhältnis Länge/Breite der Zellen eher Zellen mit ZF-Charakter beschreiben, die „Rundheit“ eher ZG-ähnliche Zellen. Beide wiesen jedoch eine positive Korrelation mit dem Mitternachtscortisol auf. Je größer die optische Dichte des Zellkerns war, desto mehr Cortisol wurde im Sammelurin gefunden. Diesen Parameter könnte man als ZF-charakterisierend beschreiben, da beschrieben ist, dass ZG-Zellen eher blande Zellkerne aufweisen (100). Auch fanden wir, dass die Anwesenheit hellerer, womöglich ZF-ähnlicher Zellen mit mehr Cortisol im Urin einherging. Hingegen wies auch der Parameter der zellulären Rundheit, der eher ZG-ähnliche Zellen beschreibt, einen positiven Zusammenhang mit der Cortisolausscheidung im Urin auf.

In Arlt et al. wird anhand von 57 auch in dieser Studie eingeschlossenen APAs beschrieben, dass die Tumormorphologie unterschiedlich war je nach Glucocorticoidausschüttung (101). So hatten Patienten mit ZF-ähnlichen APAs eine niedrigere Glucocorticoidausschüttung, Patienten mit einer ZG-ähnlichen Gewebearchitektur eher eine hohe Exkretion. Diese Bewertung wurde jedoch optisch getroffen. In den folgenden Kapiteln dieser Arbeit werden die bei Arlt et al. beschriebenen Befunde weiter aufgegriffen.

Die in unserer Kohorte gefundene positive Korrelation der Tumorgröße mit der Helligkeit und der Zellkernvariabilität scheinen sich einzureihen in die vorbeschriebene Assoziation von ZF-APAs mit dem *KCNJ5*-Genotyp und dessen Assoziation zur Tumorgröße. Auch ein hohes Verhältnis der Zelllänge zur –breite kann, durch die bekannte Anordnung von ZF-Zellen in Säulen, als ein Kriterium der ZF-Zellen eingeordnet werden (4). Die ebenfalls gefundenen Korrelationen der Glätte der Zellränder und eines speziellen Farbparameters mit der Tumorgröße konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht eingeordnet werden.

---

Weiterhin konnten wir feststellen, dass APAs mit Zellen mit runden, glattrandigen Zellkernen variabler Größe einen höheren Lateralisationsindex aufwiesen als andere. Auffällig ist, dass vor allem nukleäre Parameter den Lateralisationsindex zu beeinflussen scheinen.

Insgesamt scheint der Vergleich der morphometrischen Parameter mit biochemischen, klinischen und tumor-spezifischen Messwerten im Sinne einer Einteilung in ZG- und ZF-ähnliche Tumoren zu kurz zu greifen, da teilweise widersprüchliche Ergebnisse auftauchen. Auch in der bestehenden Literatur wird wenig auf eine Assoziation von diesen Messwerten mit der Morphologie der Adenome eingegangen. Insofern lässt sich sagen, dass durchaus ein Zusammenhang zwischen der Bildanalyse der Morphologie und dem klinischen und biochemischen Profil des Patienten besteht, wie durch die gefundenen Korrelationen unterlegt, dieses jedoch nicht unbedingt ein für einen Betrachter zugängliches optisches Korrelat hat. Monticone et al. untersuchten in ihrer Arbeit ebenfalls ZG- und ZF-Tumore nach ihren Unterschieden in der klinischen und biochemischen Präsentation der Patienten und fanden keine im Alter, im Blutdruck, im Serumkaliumwert, in der Aldosteron- und Reninmessung sowie im ARQ, in der Tumorgöße oder im Lateralisationsindex (94).

Keiner der morphometrischen Parameter korrelierte mit dem klinischen oder biochemischen Outcome. Zusammen mit der ebenfalls in dieser Studie beschriebenen fehlenden Relevanz des Genotyps für den Therapieerfolg, könnte dies darauf hindeuten, dass der Genotyp zwar die Morphologie des Tumors bestimmt, andere Faktoren jedoch relevanter für den Therapieerfolg sind.

## 4.3 CYP11B1-Expression

### 4.3.1 Geschlechts- und Genotypverteilung

In der vorliegenden Kohorte hatten Frauen eine niedrigere durchschnittliche Intensität der *CYP11B1*-Färbung als Männer. Sie hatten einen größeren Anteil der niedrigen Intensitätskategorie an der gesamten Färbung und jeweils einen kleineren Anteil der mittleren und höheren Kategorie. Auch die Genotypen wiesen ein solches Bild auf: *KCNJ5*-APAs hatten eine niedrigere durchschnittliche Intensität der *CYP11B1*-Färbung, einen größeren Anteil an der niedrigen Markierungskategorie und jeweils einen kleineren Anteil an der mittleren und höheren Markierungskategorie als *ATP1A1*-, *CACNA1D*-, Wildtyp- und nicht-rekurrent mutierte Tumore. Hier liegt die Vermutung nahe, dass dies wiederum durch die Assoziation des weiblichen Geschlechts mit der *KCNJ5*-Mutation bedingt ist.

---

Monticone et al. fanden heraus, dass weibliche Patienten mit *KCNJ5*-Mutation öfter APAs mit höherer *CYP11B1*-Expression hatten (94). Dies scheint den in unserer Kohorte gefundenen Resultaten jedoch zu widersprechen. Auch, dass *CYP11B1* physiologisch in der normalen ZF, der *KCNJ5*-APAs laut Literatur ähneln, vorkommt, scheint unseren Resultaten zu widersprechen (7, 8). In der vorliegenden Studie wird jedoch nicht wie in der Arbeit von Monticone et al. die bloße Anwesenheit einer *CYP11B1*-Färbung registriert, sondern deren Intensität und die Anteile ihrer kategorialen Einteilung an der gesamten Färbefläche gemessen. Auch Fernandes-Rosa et al. fanden keine Assoziation der *CYP11B1*-mRNA-Expression mit dem Mutationsstatus (44). Es ist jedoch schwierig, hieraus einen direkten Vergleich mit unserer Kohorte zu ziehen, da dies voraussetzen würde, dass die mRNA-Expression mit dem proteinischen Expressionsmuster von *CYP11B1* gleichgesetzt werden kann. Unsere Resultate scheinen sich also in die unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur einzureihen.

#### 4.3.2 *Biochemische, klinische, Tumor-spezifische Messwerte und Therapieerfolg*

In der Kohorte dieser Arbeit korrelierte die durchschnittliche Intensität der *CYP11B1*-Färbung positiv mit dem prä- und postoperativen BMI und der postoperativ benötigten antihypertensiven Medikation. Je stärker die Markierung ausgeprägt war, desto höher war der BMI der betroffenen Patienten und desto mehr Medikamente zur Blutdruckregulierung wurden postoperativ benötigt. Es war ebenfalls auffällig, dass ein kompletter Therapieerfolg mit einer niedrigeren Intensität der Färbung und einer geringeren Färbefläche im Vergleich zum partiellen und ausbleibenden Therapieerfolg einherging. Die Intensität der *CYP11B1*-Markierung war ebenfalls niedriger bei Patienten mit partiellem als bei Patienten mit ausbleibendem Therapieerfolg.

In der Arbeit von Arlt et al., in der ein Teil der Patienten unserer Studie mitsamt ihrer digitalen Analyse der immunhistochemischen Expression eingeschlossen war, konnte eine Assoziation der *CYP11B1*-Expression bei APAs mit der Exkretion von Glucocorticoiden und dem Metaboliten 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron festgestellt werden. Dies wurde als Hinweis auf das „Connshing-Syndrom“, einem Syndrom der Co-Sekretion von Aldosteron und Cortisol, gewertet. Diese zusätzliche Ausscheidung von Glucocorticoiden würde eine pathophysiologische Erklärung bieten für einige vorher beschriebene Comorbiditäten, für die die Wirkungen von Aldosteron keinen zufriedenstellenden Pathomechanismus bieten (101). So konnten bei PA-Patienten Insulinresistenz, ein erhöhtes Risiko osteoporotischer Knochenbrüche und häufigere Depressionen als relevante Comorbiditäten erkannt werden

---

(31, 102, 103, 104). Auch der in unserer Arbeit festgestellte höhere BMI und höhere Bedarf an Blutdrucksenkern nach der OP würden zu einem Glucocorticoid-bedingten metabolischen Syndrom passen. Dieses könnte auch einen Erklärungsansatz für das schlechtere Outcome bei hoher *CYP11B1*-Expression liefern.

Die ebenfalls festgestellte negative Korrelation der *CYP11B1*-Expressionsintensität mit der Tumorgröße könnte bedingt sein durch die Assoziation von *KCNJ5*-Tumoren mit einem größeren Durchmesser.

#### 4.4 CYP11B2-Expression

Es fielen in unserer Kohorte keine signifikanten Zusammenhänge der *CYP11B2*-Expression in den APAs mit der Geschlechtsverteilung und dem therapeutischen Erfolg auf. Zwischen den Genotypen unterschieden sich die Tumoren jedoch nach dem immunhistochemischen Expressionsmuster. *KCNJ5*-Tumore waren eher wenig reaktiv auf die immunhistochemische Färbung gegen *CYP11B2*. So hatten APAs mit Mutation in *KCNJ5* eine signifikant geringere durchschnittliche Intensität als *ATP1A1*-Tumore. Noch auffälliger war jedoch, dass der Anteil der niedrigen Markierungsklasse zur ROI-Tumorfläche bei *KCNJ5*-Tumoren signifikant höher war als bei allen anderen Genotypen bis auf die nicht-rekurrenten Mutationen.

Tan et al. berichten über ein sehr ähnliches Expressionsmuster. So wurde in dieser Arbeit, anders als in unserer, das Scoring der immunhistochemischen Expression nicht digital durchgeführt, sondern optisch durch einen Histopathologen mit einer Bewertung der Intensität von 0 bis 100 %. Die Autoren beschrieben, dass *KCNJ5*-APAs weniger *CYP11B2*-Expression aufwiesen als *ATP1A1*- und *CACNA1D*-mutierte Tumore. Noch prägnanter war dieser Unterschied wohl in der *CYP17*-Färbung, die in unserer Arbeit nicht einging. Weiterhin wiesen bei Tan et al. die *KCNJ5*-APAs einen ZF-ähnlichen Phänotyp auf, während *ATP1A1*- und *CACNA1D*-Tumore einen ZG-ähnlichen Aspekt hatten (100).

