

Aus der Praxis  
Endokrinologie in Charlottenburg

DISSERTATION

Untersuchung der Assoziation zwischen Polymorphismen  
des Glucocorticoidrezeptor-Gens und der Muskelkraft  
in Patienten mit Cushing-Syndrom

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Lisa Marie Müller  
aus Jena

Datum der Promotion: 05.03.2021

## VORWORT

In dieser Arbeit werden der Übersichtlichkeit halber die Termini „Patient“ und „Proband“ verwendet. Diese Termini mögen bitte im Sinne des Gleichstellungsgedanken als Patient\*In und Proband\*In verstanden werden, womit Zugehörige jegliches Geschlechts angesprochen sind.

Die in dieser Dissertation dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf unsere Publikation „Glucocorticoid receptor polymorphisms influence muscle strength in Cushing’s syndrome“, die im Januar 2020 im *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* veröffentlicht wurde:

Müller LM, Kienitz T, Deutschbein T, Riester A, Hahner S, Burger-Stritt S, Berr CM, Oßwald A, Braun L, Rubinstein G, Reincke M, Quinkler M. Glucocorticoid Receptor Polymorphisms Influence Muscle Strength in Cushing's Syndrome. *JCEM* 2020, Jan 1;105(1). pii: dgz052. doi: 10.1210/clinem/dgz052.

Ich habe darauf verzichtet, im begleitenden Manteltext die Ergebnisse wiederholend als Abbildungen darzustellen und verweise an den entsprechenden Stellen auf die Publikation.

# INHALTSVERZEICHNIS

VORWORT	II
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ZUSAMMENFASSUNG	VI
ABSTRACT	VII
<b>1 EINFÜHRUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Ätiologie und Klinik des Cushing-Syndroms	1
1.2 Diagnostik und Therapie des Cushing-Syndroms	2
1.3 Cortisol-induzierte Myopathie in Patienten mit Cushing-Syndrom	5
1.4 Der Glucocorticoidrezeptor und die Polymorphismen seines Gens	6
1.5 Ziel der Studie	7
<b>2 METHODIK</b>	<b>8</b>
2.1 Studiendesign und -population	8
2.2 Gruppeneinteilung	9
2.3 Klinische und laborchemische Parameter	9
2.4 Genotypisierung der Einzelnukleotid-Polymorphismen	10
2.4.1 DNA-Extraktion	10
2.4.2 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion	10
2.4.3 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus	11
2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese	12
2.4.5 Duplex-Real-Time TaqMan PCR	14
2.4.6 Genotypen-basierte Patientenklassifizierung	17
2.5 Statistische Auswertung	17
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>18</b>
3.1 Allel-Häufigkeiten	18
3.1 Charakterisierung der Patienten-Kohorten	18
3.2 Korrelationen der Muskelkraft zum SNP A3669G	19
3.3 Korrelationen der Muskelkraft zu den SNPs ER22/23EK, N363S und <i>BclI</i>	20
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>20</b>
4.1 Klinische Relevanz	20
4.2 Limitationen und weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen	23
LITERATURVERZEICHNIS	25
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	30
ANTEILSERKLÄRUNG AN DER ERFOLGTEN PUBLIKATION	31
AUSZUG AUS DER JOURNAL SUMMARY LIST 2018	32
PUBLIKATION	34
LEBENS LAUF	43
PUBLIKATIONS LISTE	45
DANKSAGUNG	46

## ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

- Abbildung 1: Gelelektrophorese der amplifizierten und hydrolysierten DNA des SNPs *BclII*
- Abbildung 2: Gelelektrophorese der amplifizierten und hydrolysierten DNA des SNPs ER22/23EK
- Abbildung 3: Gelelektrophorese der amplifizierten und hydrolysierten DNA des SNPs N363S
- Abbildung 4: Amplifikationskurven der Fluoreszenz-Signale einer Duplex-Real-Time TaqMan PCR (Polymerase-Kettenreaktion)
- Abbildung 5: Beispiel eines *allelic discrimination plot*
- 
- Tabelle 1: Primersequenzen, Hybridisierungstemperaturen und Längen der amplifizierten DNA-Matrizen
- Tabelle 2: Restriktionsenzyme, Puffer und Hydrolysetemperaturen des Restriktions-Längenpolymorphismus
- Tabelle 3: Allel-Häufigkeiten des mutierten Allels der Einzelnukleotid-Polymorphismen *BclII*, N363S, ER22/23EK und A3669G in Patienten mit Cushing-Syndrom, in der „Ausschluss-Cushing“-Kohorte und in der globalen Vergleichspopulation „TOPMed“

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACTH	adrenocorticotropes Hormon
BMI	„body mass index“, Körpermasse-Index
bp	Basenpaare
CRH	Corticotropin-releasing Hormone
CRT	„chair rising test“, Aufstehetest
CS	Cushing-Syndrom
CT	Computertomographie
DNA	„desoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAM <sup>TM</sup>	6-Carboxyfluorescein
FOXO	Forkhead-Box-Protein
HbA1c	glykiertes Hämoglobin $\alpha$ 1
HDL	„high density lipoprotein“, Lipoprotein hoher Dichte
IPSS	Inferior Petrosal Sinus Sampling
LDL	„low density lipoprotein“, Lipoprotein geringer Dichte
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MRT	Magnetresonanztomographie
NR3C1	Nuclear Receptor Subfamilie 3 Gruppe C 1, Glucocorticoidrezeptor
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RFU	„relative fluorescent units“, relative Fluoreszenz-Einheiten
rs1234	Referenznummer des Einzelnukleotid-Polymorphismus
SNP	„single nucleotid polymorphism“, Einzelnukleotid-Polymorphismus
TBE-Puffer	TRIS(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)-Borat-EDTA-Puffer
VIC <sup>®</sup>	2'-Chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxy-fluorescein
1 mg-DST	„1 mg dexamethasone suppression test“, 1 mg-Dexamethason-Hemmtest
24 h-UFC Test	„24 hours urine free cortisol“, Cortisolmessung im 24 h-Sammelurin

## ZUSAMMENFASSUNG

**EINLEITUNG:** Ein häufiges Symptom in Patienten mit Cushing-Syndrom (CS) ist die proximale Myopathie, die durch die supraphysiologischen Cortisolspiegel induziert wird. Unterschiede im Ausprägungsgrad der Muskelschwäche korrelieren nicht zur Höhe des Hypercortisolismus und werden wahrscheinlich durch weitere Faktoren beeinflusst. Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) des Glucocorticoidrezeptor-Gens (*BclI*, N363S, ER22/23EK and A3669G) modulieren nachweislich seine Cortisol-Sensitivität. Ziel dieser Studie war die Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen SNPs des Glucocorticoidrezeptors und der Muskelkraft in Patienten mit CS.

**METHODIK:** Diese multizentrische Studie untersuchte 205 Patienten mit endogenem CS (128 = hypophysär, 87 = adrenal) von drei Standorten des Deutschen Cushing Registers, sowie 125 Patienten einer adipösen Vergleichskohorte, in denen ein CS ausgeschlossen werden konnte. Zur Bestimmung der Muskelkraft wurde die Griffstärke mittels Handkraftmessung und die Kraft der unteren Extremität mittels des Aufstehetests analysiert. Außerdem erfolgte die Genotypisierung der vier SNPs des Glucocorticoidrezeptor-Gens (A3669G, *BclI*, ER22/23EK, N363S) nach vorheriger DNA-Extraktion aus peripheren Blutleukozyten.

**ERGEBNISSE:** In Patienten mit floridem CS zeigten Träger des SNP A3669G eine stärkere Griffkraft beider Hände ( $p = 0,006$ ,  $p = 0,021$ ). Dieser Unterschied zeigte sich nicht in Cushing-Patienten in Remission und in der Vergleichskohorte. Eine stärkere Griffkraft beider Hände zeigten ebenso männliche Cushing-Patienten mit dem mutierten Allel des SNP ER22/23EK ( $p = 0,049$ ,  $p = 0,027$ ). Die SNPs *BclI* und N363S korrelierten nicht zur Muskelkraft. Der Aufstehetest zeigte ebenso keine Korrelation zur Muskelkraft.

**DISKUSSION:** Der SNP A3669G steht im Zusammenhang mit einer Verminderung der Cortisol-Sensitivität und in dem Sinne zeigten Träger des mutierten Allels eine normwertige Handkraft, während Träger des Wildtyp-Allels als empfindlicher für den Hypercortisolismus scheinen. Eine ähnliche Korrelation zeigt der SNP ER22/23EK, wobei der protektive Effekt auf die Muskelkraft nur in männlichen Patienten mit CS signifikant war. Die Ergebnisse könnten teilweise zur Erklärung der inter-individuellen Unterschiede der Myopathie in Patienten mit CS beitragen.

## ABSTRACT

**CONTEXT:** Patients with Cushing's syndrome (CS) often experience a myopathy of the proximal muscles, that is induced by the supra physiological levels of cortisol. Cortisol leads to muscle proteolysis and inhibited muscle synthesis by inducing several pathways via the glucocorticoid receptor. Interindividual differences in glucocorticoid-induced myopathy cannot be described alone by the height of cortisol levels. Single nucleotide polymorphisms (SNP) of the glucocorticoid receptor (*BclI*, N363S, ER22/23EK and A3669G) have shown to alter its sensitivity towards cortisol. Therefore, it seems possible that they might also influence muscle strength in patients with endogenous hypercortisolism.

**METHODS:** This multicenter study analyzed 205 patients with endogenous CS (128 pituitary, 77 adrenal) from three centers of the German Cushing's Registry and a comparison group of 125 obese subjects, that presented with symptoms of CS, but in whom CS was ruled-out. Muscle strength was assessed by the performance of a chair rising test and by the measurement of the grip strength via the JAMAR dynamometer. All patients were genotyped for the four mentioned SNPs after the extraction of DNA out of peripheral blood leukocytes.

**RESULTS:** Carriers of the A3669G minor allele showed a better and rather normal grip strength of both hands compared to those of the wildtype allele in the cohort of patients with active CS ( $p = 0.006$ ,  $p = 0.021$ ). The same was seen in male carriers of the ER22/23EK minor allele ( $p = 0.049$ ,  $p = 0.027$ ). Patients with a cured CS and the patients of the comparison group without CS. The SNPs *BclI* and N363S did not show a correlation to muscle strength and either group. Further no differences were seen in the muscle strength assessed by the chair rising test.

**CONCLUSION:** A3669G is known to reduce cortisol sensitivity and in this study carriers of the A3669G minor allele showed a preserved grip strength, while carrier of the wildtype allele seemed to be more susceptible to hypercortisolism by showing a weaker performance. A similar correlation was seen in carriers of the ER22/23EK minor allele, although the difference only showed off in male patients with CS and this might suggest an underlying sex difference. This study's findings can potentially deliver an explanation for inter-individual differences of the cortisol-induced myopathy in patients with CS.

# 1 EINFÜHRUNG

## 1.1 Ätiologie und Klinik des Cushing-Syndroms

Das Cushing-Syndrom (CS), erstmals im Jahr 1910 durch den Neurochirurgen Harvey Williams Cushing erwähnt (1), beschreibt den klinischen Symptomkomplex, der durch einen Hypercortisolismus hervorgerufen wird (2). Zur typischen Symptomatik des CS zählen die Entwicklung „Cushingoider Stigmata“, wie: Striae rubrae, Plethora, Hautverdünnung und Hauteinblutungen, Hirsutismus und Akne, Menstruationsstörungen, Gewichtszunahme und eine Umverteilung des subkutanen Fettgewebes mit Ausbildung einer Stammfettsucht, eines „Vollmondgesichts“ und „Stiernackens“ bei gleichzeitiger peripher betonter Atrophie der Muskulatur mit daraus resultierender Muskelschwäche (3). Weitere häufige Symptome sind eine arterielle Hypertonie, Lethargie und Depressionen, Wundheilungsstörungen und Osteoporose und eine gestörte Glukosetoleranz, bis hin zur Ausbildung eines manifesten Typ 2 Diabetes Mellitus (3). Die Vielgestaltigkeit der Cushing-Symptomatik resultiert aus der Einwirkung von Cortisol auf das Immunsystem und auf zahlreiche Stoffwechselfvorgänge des Körpers, wie den Glukose- und Fettstoffwechsel. Die Klinik bei Patienten mit CS kann sehr unterschiedlich ausgeprägt sein und kann auch nur einzelne Symptome und klinische Zeichen umfassen.

Die Ursachen eines CS sind vielfältig. In der Gegenwart ist die häufigste Form ein exogen induzierter Hypercortisolismus. Dabei entwickeln die Patienten ein CS als Nebenwirkung einer systemischen Langzeittherapie mit synthetischen Glucocorticoiden (z.B. Prednisolon, Dexamethason). Endogene Ursachen des CS sind zumeist Erkrankungen der Organe der corticotropen Achse und lassen sich diagnostisch darin unterscheiden, ob eine Abhängigkeit zum adrenocorticotropen Hormon (ACTH) vorliegt. ACTH wird in den corticotropen Zellen der Adenohypophyse aus dem Vorläufermolekül Proopiomelanocortin synthetisiert und hat eine stimulierende Wirkung auf die Nebennierenrinden, in denen Cortisol synthetisiert und sezerniert wird. Die häufigste Ursache der endogenen CS stellen mit 65 – 70 % corticotrope Tumoren der Hypophyse dar, die über eine überschüssige ACTH-Synthese ein ACTH-abhängiges CS induzieren (4, 5). Das durch Hypophysenadenome hervorgerufene Krankheitsbild wird auch als Morbus Cushing bezeichnet. ACTH-unabhängige Formen des CS umfassen Adenome, Karzinome oder Hyperplasien der Nebennieren. Diese verursachen eine überschüssige, ACTH-unabhängige Cortisol synthese und -ausschüttung und sind für etwa 28 % aller endogenen Ursachen verantwortlich; 64% davon fallen auf adrenale Adenome (5). Als ektopes CS werden die selten

auftretenden CS bezeichnet, die durch Tumoren anderer Organsysteme, zum Beispiel kleinzelliger Tumoren der Lunge, hervorgerufen werden. Die Tumore greifen durch eine neuroendokrine CRH- oder ACTH-Produktion in den corticotropen Regelkreis ein und induzieren eine überschüssige Cortisolsynthese in den Nebennierenrinden. In aktuellen Studien umfasst die Prävalenz der ektopten CS 6 – 7 % aller möglichen endogenen Ursachen (5, 6).

## 1.2 Diagnostik und Therapie des Cushing-Syndroms

Das beschriebene Diagnostik-Schema richtet sich nach aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie e.V. und der Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin und der „Endocrine Society“ (7, 8): Bei Verdacht auf ein bestehendes CS sollte zuallererst eine gründliche Anamnese inklusive der aktuellen Medikation erhoben werden, um ein mögliches exogen induziertes CS durch Glucocorticoidgabe nicht zu übersehen. Es sollten sowohl orale, als auch inhalative, topische, intravenöse, intramuskuläre und intraartikuläre Anwendungen erfragt werden, da alle Applikationswege bei Überschreitung der physiologischen Äquivalenzdosis von ca. 7,5 mg Prednison am Tag über längere Zeit ein CS hervorrufen können (9). Eine vorliegende B-Symptomatik kann Hinweise auf ein ektoptes CS liefern, Sehstörungen in Form einer bilateralen Hemianopsie können auf das Vorhandensein eines Hypophysenadenoms hindeuten. Die körperliche Untersuchung umfasst die Inspizierung auf Vorliegen spezifischer Cushing-Stigmata.

Bei begründetem Verdacht auf das zugrunde liegen eines endogenen CS sollten zunächst eine oder mehrere der folgenden Labortestungen durchgeführt werden: eine Cortisolmessung im 24 h - Sammelurin (24 h-UFC Test, „24 hours urine free cortisol“), eine Cortisolbestimmung um Mitternacht im Serum oder Speichel und die Durchführung eines 1 mg-Dexamethason-Hemmtests (1 mg-DST, „1 mg dexamethasone suppression test“) (8).

Beim 24 h-UFC Test sammelt der Patient in einem Behälter für einen vollen Tag seinen Urin, worin im Anschluss der Cortisolgesamtmenge bestimmt wird (10). Anhand der Flüssigkeitszufuhr, der Gesamturinmenge und der Kreatininkonzentration im Urin sollte zunächst eine normwertige Filtrationsfunktion der Niere verifiziert werden, da bei beeinträchtigter Nierenfunktion auch die Cortisolausscheidung limitiert ist (11-13). Die Normwerte richten sich nach dem verwendeten Assay des Labors. Der Test sollte mindestens zweimalig durchgeführt werden, um mögliche Tagesschwankungen zu berücksichtigen (8).

Die Messung des Cortisols im Mitternachtsspeichels ist besonders einfach durchführbar, da die Patienten den Speichel selbstständig zu Hause mit einem Röhrchen oder Wattestäbchen

sammeln und anschließend einschicken können, da die Speichelprobe bei Raum- und Kühl-schranktemperaturen stabil ist (14). Alternativ kann bei einem hospitalisierten Patienten auch das Cortisol um 24 Uhr im Serum bestimmt werden. Dieser Test dient zum Nachweis der bei Cushing-Patienten typischerweise aufgehobenen zirkadianen Rhythmik der Cortisolausschüttung mit einem fehlenden nächtlichen Tiefpunkt des Cortisolspiegels und gilt ab Werten  $> 145\text{ng/dl}$  ( $= 4\text{ nmol/l}$ ) als pathologisch (15, 16). Auch diese Testung sollte minimal zweimalig erfolgen (8).

Beim 1 mg-DST erfolgt die mitternächtliche Gabe von 1 mg Dexamethason und die anschließende Cortisolmessung im Serum am darauffolgenden Morgen nüchtern zwischen 8 und 10 Uhr (17). Bei intaktem corticotropen Regelkreis führt das synthetische Glucocorticoid Dexamethason über den negativen Feedbackmechanismus zur Supprimierung der ACTH-Ausschüttung in der Hypophyse und dadurch am nächsten Morgen zu einer verminderten Cortisol-synthese und -ausschüttung in den Nebennieren; bei Patienten mit CS bleibt die Unterdrückung aus. Pathologisch sind morgendliche Cortisolwerte  $> 1,8\text{ }\mu\text{g/dl}$  ( $= 50\text{ nmol/l}$ ) (18, 19).

Es sollte bedacht werden, dass schweres Übergewicht, Alkoholismus, ein schlecht eingestellter Diabetes Mellitus und psychiatrische Erkrankungen wie Depressionen und Angststörungen mit einem milden Hypercortisolismus einhergehen können und leichtgradig abnorme Werte im 24 h-UFC Test und im 1 mg-DST hervorrufen (8). Ebenso können Medikamente zu erhöhten Cortisolwerten und zu pathologischen Testergebnissen führen, so z.B. die Einnahme eines Kontrazeptivums („Antibaby-Pille“) (20, 21).

Nach Sicherung der Diagnose Hypercortisolismus erfolgt eine weiterführende Differentialdiagnostik zur weiteren Bestimmung der Ätiologie. Die Prüfung einer vorliegenden ACTH-Abhängigkeit des CS erfolgt mittels morgendlicher Plasma-ACTH-Messung. Liegt ein supprimiertes ACTH vor ( $< 5\text{ pg/ml}$ ), so ist von einem adrenalen CS auszugehen. Liegt ein normales oder erhöhtes ( $> 15\text{ pg/ml}$ ) ACTH vor, erfolgt die Durchführung eines CRH (Corticotropin-Releasing-Hormon)-Stimulations-Tests und eines hochdosierten Dexamethason-Hemmtests, um zu differenzieren, ob eine hypophysäre oder ektope ACTH-Sekretion vorliegt.

Beim CRH-Stimulations-Test erfolgt die Verabreichung eines synthetischen CRH-Äquivalents mit Messung der ACTH- und Cortisol-Spiegel im Serum zum Zeitpunkt der CRH-Gabe und in weiteren 15-minütigen Abständen (22, 23). CRH ist das primäre Hormon der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse, wird im Hypothalamus synthetisiert und sezerniert und stimuliert in der Hypophyse die ACTH-Sekretion. Im Falle eines ektope CS bleiben die ACTH- und Cortisol-Werte unverändert, bei Vorliegen eines Morbus Cushing löst die CRH-

Gabe einen Anstieg beider Hormonspiegel aus (24). Die genauen Cut-Off Werte sind jedoch umstritten.

Beim hochdosierten Dexamethason-Hemmtest nach Liddle werden entweder über 2 Tage hinweg alle sechs Stunden 2 mg Dexamethason (insgesamt 2 x 8 mg) oder einmalig 8 mg Dexamethason verabreicht; es erfolgt die jeweils morgendliche Bestimmung des Serumcortisols (25). Im Gegensatz zur Kurzform des Hemmtests, kann bei diesem Test auch bei vorliegendem hypophysärem Mikroadenom eine Supprimierung des Cortisols um mindestens 50 % erreicht werden (25). Bei ektopter ACTH-Bildung bleibt die Hemmung aus, somit kann der Test bei der Differenzierung dieser beiden Krankheitsentitäten dienen (26).

Nach Feststellung der zugrundeliegenden Ätiologie des CS kommen bildgebende Verfahren zum Einsatz, um einen vorhandenen Tumor zu suchen. Bei Verdacht auf ein ACTH-unabhängiges CS erfolgt eine Computertomographie (CT) oder eine Magnetresonanztomographie (MRT) der Nebennieren (27). Bei Verdacht auf eine hypophysäre Raumforderung sollte zunächst eine kraniale MRT durchgeführt werden. Zeigt sich hier ein Hypophysentumor, sollte dieser als Ursache des CS in Betracht gezogen werden (27). Zeigt sich die MRT unauffällig, sollte zunächst eine invasive zentrale ACTH-Messung erfolgen, um den Verdacht auf ein hypophysäres oder ektopes CS zu erhärten (23). Bei der invasiven Methode des Inferior Petrosal Sinus Sampling (IPSS) wird unter Sicht in der digitalen Subtraktionsangiografie der Sinus petrosus katheterisiert und nach anschließender intravenöser CRH-Gabe mehrmals zentral über den Katheter und peripher die ACTH-Plasmakonzentration bestimmt (26). Im Falle eines vorliegenden Morbus Cushing liegt ein Gradient ( $> 2:1$ ) zwischen der zentral und peripher gemessenen ACTH-Konzentration vor, bei ektopten CS zeigt sich dieser Unterschied nicht (26, 28).

Das therapeutische Ziel in Patienten mit CS besteht in der Umkehrung jeglicher Symptome und in der Normalisierung der Cortisolspiegel (29, 30). Beim Nachweis eines adrenalen, ektopten oder hypophysären Tumors ist die Therapie der Wahl dessen operative Entfernung (entsprechend: Adrenalektomie, Tumorsektion oder transsphenoidale Adenomektomie) (31). Eine Alternative zur operativen Entfernung hypophysärer Tumoren stellt die ablativ Radiotherapie dar (30).

Falls eine operative Therapie nicht möglich oder nicht erfolgreich ist, stehen Medikamente zur Verfügung, die die Cortisolbiosynthese blockieren, wie z.B. Mitotan, Ketoconazol, Metopiron oder auch klassische Zytostatika wie Etoposid, die aber in der Regel intravenös verabreicht werden müssen. Ebenso verwendet wird der Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonist Mifepristone.

Beim hypophysären CS können darüber hinaus Somatostatin-(Pasireotide) oder Dopaminantagonista verwendet werden, die zu einer Reduktion der ACTH Produktion führen.

Eine ultima ratio Option für ein CS jeglicher Genese stellt die bilaterale Adrenalektomie dar, bei der der Körper folglich kein eigenes Cortisol mehr synthetisieren kann (32). Im Anschluss ist die lebenslängliche Hormonersatztherapie mit dem natürlichen Glucocorticoid Cortisol (=Hydrocortison) und dem synthetischen Mineralocorticoid Fludrocortison notwendig.

### 1.3 Cortisol-induzierte Myopathie in Patienten mit Cushing-Syndrom

Im Rahmen dieser Studie konzentrierten wir uns auf die Untersuchung eines häufig auftretenden Symptoms in Patienten mit CS: die proximale Cortisol-induzierte Myopathie, die unterschiedlichen Erhebungen zufolge 42 – 82 % aller Patienten mit endogenem CS betrifft (33, 34). Auf die nähere Beschreibung der Pathogenese anderer klinischer Symptome des CS wird im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

Die Glucocorticoid-induzierte Myopathie betrifft typischerweise zunächst die unteren Extremitäten und proximale vor distalen Anteilen (35, 36). Cushing-Patienten beschreiben typischerweise Beschwerden beim Treppensteigen und eine Unfähigkeit von einem Stuhl ohne Zuhilfenahme der Hände zum Abstützen aufzustehen (35). In zahlreichen Studien konnte eine Korrelation zwischen einer bestehenden Myopathie mit einer erhöhten Mortalität und einer reduzierten Lebensqualität nachgewiesen werden (37, 38)

Die Cortisol-induzierte Myopathie resultiert aus dem Einfluss des Hormons auf verschiedene Signalwege des Muskelstoffwechsels. Glucocorticoide wirken zum einen anti-anabol durch Inhibierung der muskulären Proteinsynthese und verhindern damit den Aufbau neuer Muskelfasern. Zum anderen führen sie über ihre katabole Wirkweise zur Aktivierung der Muskelproteolyse, also zum Abbau bestehender Muskelfasern (39). Der anti-anabole Effekt resultiert aus einem verminderten Transport von Aminosäuren in die Myozyten (39), aus einer veränderten transkriptionalen Aktivität im Skelettmuskel (40), einer vermehrten Expression von Myostatin bei gleichzeitig reduzierter Myogeninaktivität (39, 41, 42) und Modifizierungen weiterer Signalwege (43). Die katabole Aktivität der Glucocorticoide resultiert insbesondere aus der vermehrten Expression des Transkriptionsfaktors für das Forkhead-Box-Protein O (FOXO), der wiederum „Atrogene“ (Gene, die zur Muskelatrophie führen) und das Ubiquitin-Proteasom-System hochreguliert (39). Ferner wurde nachgewiesen, dass Cortisol die Funktion der Mitochondrien negativ beeinflusst und die Erregbarkeit des Sarkolemm, der Zellmembran der Muskelzellen, reduziert (44).

## 1.4 Der Glucocorticoidrezeptor und die Polymorphismen seines Gens

Cortisol ist ein Steroidhormon, wird im Blut an Transcortin gebunden transportiert und wirkt auf Körperzellen über die Bindung am intrazellulären Glucocorticoidrezeptor. Der Hormon-Rezeptor-Komplex transloziert nach Hormonbindung in den Zellkern, bindet dort an die Desoxyribonukleinsäure (DNA, „desoxyribonucleic acid“) und wirkt als Transkriptionsfaktor auf die Aktivierung oder Unterdrückung vielzähliger Gene, auch als Transaktivierung oder Transrepression bezeichnet. Das Protein des Glucocorticoidrezeptors wird durch das Gen NR3C1 auf Chromosom 5q31-32 kodiert. Im Rahmen der DNA-Replikation kann es zum Auftreten von Mutationen kommen, wobei nicht-homologe Basen in den DNA-Strang eingelagert werden. Genetisch stabile, häufig vorkommende (>1 % Prävalenz in der Bevölkerung) Mutationen, bei denen einzelne Basen verändert vorliegen, werden als Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, „single nucleotid polymorphism“) bezeichnet. SNPs des Glucocorticoidrezeptors verändern unter anderem seine Transaktivierungskapazität und führen so zu einer modifizierten Rezeptorantwort (45).