Die in unserer Arbeit gefundenen Korrelationen des Anteils der IHC- zur ROI-Fläche würden auch in diesen Kontext passen: Je mehr Fläche gefärbt war, desto niedriger war der BMI und desto größer war der Tumor. *KCNJ5*-Tumore haben, wie in Kapitel 4.1.6 beschrieben, einen größeren Durchmesser. Da Patienten mit *KCNJ5*-mutiertem Tumor öfter weiblich sind, und diese einen im Median niedrigeren BMI haben als Männer, ist auch der niedrigere BMI zu erklären. Auch die von Monticone et al. und Ono et al. gefundene Assoziation von hoher *CYP11B2*-Expressionsintensität zu kleiner Tumorgröße würde in diesen Kontext passen (94, 105).

---

Die positive Korrelation zwischen der durchschnittlichen Intensität der *CYP11B2*-Expression, welche für die Aldosteron-Synthase codiert und der präoperativen PAC erscheint mindestens pathophysiologisch sinnvoll. Monticone et al. wiesen in ihrer Arbeit darauf hin, dass die Expression von *CYP11B2* mit der Aldosteronsekretion korreliert, wenn eine Korrektur für die Tumorgroße durchgeführt wird (94).

## 4.5 Interaktionen der Bildanalyse

In der Literatur ist vorbeschrieben, dass ZG-APAs mehr *CYP11B2* exprimieren. Die *CYP17*-Expression gilt als Marker für ZF-ähnliche Zellen. *CYP11B1* und *CYP17* sind beide in der ZF der gesunden Nebenniere ausgedrückt. Es ist eine starke Korrelation der *CYP17*-Expression mit der *CYP11B1*-Expression vorbeschrieben, so dass die in unserer Kohorte gefundenen zahlreichen negativen Korrelationen der Parameter der *CYP11B1*- und *CYP11B2*-Expression diese Bipolarität ausdrücken könnten (8, 94, 100, 106). Gleichzeitig fanden wir jedoch, dass die durchschnittliche Intensität der Expression der beiden IHC-Färbungen keine Beziehung zueinander hatte. Auch war interessant, dass die Verhältnisse der jeweiligen immunhistochemischen Färbeflächen zur ROI-Tumorfläche eine positive Korrelation untereinander aufwiesen. Wenn also ein größerer Anteil des Tumors positiv für die eine Färbung war, war er es ebenfalls für die andere.

Die durchschnittlichen Intensitäten der *CYP11B1*- und *CYP11B2*-Expression sowie die Ratio der gefärbten *CYP11B2*-Fläche zur Tumor-ROI-Fläche korrelierten mit wesentlich mehr morphometrischen Parametern als die Ratio der *CYP11B1*-Färbefläche zur ROI.

Wie bereits in den vorangehenden Kapiteln dieser Arbeit beschrieben, ist es schwierig, eine direkte Konkordanz der morphometrischen Parameter zur klassischen ZG- und ZF-ähnlichen Deskription von APAs herzustellen. Trotzdem kann aufgrund der zahlreichen Korrelationen von einem Zusammenhang der Expressionen von *CYP11B1* und *CYP11B2* mit der Morphometrie der Zellen ausgegangen werden.

## 4.6 Stärken und Schwächen dieser Studie

### 4.6.1 Stärken und Schwächen in Bezug auf die Arbeit mit einem Tissue-Microarray

Tissue-Microarrays sind eine gut etablierte Methode zur Charakterisierung von Tumoren, die einen hohen Durchsatz an Untersuchungen mit wenig Gewebematerial erlauben (66). Es wurde durch einen qualifizierten Facharzt für Pathologie sichergestellt, dass die ausgewählten

---

Stanzen, die für den TMA benutzt wurden, repräsentativ für den untersuchten Tumor waren. Trotzdem besteht eine Schwierigkeit darin, dass eine Heterogenität der Zellmorphologie möglicherweise nur unzureichend durch die 3 Proben von 1 mm Durchmesser abgebildet ist. Die Selektion wurde auf Basis eines HE-Schnitts und ohne Färbung der Aldosteron-Synthase getroffen, so dass weiterhin die Möglichkeit besteht, dass ein Areal, das besonders stark an der autonomen Aldosteronausschüttung beteiligt war, übersehen wurde. Gleichzeitig können jedoch auch nur Areale ohne Expression eingeschlossen werden. Dieses Risiko besteht vor allem bei der *CYP11B1*-Färbung, die in einigen Arbeiten nicht quantifiziert wird, sondern deren Anwesenheit im Tumorgewebe nur bestätigt oder ausgeschlossen wird (61, 94).

Weiterhin kann mit den Informationen die dieser Arbeit zugrundeliegen nicht garantiert werden, dass der untersuchte Tumor die einzige Quelle der erhöhten Aldosteronsekretion der entfernten Nebenniere war. So besteht die Möglichkeit, dass zusätzlich zum makro- und mikroskopisch auffälligen Tumor Aldosteron-produzierende Zellcluster (APCC, englisch *Aldosterone-producing cell clusters*) außerhalb von jenem bestehen. Mit dem TMA würden diese übersehen werden. APCC sind *CYP11B2*-exprimierende Zellnester, die sowohl in Nebennieren mit APA als auch in physiologischen Nebennierenrinden nachgewiesen wurden, und womöglich eine zusätzliche Quelle autonomer Aldosteronproduktion präsentieren (107, 108). Weiterhin werden sie als Vorstufe von APAs vorgeschlagen, was impliziert, dass trotz eines bereits bestehenden APAs weitere in der gleichen Nebenniere entstehen können, was zu einem multinodulären Bild führen könnte. Multinoduläre Nebennierenpräparate wurden in der vorliegenden Studie nicht verwendet, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eines der vorliegenden mononodulären Präparate sich bei längerem Verbleib im Körper zu einem solchen entwickelt hätte. Der spekulative Charakter dieser Überlegung schränkt ihre Relevanz für die vorliegende Studie jedoch ein.

#### 4.6.2 Stärken und Schwächen der digitalen Bildanalyse

Die digitale Bildanalyse hat ihren Vorteil gegenüber der klassischen optischen Bewertung von Morphologie und IHC-Expression darin, dass die Intra- und Interobserver-Variabilität stark verringert wird (109, 110). Feuchtinger et al. konnten mit der auch in dieser Arbeit verwendeten Software eine Überlegenheit der digitalen IHC-Bildanalyse gegenüber einem visuellen Scoring-System in Bezug auf das Überleben bei Patienten mit Adenokarzinom der Speiseröhre beweisen (64).

Die morphometrische Analyse der HE-Schnitte erlaubt durch interaktives Training der Software eine Feststellung von Parametern unabhängig von einem visuellen Korrelat. Die dadurch

---

vermiedene Subjektivität in der Einordnung von Präparaten in Klassen wie ZG- und ZF-ähnliche Tumore und Zellen vereinfacht zwar die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, stellt in unserem Fall jedoch einen angestrebten Vergleich mit der bestehenden Literatur vor Probleme (63). Es wurde versucht, eine Selektion der signifikanten Parameter so zu treffen, dass ein Vergleich möglich ist, dies war jedoch nur teilweise und nicht zufriedenstellend möglich.

Dennoch können die aktuellen Ergebnisse vor allem durch ihre Reproduzierbarkeit einen Wert haben. Es konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass insbesondere die verschiedenen Genotypen unterschiedliche Aspekte in ihrer Morphologie aufweisen. Mit Hilfe der Morphometrie könnte somit eine neue Ebene im Verständnis von APAs eröffnet werden.

#### *4.6.3 Stärken und Schwächen der verwendeten Studienkohorte*

Die in dieser Arbeit verwendete Kohorte weist mit insgesamt 135 Patienten eine sehr gute Größe auf im Vergleich zu anderen nicht-multizentrischen Studien aus der Literatur. Auch, dass bei 131 von diesen Patienten der Genotyp, bei 126 das biochemische Outcome und bei 120 der klinische Therapieerfolg bestimmt werden konnte, zeigt, dass die Datenerhebung relativ vollständig war. Das Eruiieren einzelner biochemischer und klinischer Messwerte war, besonders beim LNSC und UC mit nur 61 beziehungsweise 43 registrierten Messwerten, weniger erfolgreich. Dies spiegelt das Fehlen des derzeit noch nicht etablierten, jedoch beispielsweise von Arlt et al. im Rahmen des „Connshing-Syndrom“ vorgeschlagenen zusätzlichen Screening von PA-Patienten auf Hypercortisolismus im derzeitigen Diagnoseschema von PA (101). Diese Limitation schränkt vor die Aussagekraft der Korrelationen der Morphometrie mit Parametern der Cortisol-Sekretion, durch die separate Betrachtung vieler Aspekte in dieser Studie sind andere Bereiche jedoch nicht dadurch betroffen.

## **4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick**

### *4.7.1 Charakterisierung von APAs*

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Charakterisierung einer Kohorte von APA-Patienten bezüglich ihrer klinischen und biochemischen Präsentation und der morphologischen und immunhistochemischen Aspekte der Tumore anhand eines TMA durchgeführt.

Unsere Ergebnisse stützen die vorherrschende Sichtweise, dass Frauen in Europa häufiger große APAs mit *KCNJ5*-Mutation aufweisen, diese jünger sind und ein besseres Outcome



---

aufweisen. Männer hingegen tragen häufiger APAs mit *CACNA1D*-, ATPasen-, und Wildtyp-Mutationen, sind eher älter und weisen ein schlechteres Outcome auf (111). Die vorbeschriebene Tendenz von *KCNJ5*-Tumoren zu einer ZF-Morphologie und *Wildtyp*-, *ATP1A1*- und *CACNA1D*-APAs zu einer ZG-Morphologie konnte zwar z.B. mit der unterschiedlichen Helligkeit und der unterschiedlichen Zellkernvariabilität nur teilweise auf einer optisch korrelierenden Ebene dargestellt werden. Die Morphometrie erlaubt jedoch auf einer bildanalytischen Ebene eine klare Aussage dazu, dass der Genotyp eine Auswirkung auf das mikroskopische Aussehen des Tumors hat. Besonders klar wird in unserer Analyse der morphologische Unterschied von *KCNJ5*-APAs zu den meisten anderen Genotypen. Ein weiterer interessanter Aspekt unserer Studie ist, dass die Morphometrie und auch der Genotyp keinen signifikanten Einfluss auf den Therapieerfolg hatten. Dies scheint zumindest im Hinblick auf das vorbeschriebene bessere Outcome von *KCNJ5*-APAs erstaunlich und wird in Kapitel 4.7.2 weiter aufbereitet.

Genauere Pathomechanismen können mit dem Design der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden, sondern es können nur Aspekte dargestellt werden, die mögliche Ausgangspunkte zur weiteren Ursachenforschung darstellen.

Eine kürzlich erschienene Studie von Yamazaki et al. verwendete eine digitale Bildanalysetechnik mit einer anderen Methodik als die von uns benutzte sowie zusätzlich transmissionselektronenmikroskopischen Bildern als Basis der Analyse. Die Autoren konnten feststellen, dass *KCNJ5*-APAs im Vergleich zu Wildtyp-Adenomen mehr klarzellige Tumorzellen mit vielen Lipidtropfen aufwiesen, die Vorgängermoleküle des Aldosterons enthalten könnten. Die Autoren konnten auch eine Aktivität der teilweise als ruhend beschriebenen klaren Zellen durch *CYP11B2* belegen und wiesen darauf hin, dass diese im Vergleich zu Wildtyp-APAs mehr kleine Mitochondrien mit ausgeprägteren Cristae aufweisen, was auf eine höhere biologische Aktivität in Bezug auf die Aldosteron-Biosynthese hindeuten kann (112). Wenn dies zu höheren Aldosteronwerten im Serum führt, kann dies einen Erklärungsansatz für die frühere und häufigere Detektion von *KCNJ5*-APAs mit entsprechend besserem Therapieerfolg nach Adrenalectomie liefern.

#### 4.7.2 Die *CYP11B1*-Expression im Kontext des „Connshing-Syndroms“

Die frühere Betrachtungsweise, dass Aldosteron- und Cortisol-produzierende Tumore separate Entitäten darstellen und eine Co-Sekretion der beiden Hormone ein seltenes Phänomen ist wird zunehmend revidiert (113, 114). Auch, dass die Expression der zonendefinierenden Hormone *CYP11B1* und *CYP11B2* in einer Zelle sich gegenseitig ausschließt ist widerlegt.

---

Dadurch liegt der Fokus der aktuellen Forschung eher darauf, dass zwischen dem Cortisol-sekretierenden Cushing-Adenom und dem Aldosteron-sekretierenden Conn-Adenom ein Spektrum besteht, innerhalb dessen Tumore unterschiedliche Mengen der beiden Hormone sezernieren (61, 101). Hieraus ergibt sich, dass eine weitere Charakterisierung von Nebennierentumoren notwendig ist.

Neben der zahlreich vorbeschriebenen schädlichen Wirkung von Aldosteron auf das Herzkreislaufsystem muss somit auch untersucht werden, inwiefern diese Glucocorticoid-bedingt sind. So konnten Arlt et al. nachweisen, dass PA-Patienten eine erhöhte Glucocorticoid-Ausschüttung hatten, die mindestens genau so hoch waren wie bei Patienten mit subklinischem Cushing-Syndrom, für die Cortisol-bedingte kardiovaskuläre und metabolische Folgeschäden nachgewiesen sind (101, 115, 116).

In Bezug auf das Outcome wiesen Williams et al. darauf hin, dass eine längere Exposition mit Aldosteron zur Gefäßschädigung führt. Diese Schädigung besteht auch nach der Adrenalektomie weiter und bedingt ein schlechteres Outcome bei Patienten mit einer längeren Dauer des endokrinen Bluthochdrucks (38). Eine Parallele kann hier zu der Wirkung von Glucocorticoiden gezogen werden: Ein hierdurch bedingtes metabolisches Syndrom mit seinen Folgeschäden wird nicht unmittelbar durch die Adrenalektomie behoben. Auch die von uns gefundene Korrelation des prä- und postoperativen BMI und der postoperativen antihypertensiven Medikation mit der *CYP11B1*-Expression können in diesem Kontext verstanden werden.

Wir fanden eine stärkere Expression von *CYP11B1* bei Patienten mit ausbleibendem oder nur partiellem klinischen Therapieerfolg und keine Relevanz des Genotyps *KCNJ5* auf das klinische Outcome. Gleichzeitig wiesen Patienten mit *KCNJ5*-Mutation eine schwächere *CYP11B1*-Expression auf. Dies wirft die Frage auf, ob das oftmals beschriebene bessere Outcome von operierten *KCNJ5*-Tumoren nicht auch auf einer geringeren gefäßschädigenden Wirkung von Glucocorticoiden basiert. Dieser Ansatz konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter gestärkt werden und sollte in der Zukunft weitergehender untersucht werden.

#### 4.7.3 Implikationen auf die Subtyp-Differenzierung bei PA-Patienten

Die Veränderung des Krankheitsverständnisses hin zu einem Spektrum zwischen einem Hyperaldosteronismus und einem Hypercortisolismus impliziert weiterhin die Notwendigkeit einer Reevaluierung der Katheterisierung der Nebennierenvenen zur Bestimmung des Lateralisationsindex als Goldstandard. Tumore, die eine Co-Sekretion von Cortisol und Aldosteron aufweisen, haben ein höheres Risiko, wegen eines durch höhere

Cortisolmessungen niedrigeren Lateralisationsindex übersehen zu werden. Der Nebennierenkatheter als Goldstandard wurde auch bereits in letzter Zeit durch verbesserte Bildgebung in Frage gestellt. Auch der invasive Charakter des AVS mit Verletzungsrisiko und der durch die Erfahrung und Können des Untersuchers bestimmten Aussagekraft des Ergebnisses mit fehlender Standardisierung nähren die Zweifel an seinem Status als Goldstandard der Differenzierung zwischen uni- und bilateralen Formen des PA (117). Alleinige CT-Bildgebung als ausreichende alternative Diagnosemethode wird diskutiert, hier unterscheidet sich jedoch die Interpretation vorliegender Ergebnisse (118, 119, 120). So fanden Dekkers et al. nur insignifikante Unterschiede zwischen durch CT und AVS diagnostizierte PA-Patienten in Bezug auf das biochemische Outcome und die gesundheitsbezogene Lebensqualität in einer prospektiven Kohorte und schlossen, dass der Goldstandard-Status des AVS nicht berechtigt ist. Trotzdem räumten die Autoren ein, dass wegen der geringen Anzahl an eingeschlossenen Patienten nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese Unterschiede in größeren Kohorten signifikant wären (118). Williams et al. wiederum fanden in einer größeren retrospektiven Kohorte ein besseres biochemisches, nicht jedoch klinisches Outcome nach PASO-Kriterien der mit AVS diagnostizierten gegenüber mit CT diagnostizierten PA-Patienten. Dieser Unterschied war jedoch nicht in einer Subkohorte zu sehen, in der nur Patienten, die jünger als 35 Jahre waren, eingeschlossen waren, so dass Williams et al. eine rein CT-basierte Subtyppdifferenzierung nur bei jungen PA-Patienten mit klarem Phänotyp empfehlen (120).

Zahlreiche alternative Möglichkeiten der Subtyppdifferenzierung wurden vorgeschlagen und werden derzeit untersucht. Darunter sind bildgeberische Innovationen wie funktionelles PET/CT-Scanning mit Tracern, die an spezifische Strukturen, wie CYP11B2, <sup>11</sup>C-Metomidat oder CXCR4, ein Chemokinrezeptor der häufig in APAs vorkommt und eine hohe Korrelation mit der Expression von CYP11B2 aufweist, binden (121, 122, 123). Auch die Erstellung eines Steroidprofils aus peripher-venösem Blut wird als Alternative vorgeschlagen (124, 125). Besonders hier ist die Wichtigkeit der Co-Exkretion von Cortisol und Aldosteron und ihren Derivaten nicht zu unterschätzen.

Diese Methoden könnten eine nicht-invasive und Untersucher-unabhängige Bestimmung der Differenzierung von APA und BAH bei PA-Patienten ermöglichen und unterlegen die Wichtigkeit eines tieferen Verständnisses der Funktionalität von Nebennierentumoren, die nicht zuletzt mit histomorphologischen Ergebnissen korreliert.

---

## 5 Zusammenfassung

Der Primäre Hyperaldosteronismus (PA) ist eine der häufigsten Ursachen für einen sekundären Bluthochdruck und betrifft bis zu 20 % aller Patienten mit therapieresistenter Hypertonie. Die häufigsten dem PA zugrunde liegenden Ursachen sind die bilaterale adrenale Hyperplasie und das unilaterale Aldosteron-produzierende Adenom (APA) der Nebennierenrinde. Bei der Mehrzahl der APAs konnten somatische Mutationen in unterschiedlichen Genen (*KCNJ5*, *CACNA1D*, *ATP1A1*, *ATP2B3*, *CTNNB1*, *PRKACA*) nachgewiesen werden, die einen Einfluss auf die autonome Aldosteronproduktion oder die Tumorigenese haben. Bei diesen Genotypen konnten Korrelationen mit klinischen, biochemischen und Tumor-spezifischen Parametern nachgewiesen werden. Auch wurde eine histopathologische Genotyp-Phänotyp-Korrelation mit einer Tendenz von *KCNJ5*-Tumoren zu einem Zona-fasciculata-ähnlichen Aspekt und *CACNA1D*-, *ATP1A1*- und *ATP2B3*-APAs zu einem Zona-glomerulosa-ähnlichen Aussehen beschrieben. Nicht alle Patienten erreichen nach einer Adrenalektomie eine komplette Normalisierung der Hypertonie und der laborchemischen Werte, was die Identifizierung prädiktiver Parameter erstrebenswert macht.