Die SNPs N363S (rs56149945 (= Referenz SNP ID Nummer)) und *BclI* (rs41423247) führen zu einer Erhöhung der Sensitivität des Glucocorticoidrezeptors gegenüber Cortisol (46). Der SNP N363S befindet sich auf Codon 363 des Exon 2 und verursacht durch die Basenänderung (AAT → AGT) eine Aminosäureänderung von Asparagin (N) zu Serin (S) (47). In verschiedenen Populationen zeigten Träger des SNPs N363S höhere Body-Mass-Indices (BMI, Körpermasseindex) (47, 48), sowie erhöhte Waist-to-Hip-Ratios (Taille-Hüft-Verhältnis) (49), LDL (low density lipoprotein, Lipoprotein geringer Dichte) und Triglyzerid-Werte (50). Der SNP *BclI* wurde ursprünglich als Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) entdeckt und nach dem dort schneidenden Restriktionsenzym *BclI* benannt(51). Bei diesem SNP führt eine Basenänderung im Intron 2 (C → G) zur einer Aminosäureänderung von Cytosin (C) zu Guanin (G) (52). Das mutierte Allel des SNPs N363S führt gegenüber dem Wildtyp zu einer erhöhten Transaktivierung des Glucocorticoidrezeptor-Gens (53). *BclI* zeigte in zahlreichen in vivo Studien ebenfalls eine Korrelation zu erhöhten BMI-Werte, höheren Waist-to-Hip-Ratios (54) sowie einer ausgeprägteren stammbetonten Adipositas (55). Außerdem zeigten van Rossum et al. in *BclI*-Trägern niedrigere Serumcortisolwerte nach einem 1 mg-DST (52). Studien in Cushing-Kohorten zeigten Korrelationen zwischen dem *BclI*-Polymorphismus und einer reduzierten Knochendichte (56, 57), einem höheren BMI (58) und einer ausgeprägteren Fatigue (59).

Im Zusammenhang mit den Polymorphismen ER22/23EK (rs6189/rs6190) und A3669G (rs6198) konnte in Studien eine verminderte Glucocorticoidsensitivität bei reduzierter Transaktivierungskapazität nachgewiesen werden (46, 53, 60). Der ER22/23EK-Polymorphismus liegt im Bereich der Codone 22 und 23 einer Transaktivierungsdomäne des Glucocorticoidrezeptors und führt durch veränderte Basen (GAG AGG → GAA AAG) zu einer Aminosäureänderung (Glutaminsäure-Arginin (ER) → Glutaminsäure-Lysin (EK)) (60). Träger des mutierten Allels des SNP ER22/23EK zeigten ein insgesamt günstigeres metabolisches Profil bei niedrigeren Gesamtcholesterol- und LDL-Werten und einer verminderten Insulinsensitivität (60). Männliche Träger waren größer, stärker und hatten einen größeren Anteil fettfreier Körpermasse (61). Der SNP A3669G (häufig auch benannt als SNP „GR-9β“) ist innerhalb einer „ATTTA Sequenz“ des Exons 9β lokalisiert und die Basenänderung (ATTTA → GTTTA) führt zu einer Destabilisierung der mRNA und der Rezeptorproteinexpression mit verminderter Sensitivität gegenüber Cortisol (62). In vivo Studien zeigten einen Zusammenhang zu niedrigeren Waist-to-Hip-Ratios in Frauen und niedrigeren Cholesterolverwerten in Männern und einer geringeren Prävalenz von Typ 2 Diabetes Mellitus trotz erhöhter Cortisolwerte im Serum (63, 64). Studien in Cushing-Kohorten beobachteten eine Korrelation zwischen dem SNP A3669G und einer verminderten Prävalenz für Diabetes Mellitus Typ 2 (64) sowie höheren systolischen Blutdruckwerten (65).

## 1.5 Ziel der Studie

Das Auftreten und die Ausprägung der Symptome des CS wie die proximale Myopathie zeigen große interindividuelle Unterschiede in Cushing-Patienten. Bisherige Studien konnten keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Länge und Höhe des Cortisolexzesses und dem Ausmaß der Muskelschwäche feststellen (66). Dieser fehlende Zusammenhang spricht für das Vorliegen weiterer Einflussfaktoren, die die Auswirkungen des Cortisols im Sinne einer veränderten Sensitivität beeinflussen könnten. Das Ziel unserer Studie war es, zu analysieren, ob verschiedene Polymorphismen des Glucocorticoidrezeptors mit einer verminderten Muskelkraft in Patienten mit CS korrelieren und in Folge einen Erklärungsansatz für interindividuell unterschiedliche Ausprägungen der Myopathie liefern könnten.

## 2 METHODIK

### 2.1 Studiendesign und -population

Wir führten diese Studie im Rahmen des Deutschen Cushing Registers CUSTODES durch. Das Deutsche Cushing Register wurde 2012 in München gegründet und wird seit 2013 von der Else-Kröner-Fresenius-Stiftung gefördert. Für das Register werden Cushing-Patienten an mehreren großen Kliniken Deutschlands rekrutiert (München, Tübingen, Würzburg, Berlin, Düsseldorf, Dresden, Erlangen), um Studien zur Verbesserung der Diagnostik, Therapie und des Outcomes des CS zu ermöglichen. Es werden je nach Möglichkeit die gesamten Krankheitsverläufe der Patienten ab Diagnosestellung erhoben. Außerdem werden die Patienten auch nach erfolgreicher operativer Therapie noch weiterhin mindestens einmal jährlich visitiert, um Studien zum Outcome des CS nach Remission zu ermöglichen. In der Cushing-Ambulanz am Standort München werden darüber hinaus Patienten rekrutiert, die sich initial mit Verdacht auf ein CS vorstellen, bei denen dieses Krankheitsbild aber im Verlauf diagnostisch ausgeschlossen werden kann.

Für unsere Studie schlossen wir Cushing-Patienten der Standorte München, Würzburg und Berlin ein. Somit ergab sich ein multizentrisches Studiendesign. Wir beschränkten uns für diese Studie auf Patienten mit endogenem CS hypophysärem oder adrenalen Ursprungs. Patienten mit ektopem oder exogen induziertem CS und Patienten mit Nebennierenkarzinom wurden nicht eingeschlossen. Als verbindliche Einschlusskriterien musste bei allen Patienten die Muskelkraft bestimmt und eine Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Vollblut-Probe zur Genotypisierung abgenommen worden sein. Die Patienten wurden unabhängig von ihrem aktuellen Krankheitsstatus eingeschlossen. Somit ergab sich eine gemischte Patientenkohorte aus Patienten mit erstdiagnostiziertem oder rezidivierendem CS, jüngst operierten Patienten (Remission < 2 Jahre) und auch aus Patienten in bereits langjähriger Remission (Remission > 2 Jahre). Es ergab sich eine finale Studienkohorte aus 205 Patienten (München, n = 141; Berlin, n = 37; Würzburg, n = 27). Der Rekrutierungszeitraum aller Patienten lag zwischen 2012 und 2017.

Als zusätzliche Vergleichskohorte schlossen wir ebenfalls das in München rekrutierte Patientenkollektiv ein, bei denen ein CS ausgeschlossen worden war (weiterhin bezeichnet als: „Ausschluss Cushing“, n = 125).

Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis. Das Studienprotokoll wurde von den Klinischen Ethik-Komitees der beteiligten Studienzentren akzeptiert (Ludwig-Maximilians-

Universität München Projekt-Nr. 152-10; Ethik-Kommission der Berliner Ärztekammer Eth-S-Q/14, Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät Würzburg Zeichen 85/12).

## 2.2 Gruppeneinteilung

Bei allen eingeschlossenen Patienten verwendeten wir die Daten, die zum Zeitpunkt des „Registereinschlusses“ erhoben worden waren. Das Vorliegen, bzw. der Ausschluss eines CS wurde anhand der oben genannten Screening-Tests (24h-UFC, 1 mg-DST und Cortisolmessung im Mitternachtsspeichel) ermittelt. Je nach Testergebnissen unterteilten wir die Cushing Kohorte in eine Gruppe mit bestehendem Hypercortisolismus („florides CS“) und in eine Gruppe mit laborchemisch normwertigen Testergebnissen („CS in Remission“). In diese Gruppe wurden auch Patienten nach erfolgreicher uni-/ bilateraler Adrenalektomie eingeteilt, die durch eine Hormonersatztherapie mit Hydrocortison zum Teil erhöhte Cortisolwerte zeigten. Die „Ausschluss-Cushing“ Gruppe kennzeichnete sich ebenfalls durch Screening-Tests im Normbereich.

## 2.3 Klinische und laborchemische Parameter

Zur Evaluierung der Muskelkraft führten wir zwei etablierte Tests durch (67, 68): Der „Chair Rising Test“ (CRT, „Aufstehetest“) dient zur Bestimmung der Muskelkraft der unteren Extremitäten, insbesondere der Gluteal- und Oberschenkelmuskulatur. Bei diesem Test muss ein Patient von einem Stuhl ohne Zuhilfenahme der Arme fünfmal in Folge aufstehen und sich wieder setzen (69). Die Zeit wird bis zum letzten Mal Aufstehen gestoppt, eine Dauer von über zehn Sekunden gilt als auffällig im Sinne einer vorliegenden Muskelschwäche. Als zweiten Test führten wir eine Handkraftmessung mit einem JAMAR® Dynamometer (Lafayette Instrument Company, USA) durch (67). Der Test ermittelt die maximale Griffkraft und somit die Kraft der Flexorenloge des Unterarms. Die Durchführung erfolgte auf jeder Seite dreimal. Im Anschluss ermittelten wir daraus den Mittelwert und berechneten anhand der Normwerte des JAMAR Benutzerhandbuchs nach Alter und Geschlecht die „vergleichbare prozentuale Handkraft“ (70).

Zur weiteren Untersuchung von Korrelationen und zur Charakterisierung der Patientenkohorten erhoben wir weitere soziale (Alter, Geschlecht), anthropometrische (Körpergröße, -gewicht, BMI, Hüft-, Taillen-, Oberarmumfang), klinische (Blutdruck, Puls) und laborchemische (Kalium, Calcium, HbA1C, Gesamtcholesterol, LDL, HDL (Lipoprotein hoher Dichte), Triglyzeride) Daten sowie anamnestische Informationen zum bisherigen Krankheitsverlauf, Medikamente, Komorbiditäten und Nikotinabusus.

## 2.4 Genotypisierung der Einzelnukleotid-Polymorphismen

### 2.4.1 DNA-Extraktion

Für diese Studie wurden die folgenden Einzelnukleotid-Polymorphismen des Glucocorticoidrezeptor-Gens untersucht: A3669G, *BclII*, N363s und ER22/23EK. Zur Genotypisierung wurde DNA von jedem Patienten isoliert. Es erfolgte die einmalige Abnahme eines Röhrchen EDTA-Vollbluts, woraus wir unter Verwendung des QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) die DNA extrahierten. Wir richteten uns nach dem Protokoll des Herstellers und verwendeten eine 200 µl EDTA-Vollblut-Probe pro Patienten. Die chromosomale DNA wurde aus den im Blut vorhandenen kernhaltigen Zellen, vor allem aus peripheren Leukozyten, extrahiert. Zur Validierung der extrahierten DNA verwendeten wir stichprobenartig ein Nano-Drop Microvolume Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Die finalen DNA-Proben hatten einen durchschnittlichen DNA-Gehalt von 30 ng/µl.

### 2.4.2 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymorphismen *BclII*, N363S und ER22/23EK analysierten wir mit den Methoden der konventionellen Polymerasekettenreaktion (PCR) und des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP). Wir richteten uns nach dem bereits etablierten Protokoll von Trementino et al. (64), das wir im Verlauf leicht modifizierten: Für die PCR verwendeten wir 10 µl anstelle von 50 µl Ansätzen und amplifizierten diese in 35 anstelle von 30 Zyklen. Trementino et al. verwendeten zur Hydrolyse des SNPs N363S das Restriktionsenzym Tsp509I (64). Dieses wurde von New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA) durch das Enzym MluCI ersetzt, welches wir verwendeten.

Als Vorbereitung der Genotypisierung über den RFLP erfolgte zunächst die Durchführung einer konventionellen PCR mit jeweils zwei spezifischen gegenläufigen Primern, zur Amplifizierung des DNA-Abschnitts, auf dem die zu untersuchende Punktmutation liegt. Die verwendete Primer-Sequenzen, nach dem Protokoll von Trementino et al. (64), und die daraus resultierenden Längen der DNA Fragmente sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Primersequenzen, Hybridisierungstemperaturen und Längen der amplifizierten DNA-Matrizen

Einzelnukleotid-Polymorphismus	Sequenzen der spezifischen Primer	Temperatur der Primerhybridisierung	Länge der amplifizierten DNA-Matrizen in Basenpaaren (bp)
BclI	F 5'- TGCTGCCTTATTTGTAAATTCGT-3' R 5'- AAGCTTAACAATTTTGGCCATC-3'	55°C	335 bp
N363S	F 5'- AGTACCTCTGGAGGACAGAT-3' R 5'- GTCCATTCTTAAGAAACAGG-3'	58°C	248 bp
ER22/23EK	F 5'- CGGAGTTAACTAAAAGGTTC-3' R 5'- GGGTTTTATAGAAGTCCATC-3'	56°C	225 bp

Für die Durchführung der PCR verwendeten wir 10 µl Reaktionsansätze bestehend aus: 1 µl Green GoTaq® Reaction Buffer (0,5-fach) 0,8 µl MgCl<sub>2</sub> Lösung (25 mM, Magnesiumchlorid), 0,2 µl dNTP-Mix (je 10 mM, Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix), je 0,2 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (0,1 µM), 0,05 µl DNA-Polymerase (1,25 U), 1 µl DNA-Probe (30 ng/µl) und 6,55 µl Nuklease-freies Wasser. Die Amplifizierung der DNA erfolgte anschließend in einem Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) unter Verwendung des folgenden Amplifikationsprofils: initiale Denaturierung bei 94°C für 4 min, 35 Zyklen mit jeweils 30 s Denaturierung bei 94°C, 30 s spezifischer Primerhybridisierungs-Temperatur (siehe Tabelle 1) und 30 s Elongation bei 72°C, gefolgt von einer finalen Elongations-Phase bei 72°C für 7 Minuten.