Einhundertfünfunddreißig Patienten aus München und Würzburg, bei denen ein APA diagnostiziert wurde, die zwischen 2006 und 2015 einer unilateralen Adrenalektomie unterzogen wurden, wurden in die aktuelle Kohorte eingeschlossen. Das resezierte Nebennierengewebe wurde gesammelt und durch direkte Sequenzierung oder Whole Exome Sequencing genotypisiert. Das Tumorgewebe wurde durch einen Pathologen identifiziert und zur Etablierung eines Tissue Microarray (TMA) benutzt. Die Schnitte des TMA wurden auf Objektträger übertragen und mittels HE- und immunhistochemischer Färbung von *CYP11B1* und *CYP11B2* gefärbt. Die Objektträger wurden daraufhin gescannt und in das Bildanalyseprogramm Definiens Developer XD2 geladen. Einhundertachtzig morphometrische Parameter wurden analysiert, die Form, Farbe, Textur und Verhältnis zueinander von Zellkern und Zytoplasma beschreiben. In den immunhistochemischen Serien wurden Grenzwerte festgelegt, welche die Intensität der Antikörperfärbung in vier Stufen einteilen, die eine quantitative Bewertung der Immunoexpression von *CYP11B1* und *CYP11B2* ermöglichte.

Die Resultate dieser Bildanalyse sollten mit dem genetischen Expressionsmuster der Tumoren, den prospektiv erhobenen klinischen, biochemischen und Tumor-spezifischen Daten der Patienten sowie dem biochemischen und klinischen Outcome der Adrenalektomie korreliert werden.

---

Wir konnten in unserer Studienkohorte die vorbeschriebenen Häufigkeiten der Geschlechterverteilungen, Genotypen und des postoperativen Outcomes weitestgehend bestätigen. Auch die gefundenen Korrelationen der biochemischen, klinischen und Tumorspezifischen Messwerte mit den Geschlechtern, den Genotypen und dem Therapieerfolg passten in den bestehenden Rahmen des Krankheitsverständnisses. Zahlreiche morphometrische Parameter wiesen Korrelationen mit dem Genotyp, nicht jedoch mit dem Therapieerfolg auf. So unterschieden sich vor allem *KCNJ5*-APAs von APAs mit anderen Mutationen. Auch die *CYP11B2*-Expression korrelierte mit dem Genotyp, nicht jedoch mit dem Outcome. Die *CYP11B1*-Expression hingegen wies sowohl mit dem Genotyp als auch mit dem klinischen Therapieerfolg Assoziationen auf. So wiesen Patienten mit *KCNJ5*-APA eher wenig *CYP11B1*-Expression auf und eine stark ausgeprägte IHC-Färbung von *CYP11B1* war mit einem schlechteren klinischen therapeutischen Erfolg assoziiert.

Aus der vorliegenden Studie kann geschlossen werden, dass bei APA eine Genotyp-Phänotyp-Assoziation besteht, diese jedoch womöglich nicht die determinierende Ursache für einen ausbleibenden oder nur teilweise erreichten klinischen Therapieerfolg ist. Die hier gefundene Assoziation der *CYP11B1*-Expression mit dem klinischen Outcome und die zusätzlich zur bereits bestehenden Aldosteron-bedingten gefäßschädigende Wirkung von Cortisol im Rahmen des "Connshing-Syndroms" können eine Perspektive bilden für zukünftige Ursachenanalysen ausbleibenden Therapieerfolgs nach Adrenalektomie bei APAs.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Schulte E. Nebenniere (Glandula suprarenalis). *Duale Reihe Anatomie* (2. Auflage). Aumüller G, Aust G, Doll A (Hrsg.) S. 711-714. Stuttgart: Thieme (Verlag)
2. Welsch U. *Lehrbuch Histologie. 3. Aufl.* München: Elsevier, Urban & Fischer.
3. Gomez-Sanchez CE, Gomez-Sanchez PE. Immunohistochemistry of the adrenal in primary aldosteronism. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2016 Jun;**23**(3):242-8.
4. Neville AM, O'Hare MJ. Histopathology of the human adrenal cortex. *Clin Endocrinol Metab.* 1985 Nov;**14**(4):791-820.
5. Miller WL, Auchus RJ. The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocr Rev.* 2011 Feb;**32**(1):81-151.
6. Deutzmann R. Hormone der Nebennierenrinde. Rassow J, Hauser K, Netzker R et al., Hrsg. *Duale Reihe Biochemie. 4. Auflage.* Stuttgart: Thieme; 2016.
7. Doi M, Satoh F, Maekawa T, Nakamura Y, Fustin JM, Tainaka M, Hotta Y, Takahashi Y, Morimoto R, Takase K, Ito S, Sasano H, Okamura H. Isoform-Specific Monoclonal Antibodies against 3  $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/Isomerase Family Provide Markers for Subclassification of Human Primary Aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Feb;**99**(2):E257-62.
8. Gomez-Sanchez CE, Qi X, Velarde-Miranda C, Plonczynski MW, Parker CR, Rainey W, Satoh F, Maekawa T, Nakamura Y, Sasano H, Gomez-Sanchez EP. Development of monoclonal antibodies against human CYP11B1 and CYP11B2. *Mol Cell Endocrinol.* 2014 Mar 5;**383**(1-2):111-7.
9. Tanabe A, Naruse M, Arai K, Naruse K, Yoshimoto T, Seki T, Imaki T, Kobayashi M, Miyazaki H, Demura H. Angiotensin II stimulates both aldosterone secretion and DNA synthesis via type 1 but not type 2 receptors in bovine adrenocortical cells. *J Endocrinol Invest.* 1998 Nov;**21**(10):668-72.
10. Gallo-Payet N. 60 YEARS OF POMC: Adrenal and extra-adrenal functions of ACTH. *J Mol Endocrinol.* 2016 May;**56**(4):T135-56.
11. Paschke R, Voigt K. Endokrines System. Klinker R, Pape H, Kurtz A et al., Hrsg. *Physiologie. 6. Auflage.* Thieme; 2010.
12. Rossier BC, Staub O, Hummler E. Genetic dissection of sodium and potassium transport along the aldosterone-sensitive distal nephron: importance in the control of blood pressure and hypertension. *FEBS Lett.* 2013 Jun 27;**587**(13):1929-41.
13. Garty H, Palmer LG. Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev.* 1997 Apr;**77**(2):359-96.
14. Share L, Crofton JT. Contribution of vasopressin to hypertension. *Hypertension.* 1982 Sep-Oct;**4**(5 Pt 2):III85-92.
15. Messaoudi S, Zhang AD, Griol-Charhbil V, Escoubet B, Sadoshima J, Farman N, Jaisser F. The epidermal growth factor receptor is involved in angiotensin II but not aldosterone/salt-induced cardiac remodelling. *PLoS One.* 2012;**7**(1):e30156.
16. Schmidt RF, Lang F und Heckmann M, Hrsg. *Physiologie Des Menschen.* Springer Berlin Heidelberg.
17. Dutta RK, Söderkvist P, Gimm O. Genetics of primary hyperaldosteronism. *Endocr Relat Cancer.* 2016 Oct;**23**(10):R437-54.
18. Conn JW. Presidential Address. I. Painting Background. II. Primary Aldosteronism, a New Clinical Syndrome. *J Lab Clin Med.* 1955 Jan;**45**(1):3-17.
19. Kaplan, NM. Hypokalemia in the Hypertensive Patient, with Observations on the Incidence of Primary Aldosteronism. *Ann Intern Med.* 1967 Jun;**66**(6):1079-90.
20. Käyser SC, Dekkers T, Groenewoud HJ, van der Wilt GJ, Carel Bakx J, van der Wel MC, Hermus AR, Lenders JW, Deinum J. Study Heterogeneity and Estimation of Prevalence

- of Primary Aldosteronism: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Jul;**101**(7):2826-35.
21. Hannemann A, Bidlingmaier M, Friedrich N, Manolopoulou J, Spyroglou A, Völzke H, Beuschlein F, Seissler J, Rettig R, Felix SB, Biffar R, Döring A, Meisinger C, Peters A, Wichmann HE, Nauck M, Wallaschofski H, Reincke M. Screening for primary aldosteronism in hypertensive subjects: results from two German epidemiological studies. *Eur J Endocrinol.* 2012 Jul;**167**(1):7-15.
  22. Rossi GP, Bernini G, Caliumi C, Desideri G, Fabris B, Ferri C, Ganzaroli C, Giacchetti G, Letizia C, Maccario M, Mallamaci F, Mannelli M, Mattarello MJ, Moretti A, Palumbo G, Parenti G, Porteri E, Semplicini A, Rizzoni D, Rossi E, Boscaro M, Pessina AC, Mantero F; PAPY Study Investigators. A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Dec 5;**48**(11):2293-300.
  23. Azizan EAB, Brown MJ. Novel genetic determinants of adrenal aldosterone regulation. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2016 Jun;**23**(3):209-17.
  24. Mulatero P, Tizzani D, Viola A, Bertello C, Monticone S, Mengozzi G, Schiavone D, Williams TA, Einaudi S, La Grotta A, Rabbia F, Veglio F. Prevalence and characteristics of familial hyperaldosteronism: the PATOGEN study (Primary Aldosteronism in TORINO-GENetic forms). *Hypertension.* 2011 Nov;**58**(5):797-803.
  25. Schirpenbach C, Reincke M. Primary aldosteronism: current knowledge and controversies in Conn's syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007 Mar;**3**(3):220-7.
  26. Conn JW, Louis LH. Primary aldosteronism, a new clinical entity. *Ann Intern Med.* 1956 Jan;**44**(1):1-15
  27. SPRINT Research Group, Wright JT Jr, Williamson JD, Whelton PK, Snyder JK, Sink KM, Rocco MV, Reboussin DM, Rahman M, Oparil S, Lewis CE, Kimmel PL, Johnson KC, Goff DC Jr, Fine LJ, Cutler JA, Cushman WC, Cheung AK, Ambrosius WT. A Randomized Trial of Intensive versus Standard Blood-Pressure Control. *N Engl J Med.* 2015 Nov 26;**373**(22):2103-16.
  28. Milliez P, Girerd X, Plouin PF, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol.* 2005 Apr 19;**45**(8):1243-8.
  29. Hanslik G, Wallaschofski H, Dietz A, Riester A, Reincke M, Allolio B, Lang K, Quack I, Rump LC, Willenberg HS, Beuschlein F, Quinkler M, Hannemann A; participants of the German Conn's Registry. Increased prevalence of diabetes mellitus and the metabolic syndrome in patients with primary aldosteronism of the German Conn's Registry. *Eur J Endocrinol.* 2015 Nov;**173**(5):665-75.
  30. Salcuni AS, Palmieri S, Carnevale V, Morelli V, Battista C, Guarnieri V, Guglielmi G, Desina G, Eller-Vainicher C, Beck-Peccoz P, Scillitani A, Chiodini I. Bone involvement in aldosteronism. *J Bone Miner Res.* 2012 Oct;**27**(10):2217-22.
  31. Sonino N, Tomba E, Genesio ML, Bertello C, Mulatero P, Veglio F, Fava GA, Fallo F. Psychological assessment of primary aldosteronism: a controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Jun;**96**(6):E878-83.
  32. Funder JW, Carey RM, Mantero F, Murad MH, Reincke M, Shibata H, Stowasser M, Young WF Jr. The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 May;**101**(5):1889-916.
  33. Young WF, Stanson AW, Thompson GB, Grant CS, Farley DR, van Heerden JA. Role for adrenal venous sampling in primary aldosteronism. *Surgery.* 2004 Dec;**136**(6):1227-35.
  34. Jeunemaitre X, Chatellier G, Kreft-Jais C, Charru A, DeVries C, Plouin PF, Corvol P, Menard J. Efficacy and tolerance of spironolactone in essential hypertension. *Am J Cardiol.* 1987 Oct 1;**60**(10):820-5.

35. Potthoff SA, Beuschlein F, Vonend O. Primärer Hyperaldosteronismus – Diagnostik und Therapie. *Dtsch Med Wochenschr.* 2012 Nov;**137**(48):2480-4.
36. Fischer E, Hanslik G, Pallauf A, Degenhart C, Linsenmaier U, Beuschlein F, Bidlingmaier M, Mussack T, Ladurner R, Hallfeldt K, Quinkler M, Reincke M. Prolonged zona glomerulosa insufficiency causing hyperkalemia in primary aldosteronism after adrenalectomy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Nov;**97**(11):3965-73.
37. Steichen O, Zinzindohoué F, Plouin PF, Amar L. Outcomes of adrenalectomy in patients with unilateral primary aldosteronism: a review. *Horm Metab Res.* 2012 Mar;**44**(3):221-7.
38. Williams TA, Lenders JWM, Mulatero P, Burrello J, Rottenkolber M, Adolf C, Satoh F, Amar L, Quinkler M, Deinum J, Beuschlein F, Kitamoto KK, Pham U, Morimoto R, Umakoshi H, Prejbisz A, Kocjan T, Naruse M, Stowasser M, Nishikawa T, Young WF Jr, Gomez-Sanchez CE, Funder JW, Reincke M; Primary Aldosteronism Surgery Outcome (PASO) investigators. Outcomes after adrenalectomy for unilateral primary aldosteronism: an international consensus on outcome measures and analysis of remission rates in an international cohort. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017 Sep;**5**(9):689-699.
39. Rossi GP, Bolognesi M, Rizzoni D, Seccia TM, Piva A, Porteri E, Tiberio GA, Giulini SM, Agabiti-Rosei E, Pessina AC. Vascular remodeling and duration of hypertension predict outcome of adrenalectomy in primary aldosteronism patients. *Hypertension.* 2008 May;**51**(5):1366-71.
40. Proye CA, Mulliez EA, Carnaille BM, Lecomte-Houcke M, Decoulx M, Wémeau JL, Lefebvre J, Racadot A, Ernst O, Huglo D, Carré A. Essential hypertension: first reason for persistent hypertension after unilateral adrenalectomy for primary aldosteronism? *Surgery.* 1998 Dec;**124**(6):1128-33.
41. Sechi LA, Novello M, Lapenna R, Baroselli S, Nadalini E, Colussi GL, Catena C. Long-term renal outcomes in patients with primary aldosteronism. *JAMA.* 2006 Jun 14;**295**(22):2638-45.
42. Hsu CC, Sandford BA. The Delphi Technique: Making Sense of Consensus. *Practical Assessment Research & Evaluation*, **12**(10). Available online: <http://pareonline.net/getvn.asp?v=12&n=10>; abgerufen am 11. März 2019
43. Choi M, Scholl UI, Yue P, Björklund P, Zhao B, Nelson-Williams C, Ji W, Cho Y, Patel A, Men CJ, Lolis E, Wisgerhof MV, Geller DS, Mane S, Hellman P, Westin G, Åkerström G, Wang W, Carling T, Lifton RP. K<sup>+</sup> channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science.* 2011 Feb 11;**331**(6018):768-72.
44. Fernandes-Rosa FL, Williams TA, Riestler A, Steichen O, Beuschlein F, Boulkroun S, Strom TM, Monticone S, Amar L, Meatchi T, Mantero F, Cicala MV, Quinkler M, Fallo F, Allolio B, Bernini G, Maccario M, Giacchetti G, Jeunemaitre X, Mulatero P, Reincke M, Zennaro MC. Genetic spectrum and clinical correlates of somatic mutations in aldosterone-producing adenoma. *Hypertension.* 2014 Aug;**64**(2):354-61.
45. Scholl UI, Nelson-Williams C, Yue P, Grekin R, Wyatt RJ, Dillon MJ, Couch R, Hammer LK, Harley FL, Farhi A, Wang WH, Lifton RP. Hypertension with or without adrenal hyperplasia due to different inherited mutations in the potassium channel KCNJ5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Feb 14;**109**(7):2533-8.
46. Azizan EA, Poulsen H, Tuluc P, Zhou J, Clausen MV, Lieb A, Maniero C, Garg S, Bochukova EG, Zhao W, Shaikh LH, Brighton CA, Teo AE, Davenport AP, Dekkers T, Tops B, Küsters B, Ceral J, Yeo GS, Neogi SG, McFarlane I, Rosenfeld N, Marass F, Hadfield J, Margas W, Chaggar K, Solar M, Deinum J, Dolphin AC, Farooqi IS, Striessnig J, Nissen P, Brown MJ. Somatic mutations in ATP1A1 and CACNA1D underlie a common subtype of adrenal hypertension. *Nat Genet.* 2013 Sep;**45**(9):1055-60.
47. Scholl UI, Goh G, Stölting G, de Oliveira RC, Choi M, Overton JD, Fonseca AL, Korah R, Starker LF, Kunstman JW, Prasad ML, Hartung EA, Mauras N, Benson MR, Brady T, Shapiro JR, Loring E, Nelson-Williams C, Libutti SK, Mane S, Hellman P, Westin G,



- Åkerström G, Björklund P, Carling T, Fahlke C, Hidalgo P, Lifton RP. Somatic and germline CACNA1D calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism. *Nat Genet.* 2013 Sep;**45**(9):1050-4.
48. Scholl UI, Stölting G, Nelson-Williams C, Vichot AA, Choi M, Loring E, Prasad ML, Goh G, Carling T, Juhlin CC, Quack I, Rump LC, Thiel A, Lande M, Frazier BG, Rasoulpour M, Bowlin DL, Sethna CB, Trachtman H, Fahlke C, Lifton RP. Recurrent gain of function mutation in calcium channel CACNA1H causes early-onset hypertension with primary aldosteronism. *Elife.* 2015 Apr 24;**4**:e06315.
49. Beuschlein F, Boulkroun S, Osswald A, Wieland T, Nielsen HN, Lichtenauer UD, Penton D, Schack VR, Amar L, Fischer E, Walther A, Tauber P, Schwarzmayr T, Diener S, Graf E, Allolio B, Samson-Couterie B, Benecke A, Quinkler M, Fallo F, Plouin PF, Mantero F, Meitinger T, Mulatero P, Jeunemaitre X, Warth R, Vilsen B, Zennaro MC, Strom TM, Reincke M. Somatic mutations in ATP1A1 and ATP2B3 lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension. *Nat Genet.* 2013 Apr;**45**(4):440-4, 444e1-2.
50. Stindl J, Tauber P, Sterner C, Tegtmeier I, Warth R, Bandulik S. Pathogenesis of Adrenal Aldosterone-Producing Adenomas Carrying Mutations of the Na(+)/K(+)-ATPase. *Endocrinology.* 2015 Dec;**156**(12):4582-91.
51. Tauber P, Aichinger B, Christ C, Stindl J, Rhayem Y, Beuschlein F, Warth R, Bandulik S. Cellular Pathophysiology of an Adrenal Adenoma-Associated Mutant of the Plasma Membrane Ca(2+)-ATPase ATP2B3. *Endocrinology.* 2016 Jun;**157**(6):2489-99.
52. Beuschlein F, Fassnacht M, Assié G, Calebiro D, Stratakis CA, Osswald A, Ronchi CL, Wieland T, Sbiera S, Faucz FR, Schaak K, Schmittfull A, Schwarzmayr T, Barreau O, Vezzosi D, Rizk-Rabin M, Zabel U, Szarek E, Salpea P, Forlino A, Vetro A, Zuffardi O, Kisker C, Diener S, Meitinger T, Lohse MJ, Reincke M, Bertherat J, Strom TM, Allolio B. Constitutive activation of PKA catalytic subunit in adrenal Cushing's syndrome. *N Engl J Med.* 2014 Mar 13;**370**(11):1019-28.
53. Stratakis CA. cAMP/PKA signaling defects in tumors: genetics and tissue-specific pluripotential cell-derived lesions in human and mouse. *Mol Cell Endocrinol.* 2013 May 22;**371**(1-2):208-20.
54. Rhayem Y, Perez-Rivas LG, Dietz A, Bathon K, Gebhard C, Riester A, Mauracher B, Gomez-Sanchez C, Eisenhofer G, Schwarzmayr T, Calebiro D, Strom TM, Reincke M, Beuschlein F. PRKACA Somatic Mutations Are Rare Findings in Aldosterone-Producing Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Aug;**101**(8):3010-7.
55. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013 Jan;**13**(1):11-26.
56. Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagneré AM, René-Corail F, Jullian E, Gicquel C, Bertagna X, Vacher-Lavenu MC, Perret C, Bertherat J. Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 2005 Sep 1;**65**(17):7622-7.
57. Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, White PC, Rainey WE. The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB regulate adrenal aldosterone production. *Mol Endocrinol.* 2004 Feb;**18**(2):279-90.
58. Berthon A, Drelon C, Ragazzon B, Boulkroun S, Tissier F, Amar L, Samson-Couterie B, Zennaro MC, Plouin PF, Skah S, Plateroti M, Lefèbvre H, Sahut-Barnola I, Batisse-Lignier M, Assié G, Lefrançois-Martinez AM, Bertherat J, Martinez A, Val P. WNT/ $\beta$ -catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production. *Hum Mol Genet.* 2014 Feb 15;**23**(4):889-905.
59. Åkerström T, Crona J, Delgado Verdugo A, Starker LF, Cupisti K, Willenberg HS, Knoefel WT, Saeger W, Feller A, Ip J, Soon P, Anlauf M, Alesina PF, Schmid KW, Decaussin M, Levillain P, Wängberg B, Peix JL, Robinson B, Zedenius J, Bäckdahl M, Caramuta S, Iwen KA, Botling J, Ståhlberg P, Kraimps JL, Dralle H, Hellman P, Sidhu S, Westin G, Lehnert H, Walz MK, Åkerström G, Carling T, Choi M, Lifton RP, Björklund P. Comprehensive re-