### 2.4.3 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus

Im zweiten Schritt wandten wir die Methodik des RFLP an, um die amplifizierte DNA auf das Vorhandensein der SNPs zu untersuchen. Bei dieser Methodik wird die amplifizierte DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen hydrolysiert. Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die typspezifische Basensequenzen der DNA binden und die DNA im Anschluss an dieser Stelle zerschneiden. Die drei von uns untersuchten Polymorphismen *BclI*, N363S und ER22/23EK befinden sich jeweils innerhalb der Schnittstelle eines spezifischen Restriktionsenzym. Liegt die DNA als Wildtyp vor, wird das amplifizierte PCR-Fragment durch das Restriktionsenzym hydrolysiert. Trägt die DNA das mutierte Allel, also eine andere Base, bleibt das DNA-Fragment in seiner ursprünglichen Länge erhalten.

Für die Hydrolyse pipettierten wir 20 µl-Ansätze, bestehend aus: einem spezifischen Restriktionsenzym, einem Enzym-spezifischem Puffer, 3 µl PCR-Produkte und Nuklease-freiem Wasser. Die Hydrolyse erfolgte anschließend im Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg,

Deutschland). Die verwendeten Restriktionsenzyme, Temperaturen und die Dauer der Hydrolyse sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Restriktionsenzyme, Puffer und Hydrolysetemperaturen des Restriktions-Längenpolymorphismus

Einzelnukleotid-Polymorphismus	Restriktionsenzyme und Puffer von New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA)	Temperatur der Hydrolyse
<i>Bcl</i> I	4 Einheiten <i>Bcl</i> I + 3.1 Puffer	50°C
N363S	4 Einheiten <i>Mlu</i> CI + CutSmart Puffer	37°C
ER22/23EK	4 Einheiten <i>Mn</i> II + CutSmart Puffer	37°C

#### 2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Im abschließenden Schritt erfolgte zur Auftrennung und Visualisierung der entstandenen DNA-Fragmente das Auftragen der Proben auf ein Agarosegel und die Durchführung einer Elektrophorese. Je nach Polymorphismus verwendeten wir 1,5 – 3 %ige Agarosegele bestehend aus: 40 ml TBE-Puffer (TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)-Borat-EDTA-Puffer), 0,6 – 1,2 g Agarose und 2 µl SYBR-Safe. Als DNA-Größenstandard verwendeten wir eine DNA Low Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA) und eine Low Range DNA Ladder (Jena Bioscience, Jena, Germany). Die Elektrophorese erfolgte bei 100 Volt in einer Elektrophoreseapparatursystem MGU-302 (C.B.S. Scientific Co., Del Mar, CA, USA). Die Bildgebung erfolgte mit einem Typhoon 8600 Variable Mode Imager (Amersham Biosciences, Little Chalfon Buckinghamshire, UK). Je nach Anzahl und Größe der sichtbaren DNA-Fragmente ließ sich auf den Genotyp der untersuchten DNA-Probe rückschließen. Die Abbildungen 1-3 zeigen exemplarisch Auswertungen der Gelelektrophoresen des SNPs *Bcl*I, ER22/23EK und N363S.

Beim SNP *Bcl*I resultiert aus der PCR ein 335 Basenpaar (bp) langes DNA-Segment. Im Bereich dieses Segments liegt eine Schnittstelle des Restriktionsenzym *Bcl*I, im Bereich des Restriktionsenzymsschnittstelle liegt wiederum der SNP *Bcl*I. Liegt die DNA auf beiden homologen Chromosomen als Wildtyp vor, schneidet das Enzym die gesamte DNA und in der Gelelektrophorese zeigen sich zwei kürzere Banden bei 114 und 221 bp Länge. Trägt der Genotyp die veränderte Base der Punktmutation, kann die DNA nicht hydrolysiert und das 335 bp lange DNA-Segment bleibt unverändert vorhanden. Je nachdem ob die Mutation auf beiden homologen Chromosomen oder nur auf einem vorliegt, zeigen sich in der Gelelektrophorese entweder 1 Bande bei 335 bp im Falle einer homozygot vorliegenden Mutation oder 3 Banden bei 114, 221 und 335 bp Länge bei einer heterozygot vorliegenden Mutation.

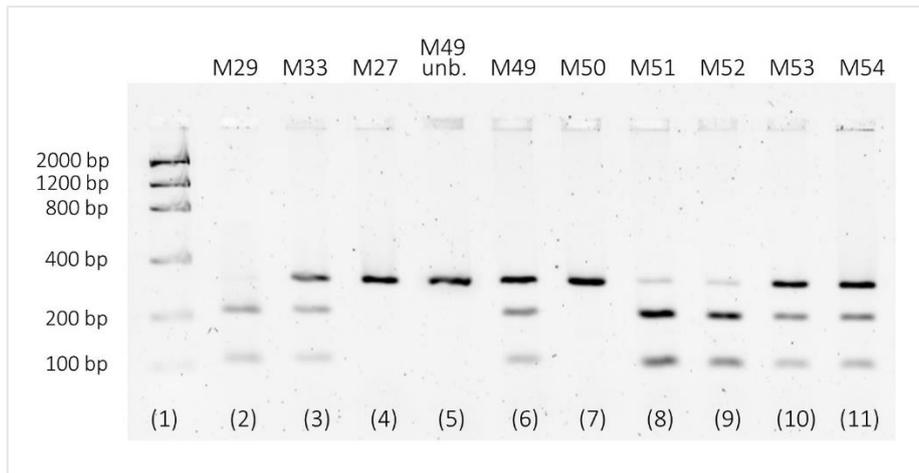


Abbildung 1: **Gelelektrophorese der amplifizierten und hydrolysierten DNA des SNPs *BclI*.** Spur 1 = Molekulargewichtsstandard. Oben stehen die Pseudonyme der verwendeten Patientenproben. Träger des Wildtyp-Allels zeigen 2 Bänder bei 114 und 221 Basenpaaren (M29, M51, M52). Heterozygote Träger des mutierten Allels zeigen 3 Bänder bei 114, 221 und 335 Basenpaaren (M33, M49, M53, M54). Homozygote Träger des mutierten Allels zeigen 1 Bänder bei 335 Basenpaaren (M27, M50). In Spur 5 wurde eine amplifizierte, noch nicht hydrolysierte DNA-Probe aufgetragen, diese zeigt 1 Bänder bei 335 Basenpaaren (M49 unb.(unbehandelt)).

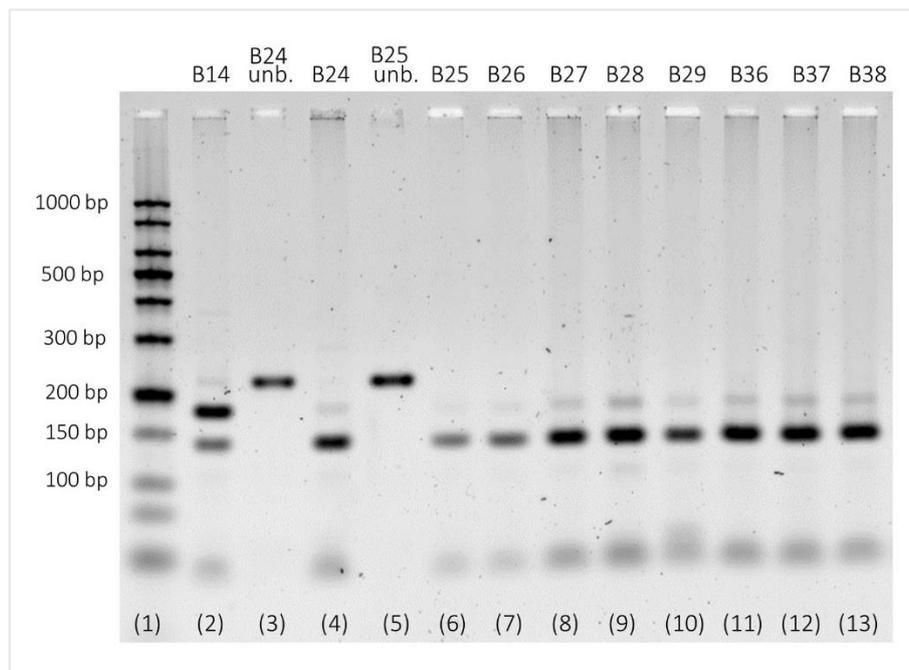


Abbildung 2: **Gelelektrophorese der amplifizierten und hydrolysierten DNA des SNPs *ER22/23EK*.** Spur 1 = Molekulargewichtsstandard. Oben stehen die Pseudonyme der verwendeten Patientenproben. Träger des Wildtyp-Allels zeigen 1 Bänder bei 143 Basenpaaren (B24-B29, B36-B40). Heterozygote Träger des mutierten Allels zeigen 2 Bänder bei 143 und 187 Basenpaaren (B14). Homozygote Träger des mutierten Allels wurden in unserer Studie nicht ermittelt. In Spur 3 und 5 wurden amplifizierte, noch nicht hydrolysierte DNA-Probe aufgetragen, diese zeigen 1 Bänder bei 225 Basenpaaren (B24 unb. (unbehandelt), B25 unb.).

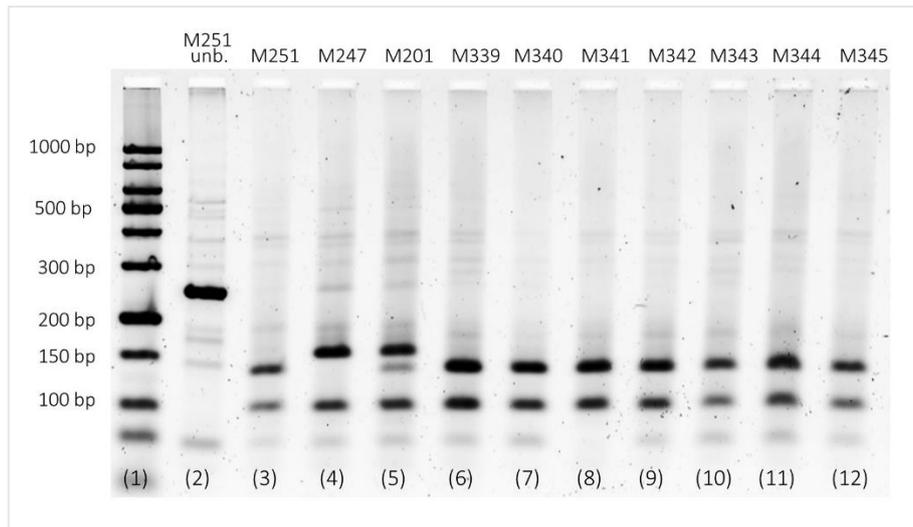


Abbildung 3: **Gelelektrophorese der amplifizierten und hydrolysierten DNA des SNPs N363S.** Spur 1 = Molekulargewichtsstandard. Oben stehen die Pseudonyme der verwendeten Patientenproben. Träger des Wildtyp-Allels zeigen 2 Banden bei 95 und 134 Basenpaaren (M251, M339-M345). Heterozygote Träger des mutierten Allels zeigen 3 Banden bei 95, 134 und 153 Basenpaaren (M201). Homozygote Träger des mutierten Allels zeigen 2 Banden bei 95 und 153 Basenpaaren (M247). In Spur 1 wurde eine amplifizierte, noch nicht hydrolysierte DNA-Probe aufgetragen, diese zeigt 1 Bande bei 248 Basenpaaren (B24 unb. (unbehandelt), B25 unb.).

#### 2.4.5 Duplex-Real-Time TaqMan PCR

Zur Genotypisierung des Polymorphismus A3669G führten wir eine Real-Time PCR mit Verwendung des TaqMan® SNP Genotyping Assays der ID C\_\_\_8951023\_10 (applied Biosystems by Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA). Der entscheidende Unterschied zur konventionellen PCR liegt darin, dass bei der Real-Time-PCR bereits während der Amplifizierung die Detektion und Quantifizierung der vervielfältigten DNA-Matrizen erfolgt. Es werden dem PCR-Ansatz, neben den zwei spezifischen Primern auch zwei TaqMan Sonden hinzugefügt, die am 3'-Ende ein Fluorophor (Reporter) und am 5'-Ende einen nicht-fluoreszierenden Quencher tragen. Die beiden TaqMan Sonden binden spezifisch an die DNA; sie tragen ein jeweils unterschiedliches fluoreszierendes Farbstoff-Molekül: das Wildtyp-Allel trägt den FAM™ Farbstoff (=6-Carboxyfluorescein), während das mutierte Allel den VIC® Farbstoff trägt (=2'-Chloro-7'phenyl-1,4-dichloro-6-carboxy-fluorescein).

Die Taq-DNA-Polymerase besitzt neben ihrer Polymeraseaktivität zur Replikation eine 5'-3'-Exonukleasefunktion. Nach DNA-Denaturierung lagern sich sowohl die beiden spezifischen Primer als auch die passende TaqMan-Sonde an den separierten DNA-Einzelstrang an. Die Taq-Polymerase beginnt die Elongation von beiden Primern aus bis Erreichen der TaqMan-Sonde. Diese spaltet sie durch ihre Exonukleaseaktivität. Dabei wird das Fluorophor vom Quencher-Molekül getrennt und emittiert durch die Anregung Licht in der erwarteten

Wellenlänge, welches durch die optischen Detektoren des PCR-Cyclers gemessen werden kann (71). Da für das Wildtyp- und das mutierte Allel zwei unterschiedliche Fluoreszenz-Farbstoffe verwendet werden, kann über die Frequenz der Wellenlänge rückgeschlossen werden, welche TaqMan-Sonde an die DNA gebunden hat und welcher Genotyp bei der untersuchten Probe entsprechend vorliegt.