- sequencing of adrenal aldosterone producing lesions reveal three somatic mutations near the KCNJ5 potassium channel selectivity filter. *PLoS One*. 2012;**7**(7):e41926.
60. Azizan EA, Lam BY, Newhouse SJ, Zhou J, Kuc RE, Clarke J, Happerfield L, Marker A, Hoffman GJ, Brown MJ. Microarray, qPCR, and KCNJ5 sequencing of aldosterone-producing adenomas reveal differences in genotype and phenotype between zona glomerulosa- and zona fasciculata-like tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 May;**97**(5):E819-29.
  61. Nakamura Y, Kitada M, Satoh F, Maekawa T, Morimoto R, Yamazaki Y, Ise K, Gomez-Sanchez CE, Ito S, Arai Y, Dezawa M, Sasano H. Intratumoral heterogeneity of steroidogenesis in aldosterone-producing adenoma revealed by intensive double- and triple-immunostaining for CYP11B2/B1 and CYP17. *Mol Cell Endocrinol*. 2016 Feb 15;**422**:57-63.
  62. Budwit-Novotny DA, McCarty KS, Cox EB, Soper JT, Mutch DG, Creasman WT, Flowers JL, McCarty KS Jr. Immunohistochemical Analyses of Estrogen Receptor in Endometrial Adenocarcinoma Using a Monoclonal Antibody. *Cancer research*. 1986 Oct;**46**(10):5419-25.
  63. Erlmeier F, Feuchtinger A, Borgmann D, Rudelius M, Autenrieth M, Walch AK, Weirich G. Supremacy of modern morphometry in typing renal oncocytoma and malignant look-alikes. *Histochem Cell Biol*. 2015 Aug;**144**(2):147-56.
  64. Feuchtinger A, Stiehler T, Jütting U, Marjanovic G, Luber B, Langer R, Walch A. Image analysis of immunohistochemistry is superior to visual scoring as shown for patient outcome of esophageal adenocarcinoma. *Histochem Cell Biol*. 2015 Jan;**143**(1):1-9.
  65. Mohammed ZM, Going JJ, McMillan DC, Orange C, Mallon E, Doughty JC, Edwards J. Comparison of visual and automated assessment of HER2 status and their impact on outcome in primary operable invasive ductal breast cancer. *Histopathology*. 2012 Oct;**61**(4):675-84.
  66. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998 Jul;**4**(7):844-7.
  67. <http://www.conn-register.de/register1.html>; abgerufen am 9. März 2019
  68. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, Zannad F; Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension and the European Society of Cardiology. 2013 ESH/ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. *Blood Press*. 2014 Feb;**23**(1):3-16.
  69. R Core Team (2018). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.
  70. Wickham H und Bryan J (2019). *readxl: Read Excel Files*. R package version 1.3.1. <https://CRAN.R-project.org/package=readxl>
  71. Wickham H (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2016.
  72. Kassambara A (2018). *ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots*. R package version 0.2. <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>
  73. Auguie B (2017). *gridExtra: Miscellaneous Functions for "Grid" Graphics*. R package version 2.3. <https://CRAN.R-project.org/package=gridExtra>
  74. Dragulescu AA und Arendt C (2018). *xlsx: Read, Write, Format Excel 2007 and Excel 97/2000/XP/2003 Files*. R package version 0.6.1. <https://CRAN.R-project.org/package=xlsx>

- 
75. Harrell FE Jr, with contributions from Charles Dupont and many others. (2019). *Hmisc: Harrell Miscellaneous*. R package version 4.2-0. <https://CRAN.R-project.org/package=Hmisc>
  76. Revelle W (2018) *psych: Procedures for Personality and Psychological Research*, Northwestern University, Evanston, Illinois, USA, <https://CRAN.R-project.org/package=psych> Version = 1.8.12.
  77. Wei T und Simko V (2017). R package "corrplot": Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.84). Available from <https://github.com/taiyun/corrplot>
  78. Monticone S, Burrello J, Tizzani D, Bertello C, Viola A, Buffolo F, Gabetti L, Mengozzi G, Williams TA, Rabbia F, Veglio F, Mulatero P. Prevalence and Clinical Manifestations of Primary Aldosteronism Encountered in Primary Care Practice. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Apr 11;**69**(14):1811-1820.
  79. Williams TA, Monticone S, Schack VR, Stindl J, Burrello J, Buffolo F, Annaratone L, Castellano I, Beuschlein F, Reincke M, Lucatello B, Ronconi V, Fallo F, Bernini G, Maccario M, Giacchetti G, Veglio F, Warth R, Vilsen B, Mulatero P. Somatic ATP1A1, ATP2B3, and KCNJ5 mutations in aldosterone-producing adenomas. *Hypertension*. 2014 Jan;**63**(1):188-95.
  80. Boulkroun S, Beuschlein F, Rossi GP, Golib-Dzib JF, Fischer E, Amar L, Mulatero P, Samson-Couterie B, Hahner S, Quinkler M, Fallo F, Letizia C, Allolio B, Ceolotto G, Cicala MV, Lang K, Lefebvre H, Lenzini L, Maniero C, Monticone S, Perrocheau M, Pilon C, Plouin PF, Rayes N, Seccia TM, Veglio F, Williams TA, Zinamosca L, Mantero F, Benecke A, Jeunemaitre X, Reincke M, Zennaro MC. Prevalence, clinical, and molecular correlates of KCNJ5 mutations in primary aldosteronism. *Hypertension*. 2012 Mar;**59**(3):592-8.
  81. Scholl UI, Healy JM, Thiel A, Fonseca AL, Brown TC, Kunstman JW, Horne MJ, Dietrich D, Riemer J, Kücüköylü S, Reimer EN, Reis AC, Goh G, Kristiansen G, Mahajan A, Korah R, Lifton RP, Prasad ML, Carling T. Novel somatic mutations in primary hyperaldosteronism are related to the clinical, radiological and pathological phenotype. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015 Dec;**83**(6):779-89.
  82. Williams TA, Lenders JW, Burrello J, Beuschlein F, Reincke M. KCNJ5 Mutations: Sex, Salt and Selection. *Horm Metab Res*. 2015 Dec;**47**(13):953-8.
  83. Taguchi R, Yamada M, Nakajima Y, Satoh T, Hashimoto K, Shibusawa N, Ozawa A, Okada S, Rokutanda N, Takata D, Koibuchi Y, Horiguchi J, Oyama T, Takeyoshi I, Mori M. Expression and mutations of KCNJ5 mRNA in Japanese patients with aldosterone-producing adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Apr;**97**(4):1311-9.
  84. Hong AR, Kim JH, Song YS, Lee KE, Seo SH, Seong MW, Shin CS, Kim SW, Kim SY. Genetics of Aldosterone-Producing Adenoma in Korean Patients. *PLoS One*. 2016 Jan 25;**11**(1):e0147590.
  85. Wang B, Li X, Zhang X, Ma X, Chen L, Zhang Y, Lyu X, Tang Y, Huang Q, Gao Y, Fan Y, Ouyang J. Prevalence and characterization of somatic mutations in Chinese aldosterone-producing adenoma patients. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Apr;**94**(16):e708.
  86. Lenzini L, Rossitto G, Maiolino G, Letizia C, Funder JW, Rossi GP. A Meta-Analysis of Somatic KCNJ5 K(+) Channel Mutations In 1636 Patients With an Aldosterone-Producing Adenoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Aug;**100**(8):E1089-95.
  87. Okamura T, Nakajima Y, Katano-Toki A, Horiguchi K, Matsumoto S, Yoshino S, Yamada E, Tomaru T, Ishii S, Saito T, Ozawa A, Shibusawa N, Satoh T, Okada S, Nagaoka R, Takada D, Horiguchi J, Oyama T, Yamada M. Characteristics of Japanese aldosterone-producing adenomas with KCNJ5 mutations. *Endocr J*. 2017 Jan 30;**64**(1):39-47
  88. Åkerström T, Willenberg HS, Cupisti K, Ip J, Backman S, Moser A, Maharjan R, Robinson B, Iwen KA, Dralle H, D Volpe C, Bäckdahl M, Botling J, Ståhlberg P, Westin G, Walz MK, Lehnert H, Sidhu S, Zedenius J, Björklund P, Hellman P. Novel somatic mutations and