Für die Duplex-Real-Time TaqMan PCR pipettierten wir 20 µl Ansätze, bestehend aus: 50ng DNA, 12,5 µl TaqMan MasterMix (2-fach), 1,25 µl Assay Working Stock (10-fach, =Primer-Probe-Mix), Nuklease-freiem Wasser. Die Amplifizierung erfolgte in einem BioRad iCycler (Hercules, California, USA) nach dem Schema: initiale Denaturierung bei 95 °C für 10 min, gefolgt von 40 Zyklen mit jeweils Denaturierung bei 95 °C für 15 s und Elongation bei 60 °C für 1 min. Über die iQ5-Software erfolgte im Anschluss die *post PCR-read allelic discrimination plot* Analyse. Dabei wird anhand der ermittelten Fluoreszenzsignale in einem Diagramm angegeben, welche Proben welchen Genotyp entsprechen.

Abbildung 4 zeigt die Zunahme der gemessenen Fluoreszenz-Signale für die Farbstoffe FAM<sup>TM</sup> (Wildtyp) und VIC<sup>®</sup> (mutiertes Allel) in relativen Fluoreszenz-Einheiten (RFU, „relative fluorescent units“). Die Kurven entsprechen der Zunahme der amplifizierten DNA-Matrizen. Im Diagramm des Farbstoffs FAM ist der Unterschied zwischen Kurven mit steilem Anstieg (homozygoter Wildtyp) und Kurven mit flachem Anstieg ersichtlich (heterozygot mutiert, nur 1 DNA-Strang als Wildtyp vorliegend). Kein Anstieg der Kurve, bedeutet, dass dieses Allel bei einem Genotyp nicht vorliegt und somit nicht amplifiziert wird. Der *post PCR-read allelic discrimination Plot* in Abbildung 5 zeigt das Diagramm über die Allel-Zuordnung der untersuchten Proben, dass aus den Messungen der RFU-Werten beider Fluoreszenzfarbstoffe generiert wurde.

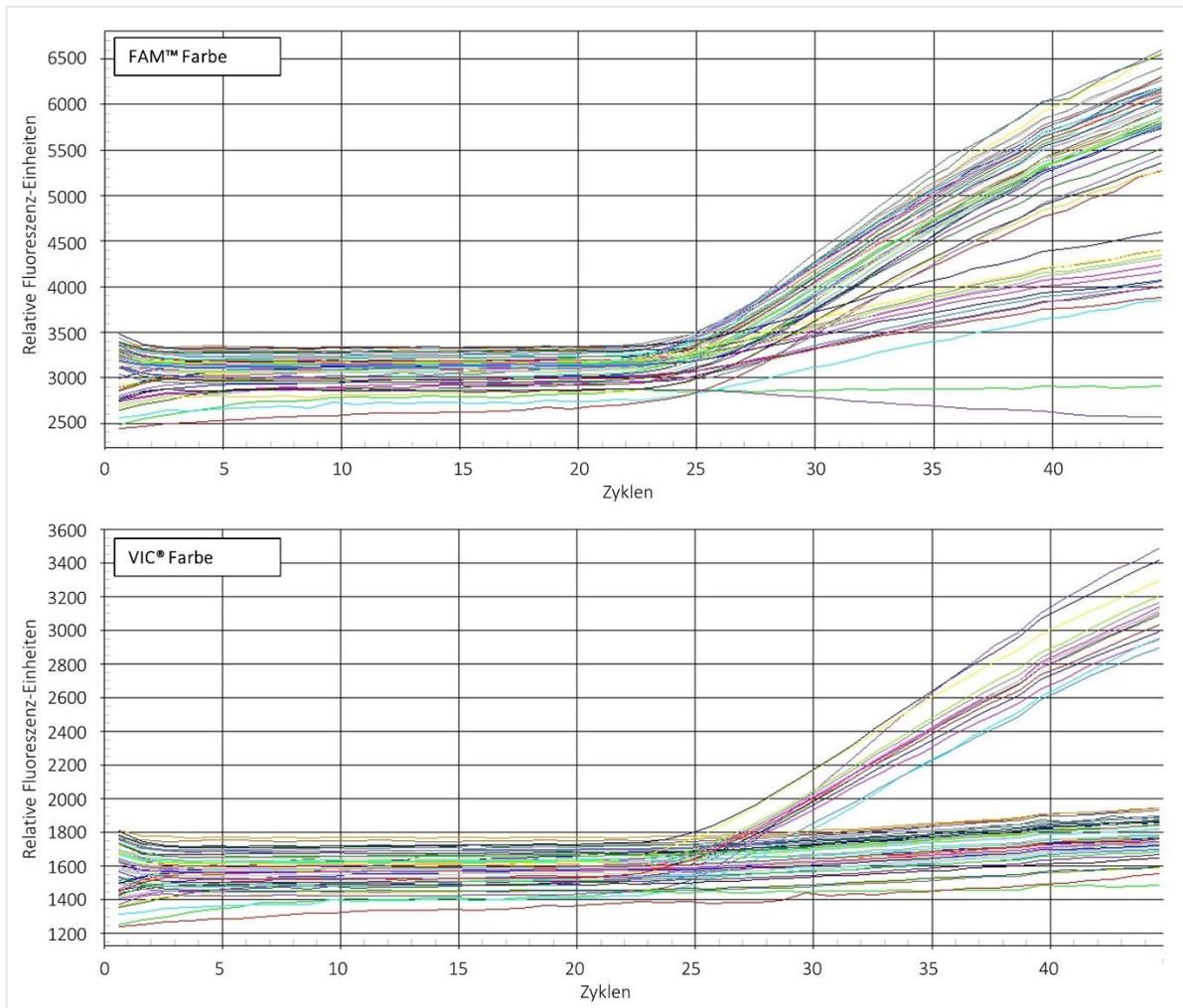


Abbildung 4: **Amplifikationskurven der Fluoreszenz-Signale einer Duplex-Real-Time TaqMan PCR (Polymerase-Kettenreaktion).** Im oberen Diagramm ist die Amplifikation des Farbstoffs FAM™ (Wildtyp-Allel), im unteren Diagramm des Farbstoffs VIC® (mutiertes Allel) in RFU („relative fluorescent units“, relative Fluoreszenz-Einheiten) dargestellt. Die Kurven entsprechen der Zunahme der amplifizierten DNA-Matrizen.

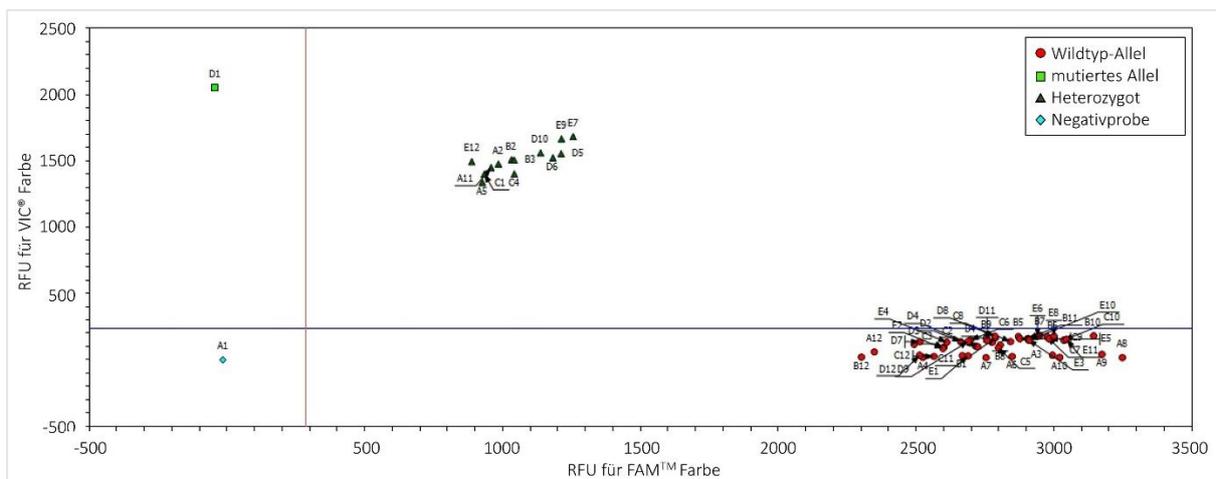


Abbildung 5: **Beispiel eines allelic discrimination plot.** Rote Punkte sind Träger des Wildtyp-Allels (z.B. A12, D8, E4). Schwarze Dreiecke sind heterozygote Träger des mutierten Allels (z.B. A2, B2, D10). Grüne Quadrate sind homozygote Träger des mutierten Allels (D1). Die blaue Raute ist eine Negativprobe ohne DNA-Gehalt.

#### 2.4.6 Genotypen-basierte Patientenklassifizierung

In Tabelle 3 (siehe ERGEBNISSE, 3.1 Allel-Häufigkeiten) sind die ermittelten Allel-Häufigkeiten der in unserer Studie analysierten Patientenkohorten dargestellt. In der Betrachtung der analysierten Genotypen zeigte sich insbesondere bei den SNPs ER22/23EK und N363S eine insgesamt niedrige Prävalenz hetero- und homozygoter Träger der mutierten Allele. Aus diesem Grund fassten wir für die Betrachtung von Korrelationen die Gruppen der homozygoten und heterozygoten Träger der mutierten Allele als „Minor Allel Träger“ zusammen.

Aufgrund der geringen Größe der Studienpopulation untersuchten wir die SNPs nur separat auf mögliche vorliegende Korrelationen. Die Untersuchung von Haplotypen, bei denen mehrere SNPs in einem Genotyp kombiniert auftreten, wurde in dieser Studie nicht durchgeführt.

#### 2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Betrachtung erfolgte mit Hilfe der Software IBM SPSS Statistics 25 (Armonk, New York, USA). Im Rahmen der deskriptiven Statistik untersuchten wir die Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilks Test,  $p > 0,05$ . Deskriptive Daten sind für nicht-normalverteilte Daten als Median und Spannweite und für normalverteilte Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung präsentiert. Zur Untersuchung auf Vorliegen einer Signifikanz wählten wir die Tests für unverbundene Stichproben. Für nicht-normalverteilte Daten wandten wir einen Mann-Whitney-U Test an, für normalverteilte Daten einen t-Test für unverbundene Stichproben. Nominalskalierte Daten untersuchten wir mit dem  $\chi^2$  Test und dem Kruskal-Wallis-Test. Unterschiede wurden ab einem  $p < 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Allel-Häufigkeiten

Tabelle 3 zeigt die in unserer Studie ermittelten Allel-Häufigkeiten der analysierten Patientenkohorten, sowie als Referenz die Allel-Häufigkeiten des Sequenzierungsprojekts TOPMed des *National Heart, Lung, and Blood Institute* mit einer globalen Vergleichspopulation (72). Die Betrachtung der Genotypen in Abhängigkeit zum Vorliegen eines CS ergab bei allen SNPs keine Korrelation zwischen dem Vorliegen eines Genotyps und dem Auftreten des CS (p-Werte der Vergleiche zwischen Cushing-Patienten und der „Ausschluss-Cushing“-Kohorte für die jeweiligen SNPs: *BcII*:  $p=0,287$ , ER22/23EK:  $p = 0,380$ , N363S:  $p = 0,358$ , A3669G:  $p = 0,518$ ).

Tabelle 3: Allel-Häufigkeiten des mutierten Allels der Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) *BcII*, N363S, ER22/23EK und A3669G in Patienten mit Cushing-Syndrom, in der „Ausschluss-Cushing“-Kohorte und in der globalen Vergleichspopulation „TOPMed“ des *National Heart, Lung, and Blood Institute* (72).

SNP	Cushing-Patienten (n = 205)	„Ausschluss-Cushing“ (n = 125)	TOPMed (n = 125568)
<i>BcII</i>	32,2 %	36,8 %	30,38 %
N363S	3,2 %	4,4 %	1,87%
ER22/23EK	2,45%	3,6 %	1,57%
A3669G	15,35 %	18,80%	11,26%

#### 3.1 Charakterisierung der Patienten-Kohorten

Im Rahmen dieser Studie analysierten wir zwei unabhängige Patientengruppen: eine Kohorte, bestehend aus Patienten mit floridem CS bzw. in Remission nach Cushing-Syndrom, sowie eine Patientenkohorte, die sich mit typischen Cushing-Symptomen präsentierte, bei denen das Syndrom aber im Verlauf ausgeschlossen wurde. Es wurde kein Matching im Sinne einer paarweisen Zuordnung zwischen den beiden Gruppen durchgeführt, um die Populationsgröße für eine höhere Aussagekraft der genetischen Analysen nicht zu dezimieren. Dementsprechend unterschieden sich beide Kohorten in folgenden Punkten signifikant: Die „Ausschluss-Cushing“-Kohorte war jünger (36 vs. 51 Jahre,  $p < 0,001$ ) und übergewichtiger (BMI: 34,2 vs. 27,2 kg/m<sup>2</sup>,  $p < 0,001$ ) und zeigte höhere Umfänge der Hüfte (116 vs. 103 cm,  $p < 0,001$ ) und Taille (108 vs. 98 cm,  $p < 0,001$ ), bei niedrigerem Waist-to-Hip-Ratio (0,91 vs. 0,94,  $p=0,048$ ). Die Cushing Kohorte präsentierte ein schlechteres metabolisches Profil mit höheren Werten für HbA1C (5,6 vs. 5,3 %,  $p < 0,001$ ), Gesamtcholesterol (209 vs. 198 mg/dL,  $p < 0,001$ ) und LDL (123 vs. 119 mg/dL,  $p = 0,042$ ). In Bezug auf die Muskelkraft zeigten beide Kohorten ähnliche Werte für die genormte Griffstärke der dominanten und der nicht-dominanten Hand. Die „Ausschluss

Cushing“ Patienten zeigten eine bessere Performance beim CRT (7 vs. 8 s,  $p < 0,001$ ), im Sinne einer geringeren Muskelschwäche.

Eine weitere Charakterisierung der Studienpopulation erfolgte nach den beiden Subgruppen den „floriden CS“-Patienten und der Cushing-Patienten in Remission: Patienten mit aktivem CS zeigten insbesondere höhere Blutdruck- (systolisch: 141 vs. 132,3 mmHg,  $p < 0,001$ ; diastolisch: 89,8 vs. 82,7 mmHg,  $p < 0,001$ ) und HbA1C-Werte (5,7 vs. 5,5 %,  $p = 0,046$ ). Die Performance in den Tests zur Bestimmung der Muskelkraft war in beiden Gruppen ähnlich.

### 3.2 Korrelationen der Muskelkraft zum SNP A3669G

In unserer Studie zeigten sich signifikante Unterschiede in der vergleichenden Betrachtung der Träger des A3669G Polymorphismus und der Griffstärke. Bei Betrachtung der gesamten Cushing-Kohorte zeigten Träger des mutierten Allels eine stärkere Griffkraft beider Hände als Träger des Wildtyp-Allels (dominante Hand: 99 vs. 89 %,  $p = 0,013$ ; nicht-dominante Hand: 105 vs. 91 %,  $p = 0,032$ ; entspricht Abbildung 1a der Publikation (73)). In der Subgruppe der Patienten mit hypophysärem CS zeigten ebenfalls die Träger des A3669G Polymorphismus eine stärkere Kraft der dominanten Hand. Bei Patienten mit adrenalem CS sahen wir diesen Unterschied nicht (dominante Hand: 107 vs. 89 %,  $p = 0,169$ ; nicht-dominante Hand: 105 vs. 91 %,  $p = 0,032$ ; siehe Abbildung 1a der Publikation). Bei Betrachtung der Cushing-Patienten nach Krankheitsstatus zeigten sich die selben signifikanten Unterschiede in der Handkraft nur in der Gruppe der Patienten mit floridem CS: Träger des Wildtyp-Allels zeigten eine beeinträchtigte Griffstärke beider Hände im Vergleich zu Trägern des Polymorphismus (dominante Hand: 86 vs. 101 %,  $p = 0,006$ ; nicht-dominante Hand: 89 vs. 104 %,  $p = 0,021$ ; entspricht Abbildung 2 der Publikation (73)). In der „Ausschluss-Cushing“-Kohorte unterschied sich die Griffstärke nicht in Abhängigkeit zum Vorliegen des A3669G Polymorphismus. Der CRT zeigte in keiner der Cushing-Kohorten eine Korrelation zum SNP A3669G.

In der „Ausschluss-Cushing“-Gruppe sahen wir keinen Zusammenhang zwischen dem SNP A3669G und der Handkraft (dominante Hand: 93 vs. 90 %,  $p = 0,487$ ; nicht-dominante Hand 92 vs. 87 %,  $p = 0,432$ ; dargestellt in Abbildung 1b unserer Publikation (73)), jedoch zeigten Träger des mutierten Allels dieses SNPs einen besseren Wert im CRT im Vergleich zu den Wildtyp-Trägern (7 vs. 6 s;  $p = 0,046$ ). Hier zeigte sich aber auch, dass Träger des A3669G Polymorphismus signifikant jünger waren als die Patienten mit dem Wildtyp-Allel ((32 vs. 39 a,  $p = 0,057$ ).

### 3.3 Korrelationen der Muskelkraft zu den SNPs ER22/23EK, N363S und *BclI*

Die Betrachtungen der SNPs ER22/23EK, N363S und *BclI* in der CS und der „Ausschluss-Cushing“-Kohorte ergaben keine Korrelationen im Bezug zur Muskelkraft. Jedoch zeigte sich ein Unterschied der Griffstärke bei geschlechterspezifischer Betrachtung des SNP ER22/23EK: In männlichen Patienten mit CS (n = 50) zeigten Träger des Wildtyp-Allels eine reduzierte Handkraft im Vergleich zu Trägern des mutierten Allels (dominante Hand: 87 vs. 108 %, p = 0,049; nicht-dominante Hand: 87 vs. 116 %, p = 0,027, dargestellt in Abbildung 3 der Publikation (73)).

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Klinische Relevanz

Eine Vielzahl der Patienten mit CS erfährt im Verlauf ihrer Erkrankung eine progrediente Muskelschwäche, insbesondere der proximalen Muskelpartien (33-36). Wie bereits einleitend dargestellt, induzieren erhöhte Glucocorticoidspiegel über vielzählige Mechanismen einen Muskelschwund und führen somit zur Cortisol-induzierten Myopathie (39, 74). Jedoch steht das Ausmaß der Muskelschwäche nicht im alleinigen Zusammenhang zur Höhe der Cortisolspiegel. SNPs des Glucocorticoidrezeptor-Gens verursachen nachweislich eine Modifizierung der Rezeptorantwort auf Cortisol und führen somit zu einer veränderten Glucocorticoidsensitivität (45). In dieser Studie haben wir einen möglichen Einfluss der SNPs des Glucocorticoidrezeptors auf den Ausprägungsgrad der Myopathie in Cushing-Patienten untersucht. Zur vergleichenden Betrachtung untersuchten wir ebenfalls eine Kohorte ohne Hypercortisolismus.

Die allgemeine klinische Relevanz unserer Studie liegt insbesondere darin begründet, dass vergangene Studien belegt haben, dass eine reduzierte Muskelkraft mit einer erhöhten Mortalität und einer reduzierten Lebensqualität korreliert. Aus diesem Grund sollten Einbußen der körperlichen Fitness ernst genommen, deren Hintergründe evaluiert und nach möglichen Behandlungskonzepten gesucht werden.

In der Literatur finden sich bisher wenige vergleichbare Studien, die den Zusammenhang zwischen Polymorphismen des Glucocorticoidrezeptors und der Muskelkraft untersucht haben. Eine Studie von Ash et al. untersuchte den Einfluss von SNPs des Glucocorticoidrezeptors auf die Entwicklung der Muskelkraft nach Widerstandstraining. Die untersuchten SNPs

unterschieden sich jedoch von den unseren bis auf den SNP N363S, für den keine Korrelation nachgewiesen werden konnte (75).

Wir konnten im Rahmen dieser Studie eine Korrelation zwischen zwei der vier investigierten SNPs und der Muskelkraft in Form der gemessenen Griffstärke feststellen. Träger des mutierten Allels des SNP A3669G präsentierten in der Handkraftmessung normwertige und signifikant bessere Werte als Träger des Wildtyp-Allels, die im Vergleich eine deutlich reduzierte Griffkraft hatten. Somit präsentierten sich die Träger des A3669G-Polymorphismus ohne vorliegende Muskelschwäche, während diese bei den Wildtyp-Trägern vorlag. Wie zu Beginn geschildert, wurde in vergangenen Studien bei Trägern des SNP A3669G eine verminderte Sensitivität des Glucocorticoidrezeptors gegenüber Cortisol aufgezeigt (62-65). Trementino et al. zeigten in einer Studie mit einer Cushing-Kohorte eine signifikant niedrigere Prävalenz eines Diabetes Mellitus Typ 2 bei Trägern des SNP A3669G, die durch einen durch den SNP veränderten Cortisoleinfluss auf den Glukosestoffwechsel erklärt werden kann (64).

Unsere Ergebnisse bestätigen eine mögliche verminderte Sensitivität des Glucocorticoidrezeptors gegenüber Cortisol insofern, da die Träger des mutierten Allels eine bessere Muskelkraft präsentieren und sich somit ein protektiver Effekt der Mutation auf die durch den Glucocorticoidrezeptor induzierten Signalwege vermuten lässt.

Diesen geschilderten Unterschied sahen wir nur in Patienten mit CS, bzw. in Patienten mit floridem CS. In den Kohorten der Cushing-Patienten in Remission und der „Ausschluss-Cushing“-Patienten zeigten sowohl Träger des Wildtyp- als auch des mutierten Allels eine ähnlich beeinträchtigte Muskelkraft. Diese Betrachtung lässt vermuten, dass ein aus dem SNP resultierender protektiver Effekt erst bei pathologisch erhöhten Cortisolspiegeln ins Gewicht fällt. In Patientengruppen ohne bestehenden Hypercortisolismus ist die Griffstärke unabhängig des zugrundeliegenden A3669G-Polymorphismus beeinflusst.

Durch diese Ergebnisse und den belegten Zusammenhang zwischen Muskelkraft und Lebensqualität und Mortalität ist es naheliegend, dass Patienten mit einer ausgeprägten Myopathie dabei gefördert werden sollten, ihre Muskelkraft zu bewahren bzw. zu fördern. Die wirksamste Behandlung bei Muskelschwäche ist bisher nachweislich Krafttraining (76, 77). Patienten mit CS sind jedoch meist sehr kranke und im Alltag beeinträchtigte Menschen, die mitunter nicht in der Lage sind, eine Physiotherapie entsprechend auszuführen. Neben intensivierter Physiotherapie sollten weitere Methoden untersucht werden, die den Muskelabbau inhibieren und die Muskelmasse bewahren, wie zum Beispiel auch der gezielte Fokus auf eine eiweißreiche

Ernährung. Substanzen wie Myostatin-Antagonisten greifen in die durch Cortisol induzierten zellulären Signalwege ein und können eine daraus resultierende Myopathie vermindern (74).

Im Hinblick auf den SNP A3669G könnte es, im Sinne einer personalisierten Medizin, interessant sein, den Genotyp eines Cushing-Patienten zu bestimmen, um zu identifizieren, ob er zur Wildtyp-Träger-Gruppe ohne protektiven Muskelschutz gehört und bereits präventiv eine Physiotherapie erhalten sollte. Allerdings wird der Muskelmetabolismus durch eine Vielzahl von Faktoren beeinträchtigt, wie zum Beispiel Alter, Immobilität, Mangelernährung und Medikamente, so dass die alleinige Bedeutung und der Einfluss der SNPs weiter analysiert werden sollten (78).

Das Wissen über den zugrundeliegenden SNP-Trägerstatus könnte darüber hinaus aber auch für Patienten mit anderen Krankheitsbildern klinisch relevant sein, wenn bei den Krankheiten die Notwendigkeit für eine systemische oder infiltrative Cortisontherapie besteht. Wie oben erwähnt, tritt im Rahmen von längerfristigen, hochdosierten Therapien mit Corticosteroiden häufig ein exogen induziertes CS auf. Es könnte dann bereits vor Therapiebeginn evaluiert werden, welches Allel der Patient trägt und ob er präventiv ein muskelaufbauförderndes Training im Sinne einer Physiotherapie erhalten sollte. Um eine klinische Relevanz dieser Überlegung zu verifizieren, sollte jedoch zunächst eine ähnliche Studie in Patienten mit exogen induziertem CS durchgeführt werden.

Bezüglich des SNP ER22/23EK sahen wir in unserer Studie einen ähnlich protektiven Einfluss des mutierten Allels wie beim SNP A3669G. So hatten Träger des mutierten Allels eine normwertige Griffkraft, während Träger des Wildtyp-Allels eine signifikant reduzierte Griffstärke zeigten (73). Diesen Unterschied sahen wir nur in männlichen Patienten mit CS. Ein ähnliches Ergebnis dokumentierten van Rossum et al. in einer früheren Studie, bei der die Muskelkraft mittels Armzug und Hochsprung aus dem Stand gemessen worden war (61). Es bleibt unklar, warum der Unterschied in der Muskelkraft bisher nur in männlichen Patienten gesehen wurde. Möglicherweise fallen bei der insgesamt höheren Muskelmasse des männlichen Geschlechts interindividuelle Unterschiede weniger ins Gewicht. Der SNP ER22/23EK steht ebenso in einem Zusammenhang mit einer verminderten Cortisolsensitivität. Dafür sprechen auch die Ergebnisse einer weiteren Studie von van Rossum et al., bei der die SNP-Träger trotz höherer Cortisolspiegel nach einem 1mg-DST niedrigere Gesamtcholesterol- und LDL-Werte zeigten (60).

Die in unserer Studie nachgewiesenen Korrelationen zwischen den Polymorphismen des Glucocorticoidrezeptor-Gens und der Muskelkraft sahen wir in den Messungen der Griffstärke. Für den Aufstehetest ergaben sich in unserer Studie keine Korrelationen, obwohl die unteren Extremitäten und insbesondere deren proximale Muskelanteile bei der Cortisol-induzierten Myopathie typischerweise zuerst betroffen sind (35, 36). Es bleibt fraglich, wieso dieser Test also keine Korrelationen ähnlich der Griffkraft zeigte. Es ist offensichtlich, dass das Testergebnis des Aufstehetests stark von der persönlichen Motivation und dem geleisteten Energieaufwand des Patienten abhängt. Während wir die Griffkraft dreimal pro Seite evaluierten und daraus den Mittelwert bestimmten, wurde der Aufstehetest nur ein einziges Mal pro Patienten durchgeführt. Das erklärt eventuell größere aufgetretene interindividuelle Schwankungen. In der „Ausschluss-Cushing“ Kohorte sahen wir eine bessere Performance beim Aufstehetest bei Trägern des SNP A3669G im Vergleich zu den Wildtyp-Trägern (73). Jedoch zeigten sich die Wildtyp-Träger im Vergleich auch signifikant älter, was zu einer Verzerrung des Ergebnisses geführt haben könnte.

In Betrachtung der SNPs *Bcl1* und N363s des Glucocorticoidrezeptors konnten wir keine Korrelationen zur ermittelten Muskelkraft feststellen. Diese beiden SNPs sind, wie einführend erwähnt, mit einer erhöhten Glucocorticoidsensitivität und einem schlechteren metabolischen Profil assoziiert (46-59). Aus der fehlenden Korrelation zur Muskelkraft, lässt sich spekulieren, dass die durch Cortisol-induzierte Myopathie vielleicht auf einem Schwelleneffekt beruht und ab einem Cortisolwert einer bestimmten Höhe kein zusätzlich negativer Einfluss auf den Muskelabbau festgestellt werden kann.

## 4.2 Limitationen und weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen

Aus den Limitationen und Ergebnissen unserer Studie ergeben sich zahlreiche neue interessante Fragestellungen. Die Größe der von uns untersuchten Patientenkohorten war verhältnismäßig klein. Im Rahmen der geringen Allel-Häufigkeiten der SNPs ER22/23EK und N363S würde eine größere Studienpopulation die Chance auf signifikante Ergebnisse erhöhen. Außerdem wäre es, wie bereits erwähnt, interessant und von ausgesprochener Relevanz eine ähnliche Studie in Patienten mit exogen induziertem CS durchzuführen, da dies in der Gegenwart die häufigste Form des CS darstellt.