- distinct molecular signature in aldosterone-producing adenomas. *Endocr Relat Cancer*. 2015 Oct;**22**(5):735-44.
89. Wu VC, Wang SM, Chueh SJ, Yang SY, Huang KH, Lin YH, Wang JJ, Connolly R, Hu YH, Gomez-Sanchez CE, Peng KY, Wu KD. The prevalence of CTNNB1 mutations in primary aldosteronism and consequences for clinical outcomes. *Sci Rep*. 2017 Jan 19;**7**:39121.
  90. Åkerström T, Maharjan R, Sven Willenberg H, Cupisti K, Ip J, Moser A, Stålberg P, Robinson B, Alexander Iwen K, Dralle H, Walz MK, Lehnert H, Sidhu S, Gomez-Sanchez C, Hellman P, Björklund P. Activating mutations in CTNNB1 in aldosterone producing adenomas. *Sci Rep*. 2016 Jan 27;**6**:19546.
  91. Teo AE, Garg S, Shaikh LH, Zhou J, Karet Frankl FE, Gurnell M, Happerfield L, Marker A, Bienz M, Azizan EA, Brown MJ. Pregnancy, Primary Aldosteronism, and Adrenal CTNNB1 Mutations. *N Engl J Med*. 2015 Oct 8;**373**(15):1429-36.
  92. Carney JA, Lyssikatos C, Lodish MB, Stratakis CA. Germline PRKACA amplification leads to Cushing syndrome caused by 3 adrenocortical pathologic phenotypes. *Hum Pathol*. 2015 Jan;**46**(1):40-9.
  93. Lodish MB, Yuan B, Levy I, Braunstein GD, Lyssikatos C, Salpea P, Szarek E, Karageorgiadis AS, Belyavskaya E, Raygada M, Faucz FR, Izzat L, Brain C, Gardner J, Quezado M, Carney JA, Lupski JR, Stratakis CA. Germline PRKACA amplification causes variable phenotypes that may depend on the extent of the genomic defect: molecular mechanisms and clinical presentations. *Eur J Endocrinol*. 2015 Jun;**172**(6):803-11.
  94. Monticone S, Castellano I, Versace K, Lucatello B, Veglio F, Gomez-Sanchez CE, Williams TA, Mulatero P. Immunohistochemical, genetic and clinical characterization of sporadic aldosterone-producing adenomas. *Mol Cell Endocrinol*. 2015 Aug 15;**411**:146-54.
  95. Yamazaki Y, Nakamura Y, Omata K, Ise K, Tezuka Y, Ono Y, Morimoto R, Nozawa Y, Gomez-Sanchez CE, Tomlins SA, Rainey WE, Ito S, Satoh F, Sasano H. Histopathological Classification of Cross-Sectional Image-Negative Hyperaldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017 Apr 1;**102**(4):1182-1192.
  96. Muth A, Ragnarsson O, Johannsson G, Wängberg B. Systematic review of surgery and outcomes in patients with primary aldosteronism. *Br J Surg*. 2015 Mar;**102**(4):307-17.
  97. Zarnegar R, Young WF Jr, Lee J, Sweet MP, Kebebew E, Farley DR, Thompson GB, Grant CS, Clark OH, Duh QY. The aldosteronoma resolution score: predicting complete resolution of hypertension after adrenalectomy for aldosteronoma. *Ann Surg*. 2008 Mar;**247**(3):511-8.
  98. Arnesen T, Glomnes N, Strømsøy S, Knappskog S, Heie A, Akslen LA, Grytaas M, Varhaug JE, Gimm O, Brauckhoff M. Outcome after surgery for primary hyperaldosteronism may depend on KCNJ5 tumor mutation status: a population-based study from Western Norway. *Langenbecks Arch Surg*. 2013 Aug;**398**(6):869-74.
  99. Ip JC, Pang TC, Pon CK, Zhao JT, Sywak MS, Gill AJ, Soon PS, Sidhu SB. Mutations in KCNJ5 determines presentation and likelihood of cure in primary hyperaldosteronism. *ANZ J Surg*. 2015 Apr;**85**(4):279-83.
  100. Tan GC, Negro G, Pinggera A, Tizen Laim NMS, Mohamed Rose I, Ceral J, Ryska A, Chin LK, Kamaruddin NA, Mohd Mokhtar N, A Jamal AR, Sukor N, Solar M, Striessnig J, Brown MJ, Azizan EA. Aldosterone-Producing Adenomas: Histopathology-Genotype Correlation and Identification of a Novel CACNA1D Mutation. *Hypertension*. 2017 Jul;**70**(1):129-136.
  101. Arlt W, Lang K, Sitch AJ, Dietz AS, Rhayem Y, Bancos I, Feuchtinger A, Chortis V, Gilligan LC, Ludwig P, Riester A, Asbach E, Hughes BA, O'Neil DM, Bidlingmaier M, Tomlinson JW, Hassan-Smith ZK, Rees DA, Adolf C, Hahner S, Quinkler M, Dekkers T, Deinum J, Biehl M, Keevil BG, Shackleton CH, Deeks JJ, Walch AK, Beuschlein F, Reincke M. Steroid metabolome analysis reveals prevalent glucocorticoid excess in primary aldosteronism. *JCI Insight*. 2017 Apr 20;**2**(8).

102. Fischer E, Adolf C, Pallauf A, Then C, Bidlingmaier M, Beuschlein F, Seissler J, Reincke M. Aldosterone excess impairs first phase insulin secretion in primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Jun;**98**(6):2513-20.
103. Wu VC, Chueh SJ, Chen L, Chang CH, Hu YH, Lin YH, Wu KD, Yang WS; TAIPAI Study Group. Risk of new-onset diabetes mellitus in primary aldosteronism: a population study over 5 years. *J Hypertens.* 2017 Aug;**35**(8):1698-1708.
104. Wu VC, Chang CH, Wang CY, Lin YH, Kao TW, Lin PC, Chu TS, Chang YS, Chen L, Wu KD, Chueh SJ. Risk of Fracture in Primary Aldosteronism: A Population-Based Cohort Study. *J Bone Miner Res.* 2017 Apr;**32**(4):743-752.
105. Ono Y, Nakamura Y, Maekawa T, Felizola SJ, Morimoto R, Iwakura Y, Kudo M, Seiji K, Takase K, Arai Y, Gomez-Sanchez CE, Ito S, Sasano H, Satoh F. Different expression of 11 $\beta$ -hydroxylase and aldosterone synthase between aldosterone-producing microadenomas and macroadenomas. *Hypertension.* 2014 Aug;**64**(2):438-44.
106. Konosu-Fukaya S, Nakamura Y, Satoh F, Felizola SJ, Maekawa T, Ono Y, Morimoto R, Ise K, Takeda K, Katsu K, Fujishima F, Kasajima A, Watanabe M, Arai Y, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE, Doi M, Okamura H, Sasano H. 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase isoforms in human aldosterone-producing adenoma. *Mol Cell Endocrinol.* 2015 Jun **15**;408:205-12.
107. Nishimoto K, Tomlins SA, Kuick R, Cani AK, Giordano TJ, Hovelson DH, Liu CJ, Sanjanwala AR, Edwards MA, Gomez-Sanchez CE, Nanba K, Rainey WE. Aldosterone-stimulating somatic gene mutations are common in normal adrenal glands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Aug 18;**112**(33):E4591-9.
108. Nishimoto K, Seki T, Kurihara I, Yokota K, Omura M, Nishikawa T, Shibata H, Kosaka T, Oya M, Suematsu M, Mukai K. Case Report: Nodule Development From Subcapsular Aldosterone-Producing Cell Clusters Causes Hyperaldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Jan;**101**(1):6-9.
109. Braun M, Kirsten R, Rupp NJ, Moch H, Fend F, Wernert N, Kristiansen G, Perner S. Quantification of protein expression in cells and cellular subcompartments on immunohistochemical sections using a computer supported image analysis system. *Histol Histopathol.* 2013 May;**28**(5):605-10.
110. Mulrane L, Rexhepaj E, Penney S, Callanan JJ, Gallagher WM. Automated image analysis in histopathology: a valuable tool in medical diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2008 Nov;**8**(6):707-25.
111. Gebhard CA. Genetische und immunhistologische Marker als prognostische Faktoren in Aldosteron produzierenden Adenomen. Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität München. 2018.
112. Yamazaki Y, Omata K, Tezuka Y, Ono Y, Morimoto R, Adachi Y, Ise K, Nakamura Y, Gomez-Sanchez CE, Shibahara Y, Kitamoto T, Nishikawa T, Ito S, Satoh F, Sasano H. Tumor Cell Subtypes Based on the Intracellular Hormonal Activity in KCNJ5-Mutated Aldosterone-Producing Adenoma. *Hypertension.* 2018 Sep;**72**(3):632-640.
113. Tunny TJ, Klemm SA, Gordon RD. Some aldosterone-producing adrenal tumours also secrete cortisol, but present clinically as primary aldosteronism. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1990 Mar;**17**(3):167-71.
114. Späth M, Korovkin S, Antke C, Anlauf M, Willenberg HS. Aldosterone- and cortisol-co-secreting adrenal tumors: the lost subtype of primary aldosteronism. *Eur J Endocrinol.* 2011 Apr;**164**(4):447-55.
115. Di Dalmazi G, Vicennati V, Garelli S, Casadio E, Rinaldi E, Giampalma E, Mosconi C, Golfieri R, Paccapelo A, Pagotto U, Pasquali R. Cardiovascular events and mortality in patients with adrenal incidentalomas that are either non-secreting or associated with intermediate phenotype or subclinical Cushing's syndrome: a 15-year retrospective study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014 May;**2**(5):396-405.