Die in unserer Studie verwendeten Tests für die Muskelkraft sind etablierte Tests, die häufig im klinischen Alltag angewandt werden (67, 68). Dennoch sind sie anfällig für interindividuelle Unterschiede und hängen in einem besonderen Maß von der persönlichen Motivation der

Probanden ab. Dadurch sind möglicherweise Testergebnisse interindividuell beeinflusst wurden. Es wäre von Interesse objektivere Maße für die Muskelkraft auf eine Korrelation zum Vorliegen von SNPs des Glucocorticoidrezeptors-Gens hin zu untersuchen, wie etwa die Bestimmung der Muskelmasse durch eine Bioimpedanzmessung oder eine Untersuchung der zellulären Strukturen in einer Muskelbiopsie. Ebenso wären longitudinale Studiendesigns interessant, die die Veränderung der körperlichen Fitness mit oder ohne gezieltes Krafttraining untersuchen.

Die körperliche Fitness ist weiterhin ein leicht modifizierbarer Faktor. Die Muskelkraft eines Menschen ist generell sehr variabel und kann durch Sport und gezieltes Krafttraining beeinflusst und gefördert werden. In unserer Studie fragten wir die Patienten weder nach ihrem Aktivitätsgrad noch nach ihrem subjektiven Empfinden einer eventuell vorliegenden Muskelschwäche. Es wäre spannend, in zukünftigen Studien den individuellen Fitnessgrad und die empfundene Lebensqualität einer Person als zusätzliche Variablen zu berücksichtigen.

In dieser Studie konnten wir aufzeigen, dass Polymorphismen des Glucocorticoidrezeptor-Gens mit der Muskelkraft in Patienten mit CS korrelieren und so einen möglichen Erklärungsansatz für interindividuelle Unterschiede der Muskelkraft unabhängig der Höhe der zugrundeliegenden Cortisolspiegel liefern.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Cushing H. The pituitary body and its disorders: clinical states produced by disorders of the hypophysis cerebri : an amplification of the Harvey lecture for December, 1910: Classics of Medicine Library; 1979.
2. Jameson JL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal Medicine, Twentieth Edition (Vol.1 & Vol.2): McGraw-Hill Education; 2018.
3. Nieman LK. Cushing's syndrome: update on signs, symptoms and biochemical screening. 2015;173(4):M33.
4. Etxabe J, Vazquez JA. Morbidity and mortality in Cushing's disease: an epidemiological approach. Clin Endocrinol (Oxf). 1994;40(4):479-84.
5. Boscaro M, Arnaldi G. Approach to the patient with possible Cushing's syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 2009;94(9):3121-31.
6. Wengander S, Trimpou P, Papakokkinou E, Ragnarsson O. The incidence of endogenous Cushing's syndrome in the modern era. Clin Endocrinol (Oxf). 2019;91(2):263-70.
7. Dörr HG, Wudy SA, Sippell WG. Leitlinie: Cushing-Syndrom. AWMF-Leitlinien-Register. 2010;Nr. 027/033.
8. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, Montori VM. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab. 2008;93(5):1526-40.
9. Paragliola RM, Papi G, Pontecorvi A, Corsello SM. Treatment with Synthetic Glucocorticoids and the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis. Int J Mol Sci. 2017;18(10).
10. Crapo L. Cushing's syndrome: a review of diagnostic tests. Metabolism. 1979;28(9):955-77.
11. Chan KC, Lit LC, Law EL, Tai MH, Yung CU, Chan MH, Lam CW. Diminished urinary free cortisol excretion in patients with moderate and severe renal impairment. Clin Chem. 2004;50(4):757-9.
12. Mericq MV, Cutler GB, Jr. High fluid intake increases urine free cortisol excretion in normal subjects. J Clin Endocrinol Metab. 1998;83(2):682-4.
13. Rosmalen JG, Kema IP, Wust S, van der Ley C, Visser ST, Snieder H, Bakker SJ. 24 h urinary free cortisol in large-scale epidemiological studies: short-term and long-term stability and sources of variability. Psychoneuroendocrinology. 2014;47:10-6.
14. Poll EM, Kreitschmann-Andermahr I, Langejuergen Y, Stanzel S, Gilsbach JM, Gressner A, Yagmur E. Saliva collection method affects predictability of serum cortisol. Clin Chim Acta. 2007;382(1-2):15-9.
15. Glass AR, Zavadil AP, 3rd, Halberg F, Cornelissen G, Schaaf M. Circadian rhythm of serum cortisol in Cushing's disease. J Clin Endocrinol Metab. 1984;59(1):161-5.
16. Refetoff S, Van Cauter E, Fang VS, Laderman C, Graybeal ML, Landau RL. The effect of dexamethasone on the 24-hour profiles of adrenocorticotropin and cortisol in Cushing's syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 1985;60(3):527-35.
17. Nugent CA, Nichols T, Tyler FH. Diagnosis of Cushing's Syndrome; Single Dose Dexamethasone Suppression Test. Arch Intern Med. 1965;116:172-6.
18. Meikle AW. Dexamethasone suppression tests: usefulness of simultaneous measurement of plasma cortisol and dexamethasone. Clin Endocrinol (Oxf). 1982;16(4):401-8.

19. Wood PJ, Barth JH, Freedman DB, Perry L, Sheridan B. Evidence for the low dose dexamethasone suppression test to screen for Cushing's syndrome--recommendations for a protocol for biochemistry laboratories. *Ann Clin Biochem.* 1997;34 ( Pt 3):222-9.
20. Klose M, Lange M, Rasmussen AK, Skakkebaek NE, Hilsted L, Haug E, Andersen M, Feldt-Rasmussen U. Factors influencing the adrenocorticotropin test: role of contemporary cortisol assays, body composition, and oral contraceptive agents. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(4):1326-33.
21. Nickelsen T, Lissner W, Schoffling K. The dexamethasone suppression test and long-term contraceptive treatment: measurement of ACTH or salivary cortisol does not improve the reliability of the test. *Exp Clin Endocrinol.* 1989;94(3):275-80.
22. Loriaux DL, Nieman L. Corticotropin-releasing hormone testing in pituitary disease. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1991;20(2):363-9.
23. Newell-Price J. Cushing's syndrome. *Clin Med (Lond).* 2008;8(2):204-8.
24. Arnaldi G, Angeli A, Atkinson AB, Bertagna X, Cavagnini F, Chrousos GP, Fava GA, Findling JW, Gaillard RC, Grossman AB, Kola B, Lacroix A, Mancini T, Mantero F, Newell-Price J, Nieman LK, Sonino N, Vance ML, Giustina A, Boscaro M. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(12):5593-602.
25. Liddle GW. Tests of pituitary-adrenal suppressibility in the diagnosis of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1960;20:1539-60.
26. Oldfield EH, Doppman JL, Nieman LK, Chrousos GP, Miller DL, Katz DA, Cutler GB, Jr., Loriaux DL. Petrosal sinus sampling with and without corticotropin-releasing hormone for the differential diagnosis of Cushing's syndrome. *N Engl J Med.* 1991;325(13):897-905.
27. Wagner-Bartak NA, Baiomy A, Habra MA, Mukhi SV, Morani AC, Korivi BR, Waguespack SG, Elsayes KM. Cushing Syndrome: Diagnostic Workup and Imaging Features, With Clinical and Pathologic Correlation. *AJR Am J Roentgenol.* 2017;209(1):19-32.
28. Lindsay JR, Nieman LK. Differential diagnosis and imaging in Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2005;34(2):403-21, x.
29. Nieman LK. Recent Updates on the Diagnosis and Management of Cushing's Syndrome. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2018;33(2):139-46.
30. Biller BM, Grossman AB, Stewart PM, Melmed S, Bertagna X, Bertherat J, Buchfelder M, Colao A, Hermus AR, Hofland LJ, Klibanski A, Lacroix A, Lindsay JR, Newell-Price J, Nieman LK, Petersenn S, Sonino N, Stalla GK, Swearingen B, Vance ML, Wass JA, Boscaro M. Treatment of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(7):2454-62.
31. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Murad MH, Newell-Price J, Savage MO, Tabarin A, Endocrine S. Treatment of Cushing's Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(8):2807-31.
32. Guerin C, Taieb D, Treglia G, Brue T, Lacroix A, Sebag F, Castinetti F. Bilateral adrenalectomy in the 21st century: when to use it for hypercortisolism? 2016;23(2):R131.
33. Ammini AC, Tandon N, Gupta N, Bhalla AS, Devasenapathy K, Kumar G, Sahoo JP, Chittawar S, Philip J, Baruah MP, Dwarakanath CS, Tripathi S. Etiology and clinical profile of patients with Cushing's syndrome: A single center experience. *Indian J Endocrinol Metab.* 2014;18(1):99-105.
34. Bolland MJ, Holdaway IM, Berkeley JE, Lim S, Dransfield WJ, Conaglen JV, Croxson MS, Gamble GD, Hunt PJ, Toomath RJ. Mortality and morbidity in Cushing's syndrome in New Zealand. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011;75(4):436-42.

35. Khaleeli AA, Edwards RH, Gohil K, McPhail G, Rennie MJ, Round J, Ross EJ. Corticosteroid myopathy: a clinical and pathological study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1983;18(2):155-66.
36. Ruff RL, Weissmann J. Endocrine myopathies. *Neurol Clin*. 1988;6(3):575-92.
37. Volaklis KA, Halle M, Meisinger C. Muscular strength as a strong predictor of mortality: A narrative review. *Eur J Intern Med*. 2015;26(5):303-10.
38. Rizzoli R, Reginster JY, Arnal JF, Bautmans I, Beaudart C, Bischoff-Ferrari H, Biver E, Boonen S, Brandi ML, Chines A, Cooper C, Epstein S, Fielding RA, Goodpaster B, Kanis JA, Kaufman JM, Laslop A, Malafarina V, Manas LR, Mitlak BH, Oreffo RO, Petermans J, Reid K, Rolland Y, Sayer AA, Tsouderos Y, Visser M, Bruyere O. Quality of life in sarcopenia and frailty. *Calcif Tissue Int*. 2013;93(2):101-20.
39. Schakman O, Gilson H, Thissen JP. Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J Endocrinol*. 2008;197(1):1-10.
40. Goodlad GA, Clark CM. Glucocorticoid-mediated muscle atrophy: alterations in transcriptional activity of skeletal muscle nuclei. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1097(3):166-70.
41. Ma K, Mallidis C, Bhasin S, Mahabadi V, Artaza J, Gonzalez-Cadavid N, Arias J, Salehian B. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285(2):E363-71.
42. Gilson H, Schakman O, Combaret L, Lause P, Grobet L, Attaix D, Ketelslegers JM, Thissen JP. Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology*. 2007;148(1):452-60.
43. Minetto MA, Lanfranco F, Motta G, Allasia S, Arvat E, D'Antona G. Steroid myopathy: some unresolved issues. *J Endocrinol Invest*. 2011;34(5):370-5.
44. Rich MM, Pinter MJ. Crucial role of sodium channel fast inactivation in muscle fibre inexcitability in a rat model of critical illness myopathy. *J Physiol*. 2003;547(Pt 2):555-66.
45. Derijk RH, de Kloet ER. Corticosteroid receptor polymorphisms: determinants of vulnerability and resilience. *Eur J Pharmacol*. 2008;583(2-3):303-11.
46. Manenschijn L, van den Akker EL, Lamberts SW, van Rossum EF. Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms. An overview. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1179:179-98.
47. Huizenga NA, Koper JW, De Lange P, Pols HA, Stolk RP, Burger H, Grobbee DE, Brinkmann AO, De Jong FH, Lamberts SW. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with and increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(1):144-51.
48. Di Blasio AM, van Rossum EF, Maestrini S, Berselli ME, Tagliaferri M, Podesta F, Koper JW, Liuzzi A, Lamberts SW. The relation between two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and body mass index, blood pressure and cholesterol in obese patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003;59(1):68-74.
49. Dobson MG, Redfern CP, Unwin N, Weaver JU. The N363S polymorphism of the glucocorticoid receptor: potential contribution to central obesity in men and lack of association with other risk factors for coronary heart disease and diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(5):2270-4.
50. Kuningas M, Mooijaart SP, Slagboom PE, Westendorp RG, van Heemst D. Genetic variants in the glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and cardiovascular disease risk. The Leiden 85-plus Study. *Biogerontology*. 2006;7(4):231-8.
51. Murray JC, Smith RF, Ardinger HA, Weinberger C. RFLP for the glucocorticoid receptor (GRL) located at 5q11-5q13. *Nucleic Acids Res*. 1987;15(16):6765.

52. van Rossum EF, Koper JW, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Arp P, Ester W, Janssen JA, Brinkmann AO, de Jong FH, Grobbee DE, Pols HA, Lamberts SW. Identification of the BclII polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003;59(5):585-92.
53. Russcher H, Smit P, van den Akker EL, van Rossum EF, Brinkmann AO, de Jong FH, Lamberts SW, Koper JW. Two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene directly affect glucocorticoid-regulated gene expression. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(10):5804-10.
54. Rosmond R, Chagnon YC, Holm G, Chagnon M, Perusse L, Lindell K, Carlsson B, Bouchard C, Bjorntorp P. A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Obes Res*. 2000;8(3):211-8.
55. Ukkola O, Perusse L, Chagnon YC, Despres JP, Bouchard C. Interactions among the glucocorticoid receptor, lipoprotein lipase and adrenergic receptor genes and abdominal fat in the Quebec Family Study. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001;25(9):1332-9.
56. Ragnarsson O, Glad CA, Bergthorsdottir R, Almqvist EG, Ekerstad E, Widell H, Wangberg B, Johannsson G. Body composition and bone mineral density in women with Cushing's syndrome in remission and the association with common genetic variants influencing glucocorticoid sensitivity. *Eur J Endocrinol*. 2015;172(1):1-10.
57. Szappanos A, Patocs A, Toke J, Boyle B, Sereg M, Majnik J, Borgulya G, Varga I, Liko I, Racz K, Toth M. BclII polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with decreased bone mineral density in patients with endogenous hypercortisolism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;71(5):636-43.
58. Moreira RP, Bachega TA, Machado MC, Mendonca BB, Bronstein MD, Villares Fragoso MC. Modulatory effect of BclI GR gene polymorphisms on the obesity phenotype in Brazilian patients with Cushing's disease. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68(5):579-85.
59. Ragnarsson O, Glad CA, Berglund P, Bergthorsdottir R, Eder DN, Johannsson G. Common genetic variants in the glucocorticoid receptor and the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 genes influence long-term cognitive impairments in patients with Cushing's syndrome in remission. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(9):E1803-7.
60. van Rossum EF, Koper JW, Huizenga NA, Uitterlinden AG, Janssen JA, Brinkmann AO, Grobbee DE, de Jong FH, van Duyn CM, Pols HA, Lamberts SW. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes*. 2002;51(10):3128-34.
61. van Rossum EF, Voorhoeve PG, te Velde SJ, Koper JW, Delemarre-van de Waal HA, Kemper HC, Lamberts SW. The ER22/23EK polymorphism in the glucocorticoid receptor gene is associated with a beneficial body composition and muscle strength in young adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(8):4004-9.
62. Derijk RH, Schaaf MJ, Turner G, Datson NA, Vreugdenhil E, Cidlowski J, de Kloet ER, Emery P, Sternberg EM, Detera-Wadleigh SD. A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2001;28(11):2383-8.
63. Syed AA, Irving JA, Redfern CP, Hall AG, Unwin NC, White M, Bhopal RS, Weaver JU. Association of glucocorticoid receptor polymorphism A3669G in exon 9beta with reduced central adiposity in women. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14(5):759-64.
64. Trementino L, Appolloni G, Concettoni C, Cardinaletti M, Boscaro M, Arnaldi G. Association of glucocorticoid receptor polymorphism A3669G with decreased risk of developing diabetes in patients with Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2012;166(1):35-42.

65. Roerink SH, Wagenmakers MA, Smit JW, van Rossum EF, Netea-Maier RT, Plantinga TS, Hermus AR. Glucocorticoid receptor polymorphisms modulate cardiometabolic risk factors in patients in long-term remission of Cushing's syndrome. *Endocrine*. 2016;53(1):63-70.
66. Hanson P, Dive A, Brucher J-M, Bisteau M, Dangoisse M, Deltombe T. Acute corticosteroid myopathy in intensive care patients. *Muscle & Nerve*. 1997;20(11):1371-80.
67. Abizanda P, Navarro JL, Garcia-Tomas MI, Lopez-Jimenez E, Martinez-Sanchez E, Paterna G. Validity and usefulness of hand-held dynamometry for measuring muscle strength in community-dwelling older persons. *Arch Gerontol Geriatr*. 2012;54(1):21-7.
68. Guralnik JM, Ferrucci L, Simonsick EM, Salive ME, Wallace RB. Lower-extremity function in persons over the age of 70 years as a predictor of subsequent disability. *N Engl J Med*. 1995;332(9):556-61.
69. Guralnik JM, Simonsick EM, Ferrucci L, Glynn RJ, Berkman LF, Blazer DG, Scherr PA, Wallace RB. A short physical performance battery assessing lower extremity function: association with self-reported disability and prediction of mortality and nursing home admission. *J Gerontol*. 1994;49(2):M85-94.
70. Mathiowetz V, Kashman N, Volland G, Weber K, Dowe M, Rogers S. Grip and pinch strength: normative data for adults. *Arch Phys Med Rehabil*. 1985;66(2):69-74.
71. Müller H-J. PCR-Polymerase-Kettenreaktion. *Das Methodenbuch Spektrum Aka de mischer Verlag*. 2001.
72. BioProject. NHLBI TOPMed: Phase III variation data [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2019 [cited 31.12.2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA400167>.
73. Muller LM, Kienitz T, Deutschbein T, Riester A, Hahner S, Burger-Stritt S, Berr CM, Osswald A, Braun L, Rubinstein G, Reincke M, Quinkler M. Glucocorticoid Receptor Polymorphisms Influence Muscle Strength in Cushing's Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;105(1).
74. Cohen S, Nathan JA, Goldberg AL. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(1):58-74.
75. Ash GI, Kostek MA, Lee H, Angelopoulos TJ, Clarkson PM, Gordon PM, Moyna NM, Visich PS, Zoeller RF, Price TB, Devaney JM, Gordish-Dressman H, Thompson PD, Hoffman EP, Pescatello LS. Glucocorticoid Receptor (NR3C1) Variants Associate with the Muscle Strength and Size Response to Resistance Training. *PLoS One*. 2016;11(1):e0148112.
76. Hurst JE, Fitts RH. Hindlimb unloading-induced muscle atrophy and loss of function: protective effect of isometric exercise. *J Appl Physiol (1985)*. 2003;95(4):1405-17.
77. Adams GR, Haddad F, Bodell PW, Tran PD, Baldwin KM. Combined isometric, concentric, and eccentric resistance exercise prevents unloading-induced muscle atrophy in rats. *J Appl Physiol (1985)*. 2007;103(5):1644-54.
78. Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech*. 2013;6(1):25-39.

## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Lisa Marie Müller, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Untersuchung der Assoziation zwischen Polymorphismen des Glucocorticoidrezeptor-Gens und der Muskelkraft in Patienten mit Cushing-Syndrom* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum

---

Unterschrift

## ANTEILSERKLÄRUNG AN DER ERFOLGTEN PUBLIKATION

Publikation 1: Müller LM, Kienitz T, Deutschbein T, Riester A, Hahner S, Burger-Stritt S, Berr CM, Oßwald A, Braun L, Rubinstein G, Reincke M, Quinkler M. Glucocorticoid Receptor Polymorphisms Influence Muscle Strength in Cushing's Syndrome. JCEM 2020, Jan 1;105(1). pii: dgz052. doi: 10.1210/clinem/dgz052.

Die Datenerhebung der klinischen und laborchemischen Daten erfolgte im Rahmen des Deutschen Cushing-Registers durch die Mitarbeiter der jeweiligen Standorte. Am Standort Berlin war es als Doktorandin meine Aufgabe, die erhobenen Daten in das Register einzupflegen. Für unsere Studie extrahierte ich später die benötigten Daten aller Standorte aus dem Registerdatenstamm. Weiterhin stellten uns alle beteiligten Standorte EDTA-Vollblut-Proben der eingeschlossenen Patienten zur Verfügung, die wir für die Genotypisierung benötigten. Vom Standort München erhielt ich bereits extrahierte DNA. Durch Frau Dr. med. Tina Kienitz erlernte ich die Labormethoden für die DNA-Extrahierung und die Genotypisierung. Im weiteren Verlauf bestimmte ich selbstständig die Polymorphismen aller Patienten. Ich führte, in enger Rücksprache mit meinem Betreuer, selbstständig die statistischen Analysen dieser Studie durch. Im Rahmen der statistischen Auswertung habe ich eigenständig alle Tabellen und Abbildungen der Publikation erstellt. Das Manuskript unserer Publikation wurde von mir verfasst und im Anschluss durch meinen Betreuer und alle Ko-Autoren gegengelesen und überarbeitet.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift der Doktorandin

## AUSZUG AUS DER JOURNAL SUMMARY LIST 2018

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **“ENDOCRINOLOGY and METABOLISM”**  
 Selected Category Scheme: WoS  
**Gesamtanzahl: 145 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Nature Reviews Endocrinology	8,908	24.646	0.026300
2	Lancet Diabetes & Endocrinology	7,961	24.540	0.038680
3	Cell Metabolism	34,829	22.415	0.099550
4	DIABETES CARE	71,305	15.270	0.096210
5	JOURNAL OF PINEAL RESEARCH	10,695	15.221	0.010560
6	ENDOCRINE REVIEWS	13,381	15.167	0.008900
7	TRENDS IN ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM	8,968	9.777	0.016630
8	Obesity Reviews	11,567	8.192	0.023730
9	FRONTIERS IN NEUROENDOCRINOLOGY	4,196	7.852	0.005490
10	THYROID	11,972	7.786	0.022810
11	DIABETES	53,532	7.199	0.064540
12	DIABETOLOGIA	30,692	7.113	0.041920
13	NEUROENDOCRINOLOGY	5,046	6.804	0.005690
14	METABOLISM-CLINICAL AND EXPERIMENTAL	14,379	6.513	0.016360
15	Molecular Metabolism	3,415	6.181	0.015290
16	DIABETES OBESITY & METABOLISM	9,982	6.133	0.021570
17	JOURNAL OF CEREBRAL BLOOD FLOW AND METABOLISM	19,766	6.040	0.028050
18	Cardiovascular Diabetology	5,392	5.948	0.011550
19	ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING	20,275	5.828	0.029700
20	JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH	26,818	5.711	0.032070
21	FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE	40,820	5.657	0.040300

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
22	JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM	77,893	5.605	0.089910
23	REVIEWS IN ENDOCRINE & METABOLIC DISORDERS	2,330	5.516	0.004250
24	EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY	13,622	5.107	0.020920
25	BMJ Open Diabetes Research & Care	866	5.067	0.003630
26	CURRENT OPINION IN LIPIDOLOGY	4,140	4.844	0.006320
27	ENDOCRINE-RELATED CANCER	6,958	4.774	0.012150
28	DIABETES-METABOLISM RESEARCH AND REVIEWS	5,120	4.758	0.007900
29	INTERNATIONAL JOURNAL OF OBESITY	22,929	4.514	0.030070
30	Diabetes Technology & Therapeutics	4,449	4.488	0.008670
31	JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY	11,816	4.381	0.012110
32	BONE	21,658	4.360	0.025550
33	JOURNAL OF INHERITED METABOLIC DISEASE	5,868	4.287	0.008410
34	Endocrine Practice	4,355	4.149	0.010280
35	AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM	19,036	4.125	0.017240
36	PSYCHONEUROENDOCRINOLOGY	16,809	4.013	0.028150
37	DIABETES & METABOLISM	3,483	4.008	0.004010
38	Current Diabetes Reports	3,870	3.996	0.010600
39	Obesity	18,844	3.969	0.036270
40	HORMONES AND BEHAVIOR	10,874	3.949	0.012620
41	Current Osteoporosis Reports	1,786	3.927	0.004610
42	Journal of Diabetes Investigation	2,564	3.902	0.005810
43	OSTEOPOROSIS INTERNATIONAL	16,709	3.819	0.024870

## PUBLIKATION

Meine Original Publikation wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Die Publikation ist unter folgendem Link nachzulesen: <https://doi.org/10.1210/clinem/dgz052>

















## LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## PUBLIKATIONSLISTE

09/2019 **Müller LM**, Kienitz T, Deutschbein T, Riestler A, Hahner S, Burger-Stritt S, Berr CM, Oßwald A, Braun L, Rubinstein G, Reincke M, Quinkler M. Glucocorticoid Receptor Polymorphisms Influence Muscle Strength in Cushing's Syndrome. **JCEM** 2020, Jan 1;105(1). pii: dgz052. doi: 10.1210/clinem/dgz052.

Journal Impact Factor: 5,6

03/2018 **Müller L**, Quinkler M. Adrenal disease: Imitating the cortisol profile improves the immune system. **Nat Rev Endocrinol** 2018 14(3):137-139

Journal Impact Factor: 24,6

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir bei meiner Dissertation geholfen haben und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Marcus Quinkler. Er hatte die Idee für diese Studie, hat mir deren Umsetzung zugetraut und mich anschließend bei allen Schritten auf dem Weg angeleitet, unterrichtet, unterstützt und motiviert. Ich hätte mir keine bessere Betreuung vorstellen können. Darüber hinaus danke ich ihm ebenfalls für sein Engagement, meine Daten auf endokrinologischen Kongressen zu präsentieren, wodurch ich alle Facetten des „Forscherlebens“ erleben konnte. Ebenso verdanke ich ihm, dass ich im Jahr 2019 den Nachwuchsförderpreis der Sektion Angewandte Endokrinologie der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie gewann.

Ich möchte Dr. med. Tina Kienitz für ihre Mühe und Zeit danken, die sie investierte, um mir alle grundlegenden Labormethoden beizubringen. Sie unterstützte mich während der ganzen Zeit bei offenen Fragen und Problemen. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Prof. Dr. med. Christian Strasburger und Dr. med. Zida Wu dafür danken, dass ich meine Analysen im Endokrinologischen Forschungslabor der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchführen konnte. Ich danke auch Sabine Kaiser für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor und für ihre Hilfe bei allen organisatorischen Belangen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Deutschen Cushing-Registers und bei den Ko-Autoren meiner Publikation bedanken. Insbesondere danke ich PD Dr. med. Timo Deutschbein für die angenehme und unkomplizierte Zusammenarbeit mit Würzburg sowie Prof. Dr. med. Martin Reincke und Stephanie Zopp aus München, die mich als Doktorandin des Deutschen Cushing-Registers schulten, betreuten und auf alle Fragen eine Antwort wussten. Ich danke ebenso Kathrin Zopf und den Mitarbeiterinnen der Endokrinologiepraxis Charlottenburg, die mich tatkräftig bei der Registerarbeit unterstützten. Ebenso danke ich allen Patienten des Deutschen Cushing-Registers, ohne die unsere Forschung nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte meinen „Doktorschwestern“ Hanna Remde und Judith Gerards danken. Gemeinsam haben wir viele Probleme gemeistert, Vorträge geübt und Kongresse besucht.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern und meinen Freunden danken. Mein Vater war durch sein fachliches Know-How stets mein Ansprechpartner, wenn ich im Labor nicht weiter wusste. Er übte in seinem Labor meine ersten PCRs mit mir und lehrte mich auch, alles kritisch zu hinterfragen. Ich danke meinen Eltern und Freunden für ihre emotionale Unterstützung, ihr Verständnis und dafür, mich nach schlaflosen Nächten wieder auf andere Gedanken zu bringen.