- 
116. Debono M, Bradburn M, Bull M, Harrison B, Ross RJ, Newell-Price J. Cortisol as a marker for increased mortality in patients with incidental adrenocortical adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Dec;**99**(12):4462-70.
  117. Buffolo F, Monticone S, Williams TA, Rossato D, Burrello J, Tetti M, Veglio F, Mulatero P. Subtype Diagnosis of Primary Aldosteronism: Is Adrenal Vein Sampling Always Necessary? *Int J Mol Sci.* 2017 Apr 17;**18**(4).
  118. Dekkers T, Prejbisz A, Kool LJS, Groenewoud HJMM, Velema M, Spiering W, Kołodziejczyk-Kruk S, Arntz M, Kądziała J, Langenhuijsen JF, Kerstens MN, van den Meiracker AH, van den Born BJ, Sweep FCGJ, Hermus ARMM, Januszewicz A, Ligthart-Naber AF, Makai P, van der Wilt GJ, Lenders JWM, Deinum J; SPARTACUS Investigators. Adrenal vein sampling versus CT scan to determine treatment in primary aldosteronism: an outcome-based randomised diagnostic trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016 Sep;**4**(9):739-746.
  119. Funder JW, Rossi GP. Adrenal vein sampling versus CT scanning in primary aldosteronism. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016 Nov;**4**(11):886.
  120. Williams TA, Burrello J, Sechi LA, Fardella CE, Matrozova J, Adolf C, Baudrand R, Bernardi S, Beuschlein F, Catena C, Doumas M, Fallo F, Giacchetti G, Heinrich DA, Saint-Hilary G, Jansen PM, Januszewicz A, Kocjan T, Nishikawa T, Quinkler M, Satoh F, Umakoshi H, Widimský J Jr, Hahner S, Douma S, Stowasser M, Mulatero P, Reincke M. Computed Tomography and Adrenal Venous Sampling in the Diagnosis of Unilateral Primary Aldosteronism. *Hypertension.* 2018 Sep;**72**(3):641-649.
  121. Abe T, Naruse M, Young WF Jr, Kobashi N, Doi Y, Izawa A, Akama K, Okumura Y, Ikenaga M, Kimura H, Saji H, Mukai K, Matsumoto H. A Novel CYP11B2-Specific Imaging Agent for Detection of Unilateral Subtypes of Primary Aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Mar;**101**(3):1008-15.
  122. Burton TJ, Mackenzie IS, Balan K, Koo B, Bird N, Soloviev DV, Azizan EA, Aigbirhio F, Gurnell M, Brown MJ. Evaluation of the sensitivity and specificity of (11)C-metomidate positron emission tomography (PET)-CT for lateralizing aldosterone secretion by Conn's adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Jan;**97**(1):100-9.
  123. Heinze B, Fuss CT, Mulatero P, Beuschlein F, Reincke M, Mustafa M, Schirbel A, Deutschbein T, Williams TA, Rhayem Y, Quinkler M, Rayes N, Monticone S, Wild V, Gomez-Sanchez CE, Reis AC, Petersenn S, Wester HJ, Kropf S, Fassnacht M, Lang K, Herrmann K, Buck AK, Bluemel C, Hahner S. Targeting CXCR4 (CXC Chemokine Receptor Type 4) for Molecular Imaging of Aldosterone-Producing Adenoma. *Hypertension.* 2018 Feb;**71**(2):317-325.
  124. Eisenhofer G, Dekkers T, Peitzsch M, Dietz AS, Bidlingmaier M, Treitl M, Williams TA, Bornstein SR, Haase M, Rump LC, Willenberg HS, Beuschlein F, Deinum J, Lenders JW, Reincke M. Mass Spectrometry-Based Adrenal and Peripheral Venous Steroid Profiling for Subtyping Primary Aldosteronism. *Clin Chem.* 2016 Mar;**62**(3):514-24.
  125. Meyer LS, Wang X, Sušnik E, Burrello J, Burrello A, Castellano I, Eisenhofer G, Fallo F, Kline GA, Knösel T, Kocjan T, Lenders JWM, Mulatero P, Naruse M, Nishikawa T, Peitzsch M, Rump LC, Beuschlein F, Hahner S, Gomez-Sanchez CE, Reincke M, Williams TA. Immunohistopathology and Steroid Profiles Associated With Biochemical Outcomes After Adrenalectomy for Unilateral Primary Aldosteronism. *Hypertension.* 2018 Sep;**72**(3):650-657.

## 7 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
aHT	arterielle Hypertonie
aHTM	antihypertensive Medikation
APA	Aldosteron-produzierendes Adenom
APCC	<i>Aldosterone producing cell cluster</i>
ARQ	Aldosteron-Renin-Quotient
AT <sub>1</sub>	Angiotensin 1
AT <sub>2</sub>	Angiotensin 2
ATP	Adenosintriphosphat
AVS	<i>Adrenal venous sampling</i>
BAH	Bilaterale adrenale Hyperplasie
BMI	<i>Body Mass Index</i>
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CRH	<i>Corticotropine releasing hormone</i>
CT	Computertomographie
DDD	<i>Defined daily dosage</i>
DHEA	Dihydroepiandrosteron
DHEA-S	Dihydroepiandrosteron-Sulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Deoxyribonukleotidtriphosphat
ED	Erstdiagnose
FFPE	<i>Formalin-fixed paraffin-embedded</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSD3B1	3-beta-Hydroxysteroiddehydrogenase 1
HSD3B2	3-beta-Hydroxysteroiddehydrogenase 2
IHC	Immunhistochemie
iLI	ipsilateraler Lateralisationsindex
IQA	Interquartilsabstand
K <sub>s</sub> <sup>+</sup>	Serumkaliumwert
LI	Lateralisationsindex
LNSC	<i>Late night salivary cortisol</i>
MRA	Mineralocorticoidrezeptorantagonist
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NNR	Nebennierenrinde
NR	Nicht rekurrent
OP	Operation
PA	Primärer Hyperaldosteronismus
PAC	<i>Plasma aldosterone concentration</i>
PASO	<i>Primary Aldosterone Surgery Outcome</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

---

RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of interest
RR	Methode nach Riva-Rocci
RR <sub>dia</sub>	Diastolischer Blutdruck
RR <sub>sys</sub>	Systolischer Blutdruck
SD	<i>Standard deviation</i>
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
UC	<i>Urinary cortisol</i>
WT	Wildtyp
ZF	Zona fasciculata
ZG	Zona glomerulosa
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZR	Zona reticularis



---

## 8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Felix Beuschlein danke ich für die Überlassung des Themas und der Ressourcen, die für die Fertigstellung dieser Arbeit nötig waren. Auch danke ich für die Anregungen, Verbesserungsvorschläge und stetige Erreichbarkeit bei Fragen sowie für die Unterstützung und Motivation bei Vorträgen und Teilnahmen an Kongressen.

Ganz besonders danke ich meiner Betreuerin und Mentorin Frau Dr. Yara Rhayem für die hervorragende Betreuung, praktische und methodische Unterstützung und Motivation zur Teilnahme an Kongressen und ihr allgemeines Engagement, mich in das wissenschaftliche Denken einzuführen.

Weiterhin danke ich Frau Brigitte Mauracher, Frau Petra Rank und Frau Christina Brugger für ihre technische und organisatorische Unterstützung und das freundliche Willkommenheißen in der Arbeitsgruppe.

Diese Arbeit wäre ohne die Arbeitsgruppe für analytische Pathologie von Prof. Dr. Karl-Axel Walch am Helmholtz-Institut München nicht möglich gewesen. Ich danke Herrn Prof. Walch für die Bereitstellung der technischen Gerätschaften und die fachlichen Diskussionen und Anregungen. Frau Dr. Annette Feuchtinger danke ich für die Einführung und stetige Hilfestellung bei der Computer-gestützten Analyse. Frau Ulrike Buchholz, Frau Claudia-Mareike Pflüger und Herrn Dipl.-Ing. Andreas Voss danke ich für die technische Unterstützung und die freundliche Aufnahme in eine angenehme Arbeitsatmosphäre in Neuherberg. Herrn Thomas Kunzke danke ich für die Anstoßhilfe bei der statistischen Auswertung und die gute Zusammenarbeit bei unserem gemeinsamen Vortrag. Prof. Celso Gomez-Sanchez danke ich für die Bereitstellung der benötigten Antikörper.

Meiner Freundin Nora Kremer danke ich für die stetige Hilfsbereitschaft und ihre motivierenden Worte besonders in anstrengenderen Phasen.

Zum Schluss bedanke ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester, die mich in allen Lebenslagen stets unterstützen und mir das Studium ermöglicht haben.

## 9 Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen vorgestellt und als *Abstract* veröffentlicht:

1. **Ludwig P**  
*Primary Aldosteronism: Morphometric and histopathological characteristics*  
15th annual YARE (Young active research in endocrinology) Meeting  
Oktober 2016, Würzburg, Deutschland
2. Rhayem Y, Feuchtinger A, Woischke C, **Ludwig P**, Kunzke T, Schwarzmayr T, Hahner S, Gomez-Sanchez CE, Strom TM, Kirchner T, Reincke M, Walch A, Beuschlein F (2017)  
*Characteristics of aldosterone-producing adenomas: a tissue microarray study*  
19th European Congress of Endocrinology  
20. - 23. Mai 2017, Lissabon, Portugal
3. **Ludwig P**, Kunzke T\*, Rhayem Y, Feuchtinger A, Heinrich D, Woischke C, Williams TA, Kirchner T, Hahner S, Knösel T, Reincke M, Walch A, Beuschlein F  
*Image Analysis of Morphometric Parameters in Aldosterone-Producing Adenomas*  
Progress in Primary Aldosteronism 5  
3. - 4. Juli 2017, München, Deutschland

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden internationalen Fachzeitschriften als Originalarbeiten veröffentlicht:

1. Arlt W, Lang K, Sitch AJ, Dietz AS, Rhayem Y, Bancos I, Feuchtinger A, Chortis V, Gilligan LC, **Ludwig P**, Riester A, Asbach E, Hughes BA, O'Neil DM, Bidlingmaier M, Tomlinson JW, Hassan-Smith ZK, Rees DA, Adolf C, Hahner S, Quinkler M, Dekkers T, Deinum J, Biehl M, Keevil BG, Shackleton CH, Deeks JJ, Walch AK, Beuschlein F, Reincke M. Steroid metabolome analysis reveals prevalent glucocorticoid excess in primary aldosteronism. *JCI Insight*. 2017 Apr 20;**2**(8).
2. Murakami M, Rhayem Y, Kunzke T, Sun N, Feuchtinger A, **Ludwig P**, Strom TM, Gomez-Sanchez C, Knösel T, Kirchner T, Williams TA, Reincke M, Walch AK, Beuschlein F. In situ metabolomics of aldosterone-producing adenomas. *JCI Insight*. 2019 Sep 5;**4**(17).



## Eidesstattliche Versicherung

**Ludwig, Philippe**

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel  
**Morphometrische und immunhistochemische Analyse von Aldosteron-produzierenden Adenomen auf Basis eines Tissue-Microarrays**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

**Freiburg, 31.03.2020**

Ort, Datum

**Philippe Ludwig**

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand