

DISSERTATION

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

-

Investigation of the association between polymorphisms of the
glucocorticoid receptor gene and quality of life in patients with
Cushing's syndrome

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lara Lou Isabella Feldkamp
aus Berlin

Erstbetreuung: Prof. Dr. med. Marcus Quinkler

Datum der Promotion: 28.02.2025

Inhaltsverzeichnis

TABELLENVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ZUSAMMENFASSUNG	VII
ABSTRACT	VIII
1. EINLEITUNG	1
1.1 ÄTIOLOGIE, EPIDEMIOLOGIE UND KLINIK DES CUSHING-SYNDROMS	1
1.2 DIAGNOSTIK UND THERAPIE DES CUSHING-SYNDROMS.....	2
1.3 GESUNDHEITSBEZOGENE LEBENSQUALITÄT (HRQOL).....	4
1.3.1 Lebensqualität und psychische Erkrankungen in Patienten mit Cushing Syndrom.....	5
1.4 DIE POLYMORPHISMEN DES GLUCOCORTICOIDREZEPTOR-GENS.....	6
1.5 FRAGESTELLUNG / AUFBAU DER ARBEIT.....	9
2. METHODIK	10
2.1 PATIENTENKOHORTE UND FORSCHUNGSDESIGN.....	10
2.2 EINTEILUNG IN FLORIDES CUSHING SYNDROM UND REMISSION	11
2.3 GENOTYPISIERUNG DER EINZELNUKLEOTID-POLYMORPHISMEN.....	12
2.3.1 DNA-Extraktion.....	12
2.3.2 Konventionelle Polymerasekettenreaktion (PCR).....	12
2.3.3 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus	14
2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	14
2.3.5 Duplex-Real-Time TaqMan Polymerase-Kettenreaktion	18
2.3.6 Gruppeneinteilung der Patienten nach Genotypen.....	20
2.4 FRAGEBÖGEN ZUR ERFASSUNG DER LEBENSQUALITÄT	21
2.4.1 Weitere klinische und laborchemische Daten.....	24
2.5 STATISTIK.....	25
3. ERGEBNISSE	25
3.1 ALLGEMEINE CHARAKTERISIERUNG DER PATIENTEN-KOHORTE	25
3.2 HÄUFIGKEITEN DER BETRACHTETEN EINZELNUKLEOTIDPOLYMORPHISMEN	30
3.3 ERGEBNISSE DER QUERSCHNITTSANALYSE UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER SNPs	31
4. DISKUSSION	39
4.1 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	39
4.2 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE UND EINBETTUNG IN DEN BISHERIGEN FORSCHUNGSSTAND.....	40
4.3 STÄRKEN UND SCHWÄCHEN DER STUDIE	42
4.4 SCHLUSSFOLGERUNG, IMPLIKATIONEN FÜR DIE PRAXIS UND ZUKÜNFTIGE FORSCHUNG.....	43
LITERATURVERZEICHNIS	45
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	53
ANTEILSERKLÄRUNG AN DEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN	55
PUBLIKATION	56
LEBENS LAUF	65
KOMPLETTE PUBLIKATIONS LISTE	67
DANKSAGUNG	69

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Durchführung der konventionellen PCR.....	13
Tabelle 2: Zusammensetzung des Agarosegels zur Durchführung einer Agarose Gelelektrophorese.....	15
Tabelle 3: Gruppeneinteilung der SNPs: Gruppe 1 mit N363S und Bc/I Polymorphismus, die eine erhöhte GR-Sensitivität aufweisen und Gruppe 2 mit ER22/23EK und A3669G und einer niedrigeren GR-Sensitivität.....	21
Tabelle 4: Klinische und biochemische Charakteristika von Patienten mit aktivem (n=81) und geheiltem (n=214) endogenem Cushing-Syndrom (CS).....	27
Tabelle 5: Klinische Charakteristika und Lebensqualität (QoL) von Patienten in Remission (n=214) nach endogenem Cushing-Syndrom (CS) mit oder ohne Hydrocortison-Hormonersatztherapie.....	28
Tabelle 6: Verteilung der Glucocorticoidrezeptor (GR)-SNPs (Einzelnukleotid Polymorphismen) bei allen Patienten unserer Kohorte mit endogenem Cushing-Syndrom (CS).....	30
Tabelle 7: Ergebnisse der Fragebögen SF-36, Cushing QoL und Tübingen CD-25 zur Lebensqualität von Patienten mit aktivem CS (n=81) und Bc/I-Polymorphismus – Vergleich Minor-Allel und Wildtyp.....	31
Tabelle 8: Ergebnisse der Fragebögen SF-36, Cushing QoL und Tübingen CD-25 zur Lebensqualität von Patienten mit aktivem CS (n=81) und ER22/23EK-Polymorphismus – Vergleich Minor-Allel und Wildtyp.....	32
Tabelle 9: Ergebnisse der Fragebögen SF-36, Cushing QoL und Tübingen CD-25 zur Lebensqualität von Patienten mit aktivem CS (n=81) und N363S-Polymorphismus – Vergleich Minor-Allel und Wildtyp.....	32
Tabelle 10: Ergebnisse der Fragebögen SF-36, Cushing QoL und Tübingen CD-25 zur Lebensqualität von Patienten mit aktivem CS (n=81) und A3669G-Polymorphismus – Vergleich Minor-Allel und Wildtyp.....	33
Tabelle 11: Ergebnisse der Fragebögen SF-36, Cushing QoL und Tübingen CD-25 zur Lebensqualität von Patienten mit aktivem CS bei Registereintritt und in Remission bei der Nachuntersuchung bei gleichzeitiger Trägerschaft des Bc/I-Polymorphismus (n=47).....	34

Tabelle 12: Laborwerte von Patienten mit aktivem CS bei Registereintritt und in Remission beim Follow-Up (n=30). Eingeteilt in zwei Gruppen: Erhöhte GR Sensitivität (Gruppe1: N363S, Bcl-I) und erniedrigte GR Sensitivität (Gruppe 2: ER22/23EK, A3669G).....37

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Gelelektrophorese der amplifizierten und hydrolysierten DNA des SNPs BclI.....	15
Abbildung 2: a) Gelelektrophorese der amplifizierten und hydrolysierten DNA des SNPs N363S (Wildtyp & Heterozygot).....	16
Abbildung 2: b) Gelelektrophorese der amplifizierten und hydrolysierten DNA des SNPs N363S (Wildtyp & Homozygot).....	16
Abbildung 3: a) Gelelektrophorese der amplifizierten und hydrolysierten DNA des SNPs ER22/23EK (Wildtyp).....	17
Abbildung 3: b) Gelelektrophorese der amplifizierten und hydrolysierten DNA des SNPs ER22/23EK (Wildtyp & Heterozygot).....	18
Abbildung 4: Amplifikationskurven der Fluoreszenz-Signale einer Duplex-Real-Time TaqMan PCR (Polymerase-Kettenreaktion).....	20
Abbildung 5: Subjektiver Gesundheitszustand nach dem Short Form-36 (SF-36) Fragebogen bei Patienten mit aktivem Cushing-Syndrom (CS) (n=81; graue Skala) und CS in Remission (n=214; schwarze Skala).....	29
Abbildung 6: Subjektiver Gesundheitszustand gemäß SF-36 bei Patienten mit Cushing Syndrom (CS) mit BclI-Wildtyp (n=17) oder BclI-Minor-Allel (n=30) zu Registereintritt und bei der Nachuntersuchung.....	35
Abbildung 7: Subjektiver Gesundheitszustand gemäß SF-36 bei Patienten mit Cushing Syndrom (CS), die zu Registereintritt ein aktives CS hatten und bei der Nachuntersuchung in Remission waren. Die Patienten wurden in zwei Gruppen eingeteilt: höhere GR-Empfindlichkeit (Gruppe "high": Minor-Allel für N363S und BclI; n=22) und niedrigere GR-Empfindlichkeit (Gruppe "low": Minor-Allel für ER22/23EK und A3669G; n=8).....	38

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACTH	adrenocorticotropes Hormon
AVP	Vasopressin
BMI	„body mass index“, Körpermasse-Index
bp	Basenpaare
CS	Cushing-Syndrom
CD	Cushing-Disease / Morbus Cushing
CT	Computertomographie
DNA	„desoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAM TM	6-Carboxyfluorescein
HbA1c	glykiertes Hämoglobin α 1
HDL	„high density lipoprotein“, Lipoprotein hoher Dichte
HRQoL	Health Related Quality of Life, gesundheitsbezogene Lebensqualität
LDL	„low density lipoprotein“, Lipoprotein geringer Dichte
MRT	Magnetresonanztomographie
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RFU	„relative fluorescent units“, relative Fluoreszenz-Einheiten
SNP	„single nucleotid polymorphism“, Einzelnukleotid-Polymorphismus
TBE-Puffer	TRIS(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)-Borat-EDTA-Puffer
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
VIC [®]	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: Der chronische Hypercortisolismus bei Patienten mit endogenem Cushing Syndrom (CS) prädisponiert diese für psychiatrische und neurokognitive Störungen, die zu einer eingeschränkten Lebensqualität führen. Da sich die Lebensqualität nach Remission bei einigen Patienten nicht signifikant bessert, wird es wahrscheinlich neben dem Cortisolüberschuss noch weitere Einflussfaktoren geben. Wir haben in unserer Studie die Einzelnukleotid-Polymorphismen (*BclI*, N363S, ER22/23EK und A3669G) des Glucocorticoidrezeptor-Gens untersucht, weil deren Rezeptorproteinvarianten sich nachweislich in ihrer Sensitivität auf Cortisol unterscheiden. Somit wollten wir analysieren, ob es eine Assoziation zwischen den Glucocorticoidrezeptor-Polymorphismen, der Lebensqualität und der Genesung nach Remission in Patienten mit CS gibt.

METHODIK: In die Querschnittsstudie dieser multizentrischen Untersuchung konnten wir 295 Patienten mit endogenem CS (81 davon mit floridem CS und 214 in Remission) von drei Standorten des Deutschen Cushing Registers einschließen. Die longitudinale Betrachtung schließt 120 Patienten der Querschnittsstudie ein, die bei Registereintritt und nach 1.5 ± 0.9 Jahren beim Follow-Up untersucht wurden. Um die Lebensqualität zu erfassen sind zwei Cushing-spezifische Fragebögen (CushingQoL und Tuebingen CD-25) und ein allgemeiner Lebensqualitätsfragebogen (SF-36) verwendet worden. Die Genotypisierung der vier Einzelnukleotid-Polymorphismen erfolgte nach vorheriger DNA-Extraktion aus peripheren Blutleukozyten.

ERGEBNISSE: In zwei Subkategorien des SF-36 Fragebogens zeigten Träger des mutierten *BclI*-Allels in der longitudinalen Analyse eine signifikante Verbesserung in „vitality“ ($p=0.038$) und „mental health“ ($p=0.013$) im Vergleich zum Wildtyp.

In der Querschnittsanalyse wurden keine Unterschiede in der Lebensqualität zwischen Minor-Allel- und Wildtyp-Trägern für alle getesteten GR-Polymorphismen festgestellt.

DISKUSSION: Der Einzelnukleotid-Polymorphismus *BclI* wird mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Cortisol in Verbindung gebracht. Träger dieses mutierten Allels erholten sich demnach besser von einer beeinträchtigten Lebensqualität als der Wildtyp. Die Ergebnisse könnten teilweise die inter-individuellen Unterschiede in der Schwere der Beeinträchtigung der Lebensqualität nach Remission in Patienten mit CS erklären.

ABSTRACT

CONTEXT: Chronic hypercortisolism in patients with endogenous Cushing's syndrome (CS) predisposes them to psychiatric and neurocognitive disorders leading to impaired quality of life. Since quality of life does not significantly improve after remission in some patients, there are likely to be other influencing factors besides cortisol excess. In our study, we investigated the single nucleotide polymorphisms (*BclI*, N363S, ER22/23EK, and A3669G) of the glucocorticoid receptor gene because their receptor protein variants have been shown to differ in their sensitivity to cortisol. Thus, we aimed to analyze whether there is an association between the glucocorticoid receptor polymorphisms, quality of life, and recovery after remission in patients with CS.

METHODS: For the cross-sectional study of this multicenter investigation, we were able to include 295 patients with endogenous CS (81 of them with active CS and 214 in remission) from three sites of the German Cushing Registry. The longitudinal analysis includes 120 patients from the cross-sectional study who were examined at registry entry and after 1.5 ± 0.9 years of follow-up. Two Cushing-specific questionnaires (CushingQoL and Tuebingen CD-25) and a general QoL questionnaire (SF-36) have been used to assess quality of life. Genotyping of the four single nucleotide polymorphisms was performed after prior DNA extraction from peripheral blood leukocytes.

RESULTS: In two subcategories of the SF-36 questionnaire, carriers of the mutant *BclI* allele showed significant improvement in vitality ($p=0.038$) and mental health ($p=0.013$) in longitudinal analysis compared to wild type.

In cross-sectional analysis, no differences in quality of life were observed between minor allele and wild-type carriers for all GR polymorphisms tested.

CONCLUSION: The single nucleotide polymorphism *BclI*, is associated with increased sensitivity to cortisol, carriers of this mutant allele recovered better from impaired quality of life than wild type. The results may partially explain the inter-individual differences in the severity of QoL impairment after remission in patients with CS. Screening for such genetic alterations (SNPs) could therefore be useful for early treatment of psychiatric disorders and for learning and strengthening coping strategies.

1. EINLEITUNG

1.1 Ätiologie, Epidemiologie und Klinik des Cushing-Syndroms

Das Cushing-Syndrom (CS) kann entstehen, wenn Patienten über einen längeren Zeitraum einem Hypercortisolismus ausgesetzt sind, also eine zu hohe Cortisolkonzentration im Blut aufweisen (1). Erstmals beschrieben hat die Erkrankung der Neurochirurg Harvey Williams Cushing im Jahr 1910 (2). Die Entstehung des CS kann unterschiedliche Gründe haben. Weitaus häufiger als das endogene CS kommt das iatrogene CS vor, das sich beispielsweise durch Glucocorticoidhaltige Medikamente (z.B. Prednisolon, Dexamethason) entwickeln kann, also exogen induziert wird (3). Eine Glucocorticoidtherapie ist bei diversen entzündlichen, autoimmunen und neoplastischen Erkrankungen weit verbreitet. In dieser Arbeit soll es jedoch ausschließlich um Patienten mit endogenem CS gehen, also um jene, die aufgrund verschiedener Ursachen intrinsisch zu viel Cortisol bilden. Das endogene CS wird in ACTH-abhängig und ACTH-unabhängige Ursachen unterteilt und tritt häufiger bei Frauen als bei Männern auf (4). Mit 70% am häufigsten vorkommend ist das hypophysäre CS, welches man auch als zentrales CS oder Morbus Cushing bezeichnet (4). Das ektope CS folgt mit einem Anteil von 10% und ist ebenfalls ACTH-abhängig. Am häufigsten ist eine ektope Cortisolsekretion durch das kleinzellige Lungenkarzinom bedingt, sie kann aber auch bei vielen anderen endokrinen Tumoren in verschiedenen Organen auftreten (4, 5). Aus unserer Studie haben wir Patienten mit ektope CS ausgeschlossen. Unabhängig von ACTH ist dagegen das adrenale CS, welches sowohl gut-, aber auch bösartige Nebennierenrindentumoren sein können, oder, seltener, durch eine bilaterale primäre mikro- und makronoduläre Nebennierenrindenhyperplasie ausgelöst werden kann (5, 6). Das hypophysäre adrenocorticotrope Hormon ACTH wird vom Corticotropin-releasing Hormon (CRH) aus dem Hypothalamus stimuliert und regt dann seinerseits die Nebennierenrinde zur Bildung und Freisetzung von Hormonen an. Es ist demnach eines der entscheidenden Hormone für die physiologische Kontrolle der Cortisol-Synthese. Durch die negative Rückkopplung von Cortisol auf den Hypothalamus und die Hypophyse

wird der Regelkreis der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA) geschlossen (7).

Der meist länger andauernde Cortisolexzess beim CS führt zu typischen Symptomen: Gewichtszunahme und krankheitsspezifische Fettumverteilung (Stammfettsucht, „Stiernacken“, „Vollmondgesicht“), Diabetes mellitus oder Glukoseintoleranz, Hirsutismus, Akne, arterielle Hypertonie, Muskelschwäche, Muskelatrophie, Hautatrophie, Hauteinblutungen, Osteoporose und Ödeme (6, 8). Zu den weiteren Symptomen zählen Wundheilungsstörungen, Striae rubrae, Menstruationsstörungen und Libidoverlust (6, 8). Die Symptomatik kann bei Patienten mit CS zum Teil stark differieren, ebenso die neuropsychiatrischen Folgen, die der Hypercortisolismus beim CS bewirken kann (siehe 1.3.1).

1.2 Diagnostik und Therapie des Cushing-Syndroms

Die klinische Präsentation des CS ist sehr variabel und reicht von seltenen Formen des schweren CS bis hin zu milden, wenn überhaupt, unspezifischen Symptomen. Bei der körperlichen Untersuchung ist auf Cushing-Stigmata (siehe 1.1) zu achten. Konnte nach ausführlicher Anamnese, körperlicher Untersuchung und Begutachtung der Medikation ein iatrogenes und exogenes CS ausgeschlossen werden und es besteht weiterhin der Verdacht auf ein endogenes CS, stehen drei Labortests zur Verfügung (9). Die Diagnose eines Hypercortisolismus beruht überwiegend auf folgenden physiologischen Prinzipien: dem Nichterreichen des normalen Nadirs um Mitternacht in der circadianen Rhythmik der Cortisolausschüttung, dem Verlust der negativen hypothalamisch-hypophysären-adrenalen Rückkopplung des Cortisols und der erhöhten Ausscheidung von freiem Cortisol im Urin (7). Daher werden in der CS Diagnostik folgende Untersuchungen durchgeführt:

- 1) 24 h-UFC Test, „24 hours urine free cortisol“ (Die Messung des freien Cortisols im Sammelurin über 24 Stunden)
- 2) 1 mg-DST, „1 mg dexamethasone suppression test“ (Die Aufdeckung einer gestörten Cortisol-Rückkopplung durch den 1 mg Dexamethason-Suppressionstest)

3) Die Überprüfung der zirkadianen Rhythmik durch den um Mitternacht gemessenen Cortisolgehalt im Speichel oder Blut.

Der Dexamethason-Suppressionstest beruht auf dem Versuch, die körpereigene Cortisol-Produktion zu unterdrücken (negativer Feedback) und am Morgen nach der Tabletteneinnahme durch eine Blutentnahme zu überprüfen, ob der Körper weiterhin zu viel Cortisol sekretiert. Ist dies der Fall, kann das ein Hinweis auf ein CS sein. Als physiologische Reaktion auf 1mg Dexamethason um Mitternacht gilt ein Serumcortisol von weniger als 50 nmol/l (1,8 µg/dl) am nächsten Morgen (9, 10). Der Test hat eine Sensitivität von 85%-90% und eine Spezifität von 95%-99% (9, 10). Ist die Cortisolsekretion im 24-h-Urin oder das Cortisol im Speichel oder Blut nachts deutlich erhöht, kann dies ebenfalls auf ein CS hindeuten (9, 11). Beim 24 h-UFC Test wird über 24 Stunden Urin in einem Behälter gesammelt und der Kreatininwert und die Menge untersucht, um zu beurteilen, ob die Probe für die Analyse geeignet ist. Der Test wird entsprechend des verwendeten Assays interpretiert, es wird außerdem empfohlen ihn ggfs. mehrfach durchzuführen (9). Er hat eine Sensitivität von 80 % bis 98 % und eine Spezifität von 45 % bis 98 % (12). Ein entscheidendes Merkmal des CS ist der Verlust der zirkadianen Rhythmik. Um den fehlenden nächtlichen Tiefpunkt des Cortisols nachzuweisen, können die Patienten ambulant vor dem zu Bett gehen eine Speichelprobe gewinnen, da Cortisol bei Raumtemperatur relativ stabil ist, und diese dann am nächsten Tag ins Labor schicken. Auch hier werden spezifische Assays verwendet, in den meisten Fällen gelten Werte unter 4 nmol/l als normal (13). Die Sensitivität und Spezifität des Tests liegen bei 92%-100% bzw. 93%-100% (9, 10).

Ist in den zuvor beschriebenen initialen Labortests nun ein CS festgestellt worden, besteht der nächste Schritt daraus, differentialdiagnostisch die Ätiologie des CS zu ermitteln (11, 14). Initial erfolgt die morgendliche Bestimmung von ACTH im Plasma. Liegt der Wert > 15-20 pg/ml, kann es sich um ein ACTH-abhängiges CS handeln, befindet er sich im Bereich < 5-10 pg/ml geht man von einem ACTH-unabhängigen CS aus. In den meisten Fällen besteht ein ACTH-abhängiges hypophysäres CS, welches dann mit dem CRH (Corticotropin-Releasing-Hormon)-Simulations-Test und einem sogenannten hochdosierten Dexamethason-Hemmtest weiter untersucht wird (9). Bei weiterhin bestehendem Verdacht auf ein hypophysäres CS erfolgt meist eine kraniale Magnetresonanztomographie (MRT). Das Vorhandensein einer typischen Klinik und

entsprechender Laborwerte, sowie einer fokalen hypophysären Läsion lassen eine definitive Diagnose zu (15). Sollte kein Tumor in der MRT gefunden werden, kann außerdem eine invasive Methode, das Inferior Petrosal Sinus Sampling (IPSS) angewendet werden. Unter Röntgenkontrolle wird dabei ein Katheter nach zentral zum Sinus Petrosus vorgeschoben und die ACTH-Plasmakonzentration jeweils zentral und peripher ermittelt. Somit kann auch ein etwaiges ektopes CS ausgeschlossen oder bestätigt werden (9).

Bei einem ACTH-Wert von $< 5-10$ pg/ml ist von einem adrenalen CS auszugehen und es kann daraufhin eine Computertomographie (CT) oder eine MRT der Nebennieren veranlasst werden (9).

Therapeutisches Ziel im Rahmen der Behandlung von Patienten mit CS ist die vollständige klinische und biochemische Remission, das heißt eine Ausheilung aller Cushing-spezifischen Symptome und Komorbiditäten sowie unauffällige Laborwerte und kein Hypercortisolismus (16). Wurde ein Tumor ektopter, hypophysärer oder adrenaler Ätiologie festgestellt, wird eine operative Entfernung empfohlen. Erstlinientherapie für Patienten mit Morbus Cushing ist die transsphenoidale Operation (TSS). Bei adrenalem Tumor wird eine Adrenalectomie und bei ektoptem Tumor eine Tumoresektion durchgeführt. Die Zweitlinientherapie bei erfolgloser initialer Operation oder bei erneutem Auftreten des CS (Rezidiv) umfasst mehrere Ansätze wie zum Beispiel eine erneute Operation, eine medikamentöse Behandlung des Hypercortisolismus, eine bilaterale Adrenalectomie oder eine Strahlentherapie, und muss für jeden Patienten individuell gewählt werden (16).

1.3 Gesundheitsbezogene Lebensqualität (HRQoL)

1948 definierte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) Gesundheit aus einer neuen Perspektive, indem sie feststellte, dass Gesundheit nicht nur durch die Abwesenheit von Krankheit und Gebrechen definiert ist, sondern auch durch das Vorhandensein von körperlichem, geistigem und sozialem Wohlbefinden (76). In den letzten Jahren hat das Interesse an der Lebensqualität und insbesondere der gesundheitsbezogenen Lebensqualität (HRQoL) in der Forschung stark zugenommen. Es gibt viele verschiedene Auslegungen zur Bedeutung von HRQoL. Sie bezieht sich auf das individuelle Wohlbefinden und darauf, wie Patienten ihre körperliche, emotionale und soziale

Gesundheit wahrnehmen. Die Probanden bewerten ihre Lebensqualität unter Berücksichtigung ihrer Erwartungen, Normen und Ziele sowie der emotionalen, körperlichen und sozialen Aspekte ihres Lebens, die durch eine Krankheit beeinträchtigt werden könnten. Die Erfassung der Lebensqualität erlaubt somit eine Bewertung des Wohlbefindens einer bestimmten Person, einschließlich der individuellen Gefühle, Sorgen, Reaktionen und der Funktionsweise im täglichen Leben (17).

Für die Messung der HRQoL haben sich ein allgemeiner und ein krankheitsspezifischer Ansatz etabliert (18).

1.3.1 Lebensqualität und psychische Erkrankungen in Patienten mit Cushing Syndrom

Es existieren bereits eine Vielzahl an Studien, die zeigen, dass bei Patienten mit CS durchweg eine Beeinträchtigung der Lebensqualität besteht, sowohl vor als auch nach der Behandlung und sowohl bei der Bewertung mit allgemeinen als auch mit krankheitsspezifischen Fragebögen (19-21). Trotzdem konnte nachgewiesen werden, dass die Lebensqualität sich durch die Therapie verbessert, vor allem nach erfolgreicher Remission. Dennoch ist sie bei vielen Patienten mit CS noch Jahre nach Remissionseintritt beeinträchtigt, sowohl im Vergleich zu einer gesunden Vergleichsgruppe als auch zu Patienten mit anderen Arten von Hypophysenadenomen (22-24).

In der Kategorie der neuropsychiatrischen Erkrankungen bei Patienten mit CS werden Depressionen und Angststörungen am häufigsten beobachtet (21, 25). Eine Erklärung für die kognitiven Auswirkungen ist, dass durch die langanhaltend erhöhte Cortisolkonzentration im Blut das sympathische Nervensystem dauerhaft stimuliert wird. Es kann in der Folge ein vulnerabler Phänotyp entstehen, der neben neurodegenerative Veränderungen im zentralen Nervensystem zu kognitiver Beeinträchtigung sowie Hirnatrophie, vor allem im Bereich des Hippocampus, führen kann (26-29). Nach einem anderen Ansatz ist das CS eine chronische Erkrankung, die zu schweren Funktionsstörungen und zahlreichen Komorbiditäten führt und die Lebensqualität somit verschlechtern (27). Einige der Symptome bedingen körperliche Veränderungen, die von anderen Menschen wahrgenommen werden können und die sozialen Interaktionen des Patienten stark beeinträchtigen können (30). Die jeweilige

Therapie des CS kann auch zu Ausfallerscheinungen führen, die eine schlechte Lebensqualität begründen können, zum Beispiel durch Hypophyseninsuffizienz, Nebenniereninsuffizienz, Hypothyreose, Hypogonadismus oder Wachstumshormonmangel (21). Schließlich sind die Genetik und Epigenetik nicht zu unterschätzen, mit der auch wir uns in dieser Arbeit auseinandergesetzt haben, denn das Cortisol entfaltet im menschlichen Körper über zwei Rezeptoren seine Wirkung, den Glucocorticoidrezeptor (GR) und den Mineralocorticoidrezeptor (MR).

1.4 Die Polymorphismen des Glucocorticoidrezeptor-Gens

Das Steroidhormon Cortisol bindet an den intrazellulären GC-Rezeptor (GR), der auf dem GR-Gen NR3C1 auf Chromosom 5q31-32 kodiert ist und wirkt so auf die Zellen im Körper. Nach Bindung von Cortisol an den GR, translozieren diese Komplexe in den Zellkern, binden dort an spezifische DNA-Sequenzen und modulieren die Gentranskription. Das GR-Protein besteht aus 777 Aminosäuren mit einer Molekularmasse von 94 kD (31). Der GC-Rezeptor ist im Gehirn ubiquitär vorhanden, wobei er im Hippocampus und anderen Teilen des limbischen Systems besonders stark ausgeprägt ist (31). Es gibt einige häufige Mutationen des NR3C1 Gens, die während der DNA-Replikation entstehen und eine einzelne veränderte Base aufweisen. Diese Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) sind für eine veränderte Rezeptorreaktion von Cortisol verantwortlich (31).

Die GR-Polymorphismen N363S (rs56149945) und Bc/I (rs41423247) weisen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Cortisol auf und werden mit einem schlechteren Stoffwechselprofil in Verbindung gebracht (31, 32). Dieses schlechtere Stoffwechselprofil zeigt sich in verschiedenen Studien beim SNP Bc/I beispielsweise in Veränderungen des Stoffwechsels wie Hyperinsulinämie, höherem Bauchfett, höherem Body Mass Index (BMI), höhere Leptinspiegel und eine stärkere Zunahme des Körpergewichts nach einer experimentell induzierten Überernährung (33-35).

Der N363S-Polymorphismus befindet sich auf Codon 363 des Exon 2 und resultiert aus einer AAT → AGT-Nukleotidveränderung. Diese Mutation führt zu einer Veränderung der Aminosäuren von Asparagin (N) zu Serin (S) (36). N363S wird unter anderem, genau wie

BclI, mehrfach mit einem erhöhten BMI in Verbindung gebracht (36, 37). Wüst et al. zeigten Assoziationen zwischen dem N363S-Polymorphismus und einer verstärkten Cortisolreaktion im Speichel nach psychosozialem Stress sowie einen Trend zu einer erhöhten Cortisol-Suppression nach Dexamethason auf (38). Der *BclI* -Polymorphismus besteht aus Fragmenten mit einer Länge von 2,2 kb und 3,9 kb. Entdeckt wurde er als Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) und nach dem dort schneidenden Restriktionsenzym *BclI* benannt. Der SNP kommt durch eine C → G-Substitution zustande und befindet sich 646 Nukleotide stromabwärts von Exon 2 (39). Der *BclI*-Polymorphismus wird, wie der ER22/23EK, mit schweren Depressionen assoziiert (40, 41). In einer kaukasischen Studienpopulation war die Häufigkeit homozygoter Träger des *BclI*-minor-Allels in der depressiven Gruppe signifikant höher als in der gesunden Kontrollgruppe (15,5 % vs. 9,9 %) (40). Auch in anderen Studien konnte dieses Ergebnis bestätigt werden (42, 43). Außerdem konnte eine Korrelation zwischen dem *BclI*-Polymorphismus und ausgeprägter Fatigue, Verschlechterung der visuellen Aufmerksamkeit und des Arbeitsgedächtnisses in Patienten mit Cushing Syndrom in Remission festgestellt werden (44). Des Weiteren fand man eine verringerte Knochendichte in Trägern des *BclI*-Polymorphismus mit endogenem CS (45).

Im Gegensatz dazu stehen die GR-Polymorphismen ER22/23EK (rs 6189/rs6190) und A3669G (rs6198) mit einer GR-Resistenz in Verbindung und werden mit einem besseren Stoffwechselprofil assoziiert (32). Das bedeutet, es wurden Assoziationen zwischen dem ER22/23EK-Polymorphismus und niedrigeren Nüchtern-Insulinspiegeln, erhöhter Insulinsensitivität und niedrigeren Gesamt- und Low-Density-Lipoprotein (LDL)-Cholesterinspiegeln gefunden (46).

ER22/23EK befindet sich auf Codon 22 und 23 der Transaktivierungsdomäne des GR-Gens. Die genaue Sequenzveränderung auf DNA-Ebene lautet GAG AGG zu GAA AAG, was auf Protein-Ebene Glutaminsäure-Arginin (E-R) zu Glutaminsäure-Lysin (E-K) bedeutet (36, 47). Van Rossum et al. zeigte des Weiteren, dass in einer niederländischen Kohorte mit über 55-jährigen Menschen Demenz und Läsionen der weißen Substanz bei Trägern des Polymorphismus ER22/23EK seltener auftreten (48). Darüber hinaus fanden sie heraus, dass Träger dieses Polymorphismus eine bessere kognitive Leistung in Schnelligkeitsaufgaben aufwiesen. In Übereinstimmung mit einer möglichen

verminderten GC-Wirkung auf das Hirngewebe oder das Gefäßsystem aufgrund einer verringerten GR-Aktivität zeigten ER22/23EK-Träger auch eine geringere Progression subkortikaler Läsionen (48). Es gibt ebenfalls Studien über Korrelationen zwischen dem ER22/23EK-Polymorphismus und dem Auftreten von Depressionen. In einer Kohorte aus depressiven Patienten wurde eine höhere Anfälligkeit für die wiederholte Entwicklung einer schweren depressiven Episode mit dem Vorhandensein des ER22/23EK-Polymorphismus in Verbindung gebracht und Träger dieses Polymorphismus sprachen schneller auf eine antidepressive Behandlung an (40). Van West et al. beschrieben ebenfalls ein höheres Aufkommen des ER22/23EK-Polymorphismus in einer schwedischen Gruppe von Patienten mit Depression (49).

Der GR-Polymorphismus A3669G ist eine GR-Variante im Exon 9 β (50). Trotz des günstigeren Stoffwechselprofils konnte das Vorhandensein von A3669G in der Allgemeinbevölkerung mit erhöhten Entzündungsparametern und Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (51, 52). Konkret bedeutet das, dass Personen, die homozygot für den Haplotyp 3 sind ein mehr als zweifach erhöhtes Risiko für einen Herzinfarkt und ein fast dreifach erhöhtes Risiko für eine koronare Herzkrankheit im Vergleich zu nicht homozygoten Personen aufwiesen. Außerdem waren ihre Werte für das C-reaktive Protein und Interleukin 6 höher, und die Karotis-Intima-Media war dicker (52). Bei Patienten mit CS hat eine Studie aus dem Jahr 2012 gezeigt, dass die Häufigkeit von Diabetes mellitus Typ 2 bei Patienten mit dem GR-Polymorphismus A3669G geringer ist als beim Wildtyp (19 vs. 68 %, $P < 0,05$), trotz erhöhter Cortisolspiegel im Serum am Morgen und in der Nacht (50). Müller et al. konnten in ihrer Studie den Einfluss des SNPs A3669G auf die Muskelkraft in CS-Patienten aufzeigen (53) und kamen zu dem Schluss: „Träger des mutierten Allels wiesen eine stärkere Griffkraft beider Hände auf, als Träger des Wildtyp-Allels (dominante Hand: 99 vs. 89 %, $p = 0,013$; nicht-dominante Hand: 105 vs. 91 %, $p = 0,032$)“ (53).

1.5 Fragestellung / Aufbau der Arbeit

Viele Studien haben gezeigt, dass Patienten mit CS auch mehrere Jahre nach erfolgreicher Therapie noch eine schlechtere Lebensqualität angeben als eine gesunde Kontrollgruppe (54-56).

„Warum manche Menschen unter ähnlich widrigen Bedingungen erfolgreich sind und andere zusammenbrechen, ist eine zentrale Frage in der Neuroendokrinologie der stressbedingten Psychopathologie“, schreiben DeRjick et al. in seinem Review über GR-Polymorphismen (57). Durch unsere Studie sollen die interindividuellen Unterschiede in CS Patienten und deren Krankheitsverläufen besser verstanden werden. Wir haben uns die Frage gestellt, wie es sein kann, dass ein Patient sich, trotz biochemischer und klinischer Remission, psychisch nicht stabilisiert und weiterhin unter einer eingeschränkten Lebensqualität leidet, während ein anderer Patient sich deutlich schneller nach Remissionseintritt erholt. Auch die Varianz in Hinblick auf das Ausmaß der psychischen Beeinträchtigung ist bisher nicht hinreichend verstanden worden.

Daher ist das Ziel unserer Studie einen möglichen Zusammenhang zwischen GR-Polymorphismen und psychischen Erkrankungen beziehungsweise einer eingeschränkten Lebensqualität bei Patienten mit endogenem CS zu untersuchen.

2. METHODIK

2.1 Patientenkohorte und Forschungsdesign

Im Rahmen dieser Arbeit führten wir eine multizentrische Studie innerhalb des deutschen Cushing Registers „Custodes“ durch und konnten insgesamt 331 Patienten mit endogenem CS aus den Studienzentren München, Würzburg und Berlin, rekrutieren (LMU München (n = 207); Universitätsklinikum Würzburg (n = 73), Endokrinologie in Charlottenburg, Berlin (n = 51)).

„Custodes“ wurde 2012 von der Sektion Nebenniere der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE) gemeinsam mit Prof. Dr. Martin Reincke (LMU München) gegründet. Durch die Else Kröner-Fresenius-Stiftung erhält das Register seit 2013 Förderungen in Form von Personal, Investitionen und Sachmitteln. Ziel ist es, möglichst vollständige Krankheitsverläufe der Patienten zu dokumentieren, um Diagnostik, Therapie und Ausgang des CS durch Studien zu erforschen und zu optimieren. Unter den teilnehmenden Zentren sind die Universitätskliniken München, Würzburg, Tübingen, Düsseldorf, Dresden, Charité Berlin, Erlangen, sowie die Endokrinologischen Schwerpunktpraxen Prof. Dr. Marcus Quinkler in Berlin und Prof. Dr. Michael Droste in Oldenburg.

Die Patientendaten werden pseudonymisiert in einer Datenbank erfasst. Bei nachgewiesenem CS werden auch nach Remissionseintritt Symptome und Therapie durch Nachsorgeuntersuchungen, die mindestens jährlich durchgeführt werden, weiter dokumentiert, um auch hier Unterschiede im Krankheitsverlauf festhalten und untersuchen zu können.

Das Protokoll wurde von den Ethik-Kommissionen der beteiligten Zentren genehmigt (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). Alle Patienten haben eine schriftliche Einverständniserklärung abgegeben. Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

Für die vorliegende Studie wurden Patienten mit ektopen oder exogenem CS sowie Patienten mit Nebennierenrindenzinomen (ACC) ausgeschlossen. Wir haben

Patientendaten im Zeitraum zwischen 2012 und 2020 verwendet. Es sind sowohl Patienten mit erstdiagnostiziertem, als auch mit rezidivierendem CS, sowie kürzlich operierte Patienten (Remission < 2 Jahre) und Patienten in bereits langjähriger Remission (Remission > 2 Jahre) in unsere Studie eingeschlossen worden (Gesamtzahl n=331). 36 der 331 oben genannten Patienten wurden wegen fehlender oder unvollständig ausgefüllter Fragebögen ausgeschlossen. Als feststehende Einschlusskriterien musste bei allen Patienten eine Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Vollblut-Probe zur Genotypisierung abgenommen worden sein und mindestens ein Fragebogen zur Lebensqualität vollständig ausgefüllt vorliegen. Mit 295 Patienten haben wir eine Querschnittsstudie durchgeführt. Davon sind 81 Patienten mit einem floridem CS inkludiert worden und 214 Patienten in Remission. Darüber hinaus führten wir eine Längsschnittstudie mit 120 Patienten aus der ursprünglichen Kohorte durch, die sowohl zu Registereintritt (81 mit floridem CS, 39 in Remission) als auch nach $1,5 \pm 0,9$ Jahren bei der Nachsorgeuntersuchung (18 Patienten mit noch floridem CS, 102 in Remission) betrachtet wurden. In der Längsschnittstudie konzentrierten wir uns auf die Patienten mit floridem CS bei Registereintritt und Remission bei Follow-up (n=63). Wir sind von einem CS in Remission ausgegangen, wenn die biochemischen Tests (siehe 2.2) im Normbereich lagen oder eine bilaterale Adrenalectomie durchgeführt worden war. Bei bestehendem Hypercortisolismus ordneten wir die Patienten der Gruppe „florides CS“ hinzu.

2.2 Einteilung in florides Cushing Syndrom und Remission

Um die Diagnose eines CS zu stellen und die biochemische Remission nach der Operation zu sichern, führten wir gemäß den aktuellen Leitlinien ein standardisiertes biochemisches Screening durch, welches die Cortisolmessung im Mitternachtsspeichel, die Messung des freien Cortisols im 24-Stunden-Urin (24h-UFC) und die des Serumcortisols nach Gabe von 1 mg Dexamethason (1 mg-DST) beinhaltet (12).

2.3 Genotypisierung der Einzelnukleotid-Polymorphismen

2.3.1 DNA-Extraktion

Die genetische Analyse wurde wie zuvor von Müller et al. beschrieben durchgeführt (53). Im Rahmen unserer Studie untersuchten wir, nach Protokoll des Herstellers, eine 200 µl EDTA-Vollblut-Probe eines jeden Patienten auf *BclI*, N363s, A3669G und ER22/23EK, vier verschiedene Glucocorticoid-Rezeptor-Polymorphismen. Dafür extrahierten wir die DNA mit Hilfe des QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) aus peripheren Leukozyten. Das endgültige Eluat enthielt gerundet 6 µg DNA in 200 µl AE-Puffer, was einem durchschnittlichen DNA-Gehalt von 30 ng/µl entspricht. Die isolierte DNA validierten wir, indem wir stichprobenartig ein Nano-Drop Microvolume Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verwendeten, welches das Wellenlängenverhältnis 280nm:260nm aufwies, und auf eine DNA-Konzentration von 30 ng/µl eingestellt war.

2.3.2 Konventionelle Polymerasekettenreaktion (PCR)

An die oben beschriebene DNA-Extraktion schloss sich eine konventionelle PCR als Vorbereitung auf das in Unterpunkt 2.3.3 beschriebene Verfahren Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) zur Genotypisierung der GR-Polymorphismen *BclI*, N363S und ER22/23EK an. Die konventionelle PCR dient dazu, den DNA-Abschnitt, auf dem die gesuchten Punktmutationen liegen, zu amplifizieren. Für jeden Polymorphismus habe ich jeweils zwei gegenläufige Primer verwendet. Diese Verfahren führte ich nach dem von Müller et al. modifizierten und zuvor von Trementino et al. beschriebenen Protokoll durch (50, 53). Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze (10 µl) für die PCR sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Durchführung der konventionellen PCR, Quelle: Eigene Darstellung Lara Feldkamp

Reaktionsansatz	Volumen	Konzentration
5X Green GoTaq® Reaction Buffer	1 µl	0,5-fach
MgCl₂ Lösung (25mM, Magnesiumchlorid)	0,8 µl	
dNTP-Mix (10mM, Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix)	0,2 µl	10 mM je dNTP
Vorwärtsprimer	0,2 µl	0,1 µM
Rückwärtsprimer	0,2 µl	0,1 µM
GoTaq® DNA Polymerase (5u/µl)	0,05 µl	1,25 U
DNA-Probe	1 µl	30 ng/µl
Nuklease-freies Wasser	6,55 µl	

Das PCR-Regime, mit dem die DNA anschließend amplifiziert wurde, setzte sich aus einer anfänglichen Denaturierung bei 94°C für 4 Minuten, 35 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden, spezifischer Primerhybridisierung bei 55°C für *BclI*, 58°C für N363S und 56°C für ER22/23EK für 30 Sekunden, einer Kettenelongation bei 72°C für 30 Sekunden und einer abschließenden Elongation bei 72°C für 7 Minuten zusammen. Durchgeführt wurde die PCR mit einem Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Für den Nachweis des Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) *BclI* wurden der Vorwärtsprimer 5'-TGCTGCCTTATTTGTAAATTCGT-3' und der Rückwärtsprimer 5'-AAGCTTAACAATTTGGCCATC-3' verwendet, was zu einem PCR-Fragment mit einer Länge von 335 Basen führte. Für den SNP ER22/23EK wurden der Vorwärtsprimer 5'-CGGAGTAACTAAAAGGTTC-3' und der Rückwärtsprimer 5'-GGGTTTTATAGAAGTCCATC-3' verwendet, was zu einem PCR-Fragment mit einer Länge von 225 Basen führte. Zur Bestimmung des N363S-Polymorphismus wurde DNA mit dem Vorwärtsprimer 5'-AGTACCTCTGGAGGACAGAT-3' und dem Rückwärtsprimer 5'-TACCATTCTTAAGAACAGA-3' amplifiziert, was zu einem PCR-Fragment mit einer Länge von 248 Basen führte. Alle Proben wurden mindestens zweimal analysiert.

2.3.3 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus

Die nachfolgende Hydrolyse im Rahmen der RFLP führten wir mit dem Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durch. Dabei wurde die zuvor vervielfachte DNA mit jeweils vier Einheiten der Restriktionsenzyme *BclI*, (für *BclI*), *MnII* (für ER22/23EK) und *MluCI* (für N363S) von New England Biolabs (Ipswich, MA, US) hydrolysiert. Die Temperatur der Hydrolyse beim *BclI* Polymorphismus betrug 50°C und ich verwendete den 3.1 Puffer. N363S und ER22/23EK wurden bei 37°C unter Verwendung des CutSmart Puffers hydrolysiert. Das Volumen der Ansätze betrug insgesamt 20 µl, 3 µl PCR-Produkt, die genannten Restriktionsenzyme, spezifische Puffer und Nuklease-freies Wasser. Restriktionsenzyme, auch Restriktionsendonukleasen oder Endonukleasen, sind Enzyme, die eine bestimmte DNA-Sequenz spezifisch erkennen und schneiden können. Das lässt sich nutzen, um die DNA auf die SNPs *BclI*, N363S und ER22/23EK zu untersuchen. Die Endonukleasen hydrolysieren den Wildtyp und erhalten wiederum jene DNA-Fragmente, die das mutierte Allel tragen, in ihrer Ausgangsform.

2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zum Abschluss erfolgte eine Gelelektrophorese. Dieses Verfahren ermöglicht es, die DNA-Fragmente aus den vorangegangenen Schritten in Banden darzustellen und so, anhand deren Anzahl und Größe, den Genotyp der analysierten Proben zu erkennen. Die Zusammensetzung des Agarosegels wird in Tabelle 2 gezeigt.

Als Molekulargewichtsstandard wurde eine DNA Low Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA) für den Polymorphismus *BclI* und eine Low Range DNA Ladder (Jena Bioscience, Jena, Germany) für die SNPs N363S und ER22/23EK verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100 Volt in einem MGU-302 (C.B.S. Scientific Co., Del Mar, CA, USA). Die anschließende Visualisierung erfolgte mit einem Typhoon 8600 Variable Mode Imager (Amersham Biosciences, Little Chalfon Buckin-ghamshire, UK).

Wie unter 2.3.2 beschrieben, entsteht bei SNP *BclI* im Rahmen der PCR ein DNA-Fragment mit einer Länge von 335 Basenpaaren (bp). Liegt eine Punktmutation homozygot, also nur auf einem Chromosom vor, wird die DNA nicht hydrolysiert und es

erscheint eine Bande bei 335 bp Länge. Befindet sich die Mutation auf beiden homologen Chromosomen, spricht man von einer Homozygotie und es stellen sich zwei Banden bei 114, 221 und 335 bp dar. Ebenfalls im Unterpunkt 2.3.2 wurde erklärt, dass die Restriktionsenzyme nur den Wildtyp hydrolysieren. Dies geschieht dann, wenn die DNA auf beiden homologen Chromosomen als Wildtyp vorliegt. In der Elektrophorese zeigen sich folglich zwei Banden, eine bei 114 bp und eine bei 221 bp Länge (siehe Abbildung 1).

Tabelle 2: Zusammensetzung des Agarosegels zur Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese. Quelle: Eigene Darstellung Lara Feldkamp

<i>Bcl</i>	N363S	ER22/23EK
0,6 g Agarose	0,8 g Agarose	1,2 g Agarose
40 ml TBE-Puffer (TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)-Borat-EDTA-Puffer)	40 ml TBE-Puffer	40 ml TBE-Puffer
2 µl SYBR-Safe	2 µl SYBR-Safe	2 µl SYBR-Safe

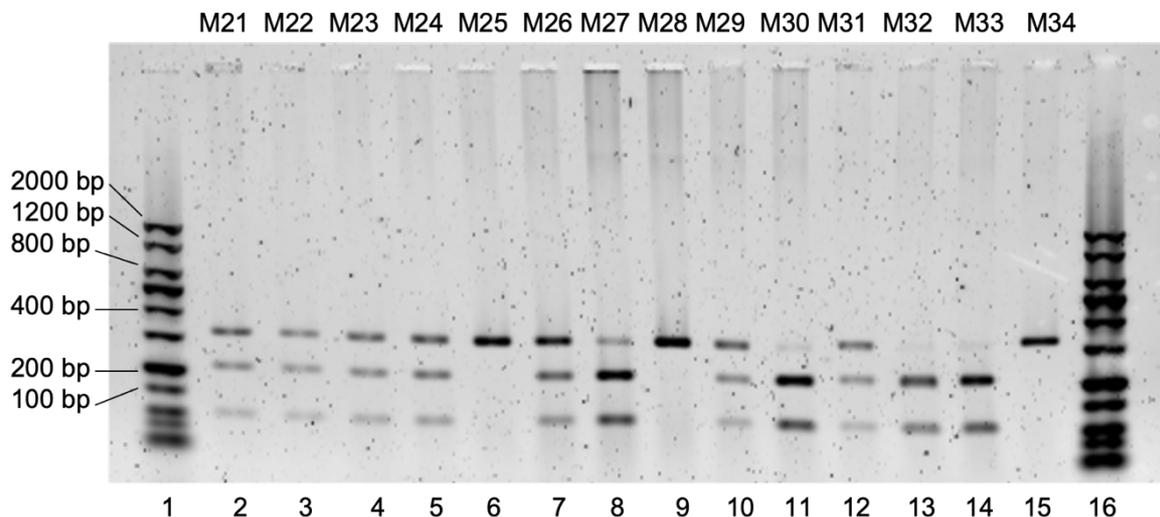


Abbildung 1: SNP *Bcl*: Gelelektrophorese der vervielfachten und hydrolysierten DNA.

M21-M34 stellen die Pseudonyme der Patientenproben dar. In der 1. Und 16. Sparte wurde die DNA Low Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA) aufgetragen. Träger des Wildtyp-Allels zeigen Banden bei 114 und 221 Basenpaaren (M27 (im Verlauf erneut überprüft), M30, M32, M33). Heterozygote Träger des mutierten Allels zeigen Banden bei 114, 221 und 335 Basenpaaren (M21-M24, M26, M29, M31). Homozygote Träger des mutierten Allels zeigen eine Bande bei 335 Basenpaaren (M25, M28, M34). Quelle: Eigene Abbildung Lara Feldkamp

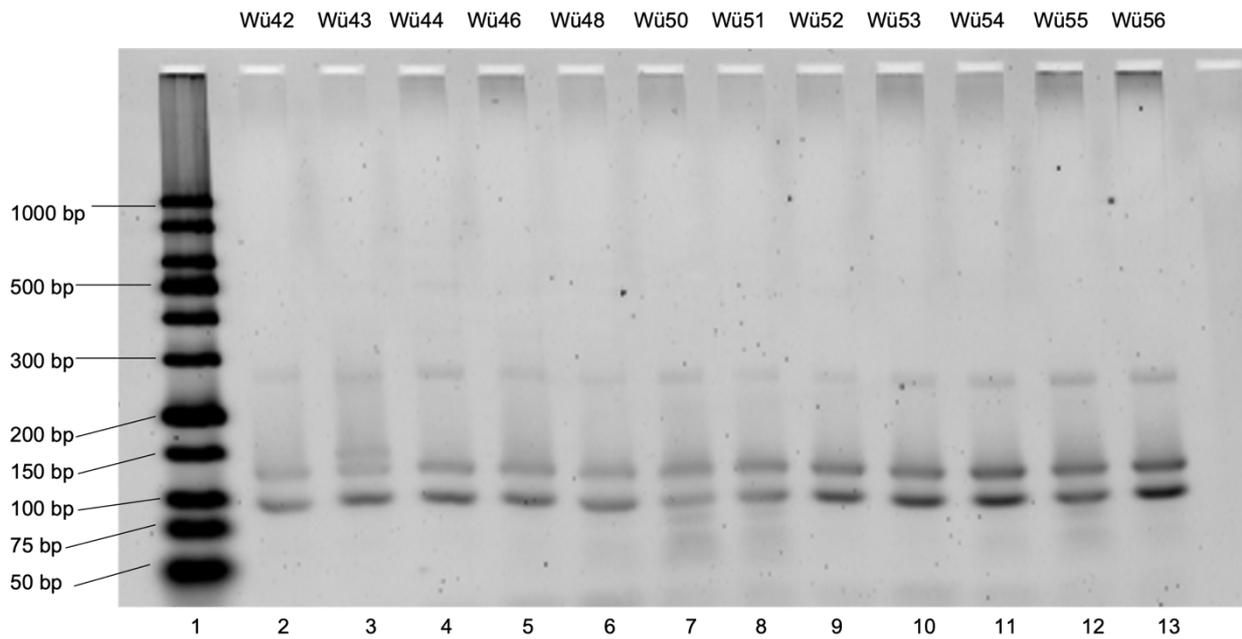


Abbildung 2a: SNP N363S: Gelelektrophorese der vervielfachten und hydrolysierten DNA.

2a: Wü42-44, Wü46 und 48 sowie Wü50-56 stellen die Pseudonyme der Patientenproben dar. In der 1. Sparte wurde eine Low Range DNA Ladder (Jena Bioscience, Jena, Germany) aufgetragen. Träger des Wildtyp-Allels zeigen Banden bei 95 und 134 Basenpaaren (Wü42, Wü44-Wü46). Heterozygote Träger des mutierten Allels zeigen Banden bei 95, 134 und 153 Basenpaaren (Wü43). Homozygote Träger des mutierten Allels zeigen Banden bei 95 und 153 Basenpaaren (M25 in Abbildung 2b).

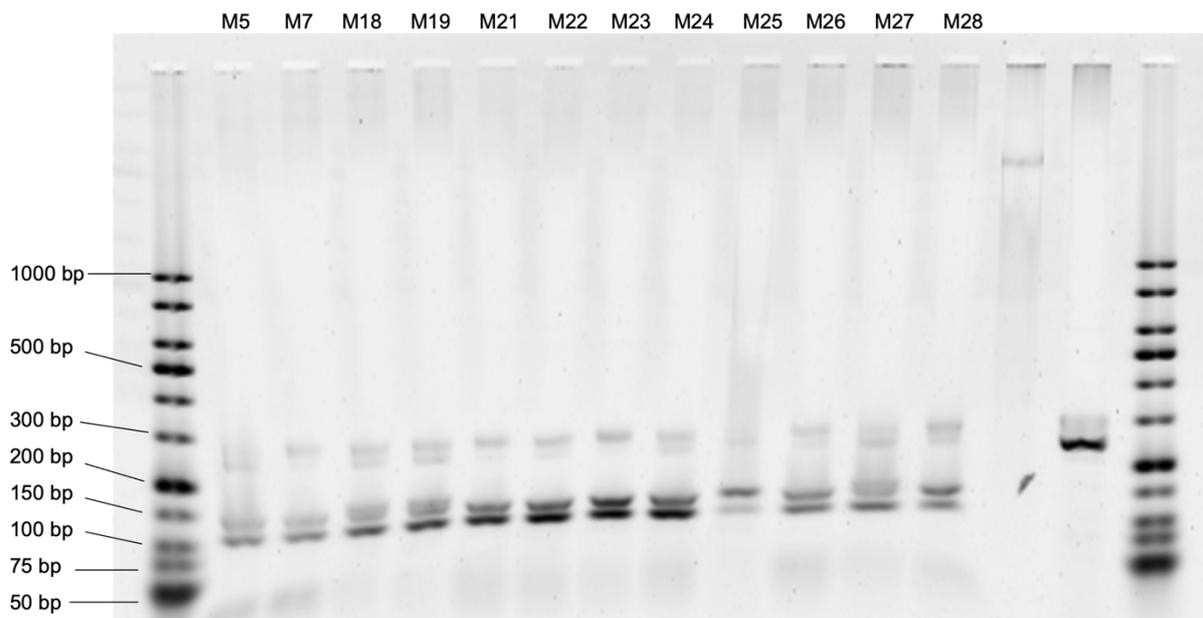


Abbildung 2b: SNP N363S: Gelelektrophorese der vervielfachten und hydrolysierten DNA.

M5-M28 stellen die Pseudonyme der Patientenproben dar. In der 1. Spalte wurde eine Low Range DNA Ladder (Jena Bioscience, Jena, Germany) aufgetragen. Homozygote Träger des mutierten Allels zeigen Banden bei 95 und 153 Basenpaaren (M25). Quelle: Eigene Abbildung Lara Feldkamp

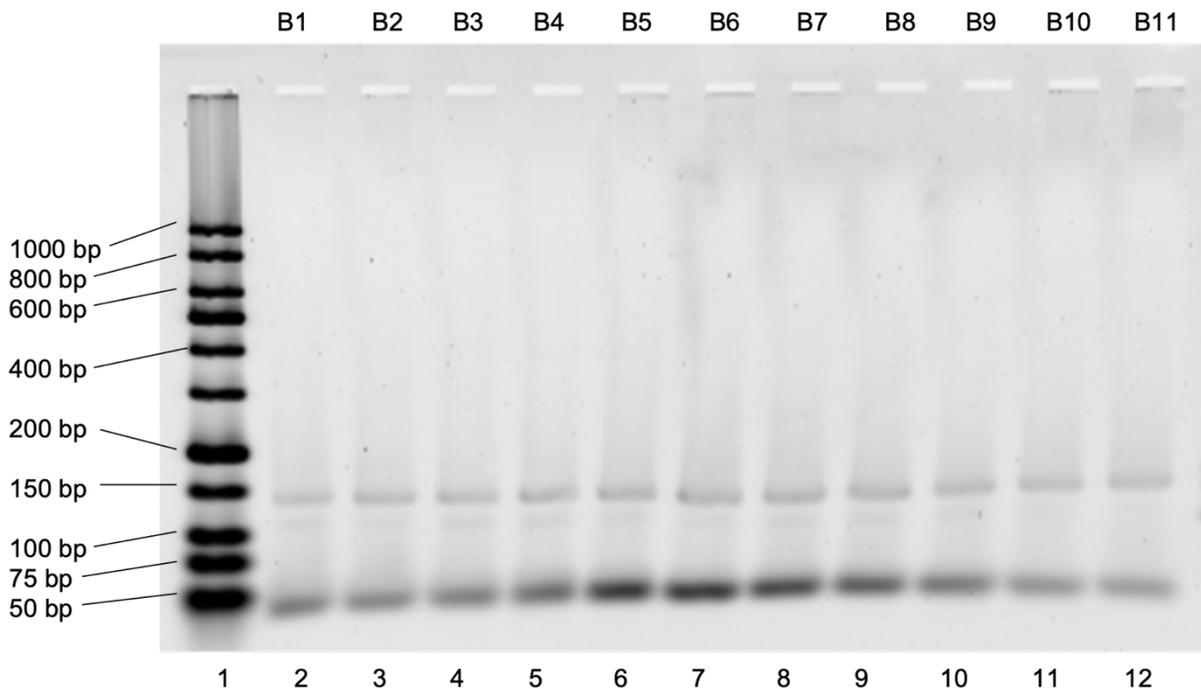


Abbildung 3a: SNP ER22/23EK: Gelelektrophorese der vervielfachten und hydrolysierten DNA.

B1-B12 stellen die Pseudonyme der Patientenproben dar. In der 1. Spalte wurde eine Low Range DNA Ladder (Jena Bioscience, Jena, Germany) aufgetragen. Träger des Wildtyp-Allels zeigen Banden bei 38, 44 und 143 Basenpaaren (B1-B11). Heterozygote Träger des mutierten Allels zeigen Banden bei (38, 44) 143 und 187 Basenpaaren (Abbildung 3b). Homozygote Träger des mutierten Allels wurden in unserer Studie nicht gefunden. Quelle: Eigene Abbildung Lara Feldkamp

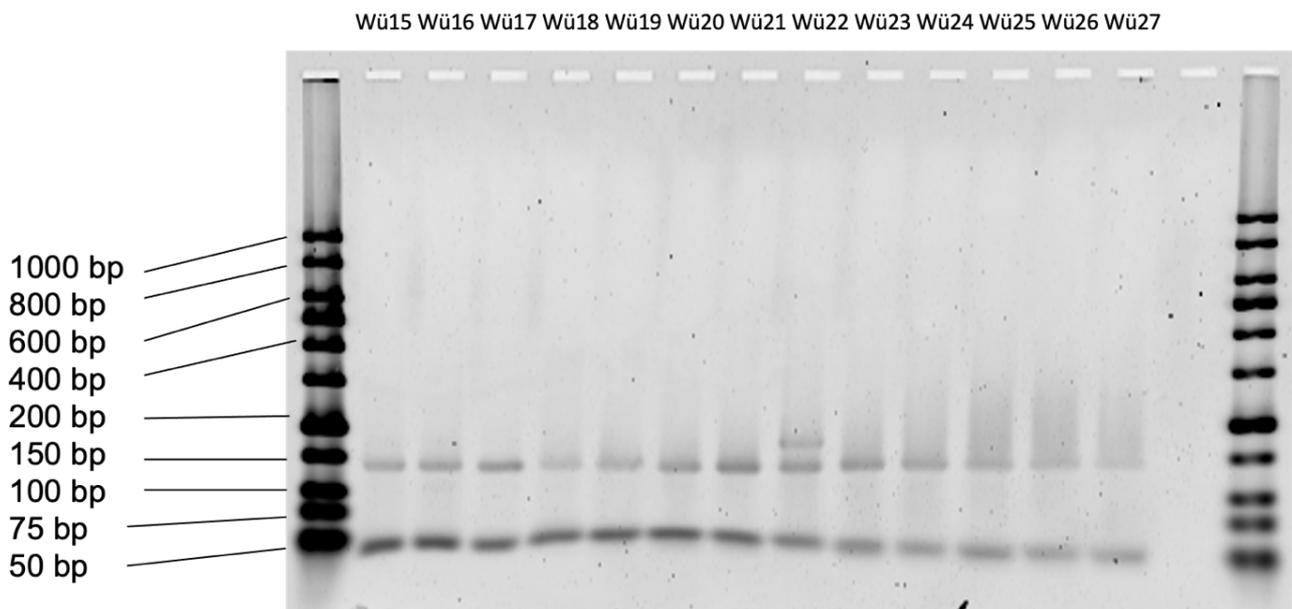


Abbildung 3b: SNP ER22/23EK: Gelelektrophorese der vervielfachten und hydrolysierten DNA. Wü15-Wü27 stellen die Pseudonyme der Patientenproben dar. In der 1. Spalte wurde eine Low Range DNA Ladder (Jena Bioscience, Jena, Germany) aufgetragen. Träger des Wildtyp-Allels zeigen Banden bei 38, 44 und 143 Basenpaaren (Wü15-Wü21, Wü23-Wü27). Heterozygote Träger des mutierten Allels zeigen Banden bei (38, 44) 143 und 187 Basenpaaren (Wü22). Homozygote Träger des mutierten Allels wurden in unserer Studie nicht gefunden. Quelle: Eigene Abbildung Lara Feldkamp

2.3.5 Duplex-Real-Time TaqMan Polymerase-Kettenreaktion

Für die Genotypisierung des SNP A3669G wurde eine Real-Time PCR unter Verwendung des von Thermofisher Scientific entwickelten TaqMan® SNP Genotyping Assays der ID C___8951023_10 (applied Biosystems by Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA) durchgeführt. Der von uns verwendete Ansatz hatte ein Volumen von 22,5µl und beinhaltete 50ng genomischer DNA, 12,5 µl TaqMan MasterMix, 0,625 µl Assay, 0,625 µl TE-Puffer und 8,75 µl Nuklease-freies Wasser. Welche Probe welchem Genotyp entspricht wurde anschließend durch die *post PCR-read allelic discrimination plot* Analyse mit Hilfe von Fluoreszenzsignalen von unterschiedlichen Farbstoffen visualisiert. Die DNA wurde mit einem Thermocycler von BioRad, CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System unter den folgenden Bedingungen

amplifiziert: initiale Denaturierung bei 95°C für zehn Minuten, anschließend 40 Zyklen Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden, zum Schluss Annealing bei 60°C für eine Minute.

Durch die zeitgleiche Amplifikation und Detektion von spezifischen DNA-Sequenzen unterscheidet sich die Real-Time PCR von der konventionellen PCR. Es gibt verschiedene Verfahren, mit deren Hilfe die Quantität der vervielfältigten DNA-Matrizen direkt ausgewertet werden können. In dieser Studie verwendeten wir das TaqMan™ System, welches neben der Polymeraseaktivität auf der 5'-3' Exonucleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase basiert (74). Außerdem nutzten wir einen Quencher zur Fluoreszenzauslöschung, um ein durchgehendes Leuchten der PCR-Fragmente zu verhindern. Das Quencher-Molekül übernimmt die Energie des angeregten fluoreszierenden Farbstoffes, sodass erst einmal keine Emission des ersten fluoreszierenden Moleküls stattfindet. Im Verlauf wird dann das Fluoreszenzmolekül vom Quencher getrennt und die spezifische Fluoreszenz kann bei bestimmter Wellenlänge gemessen werden (58). Diese Trennung erfolgt durch die Exonucleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase. In unserer Studie verwendeten wir neben zwei spezifischen Primern zwei TaqMan Sonden, die am 3'-Ende ein fluoreszierendes Farbstoff-Molekül und am 5'-Ende besagten Quencher tragen. Beim Wildtyp-Allel handelt es sich um den FAM™ Farbstoff (=6-Carboxyfluorescein) und beim mutierten Allel um den VIC® Farbstoff (=2'-Chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxy-fluorescein). Diese unterschiedlichen Fluoreszenzmoleküle werden zur Detektion der DNA-Sequenzen verwendet. Sie werden während des Prozesses durch kurzwelligeres Licht angeregt und als Reaktion emittieren sie höherwelliges Licht. Diese Strahlung wird in jedem abgelaufenen Zyklus der PCR abgelesen und die Intensität der Fluoreszenz analysiert (74). Über die Wellenlängenfrequenz kann festgestellt werden, welche TaqMan-Sonde an die DNA gebunden hat und um welchen Genotyp es sich bei der untersuchten Probe handelt.

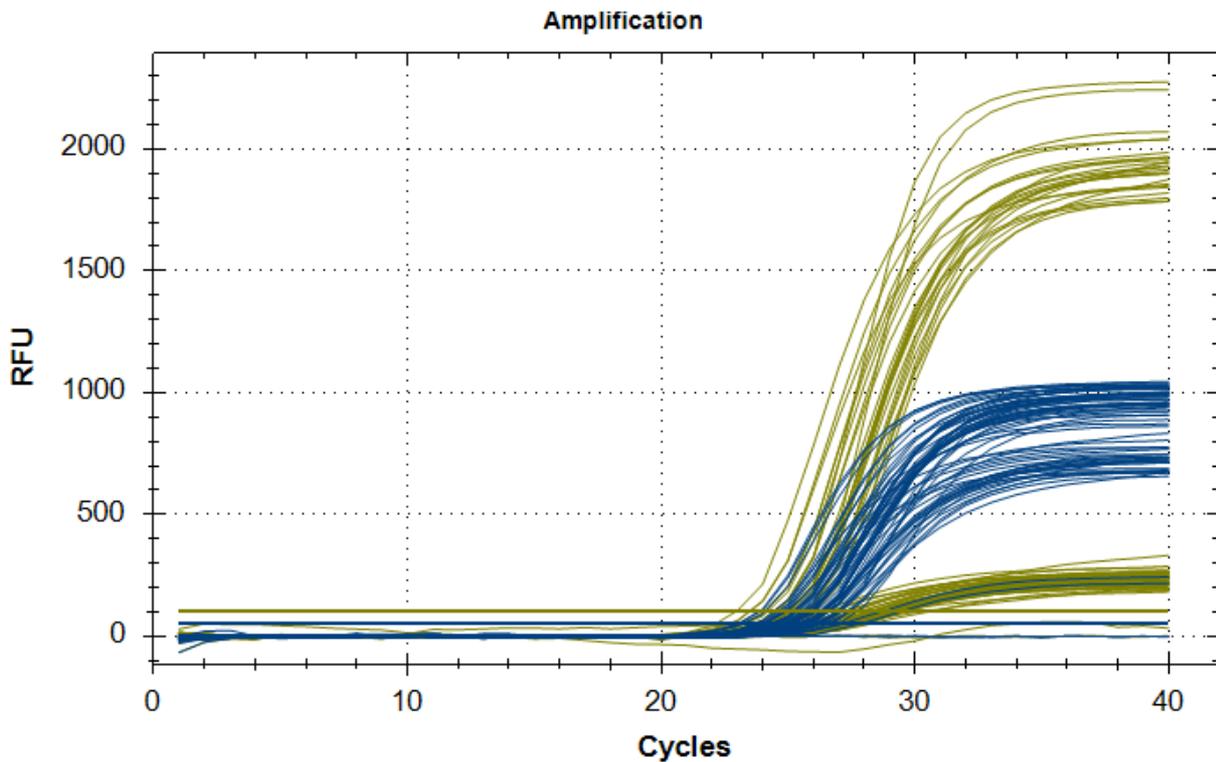


Abbildung 4: Amplifikationskurven der Fluoreszenz-Signale einer Duplex-Real-Time TaqMan PCR (Polymerase-Kettenreaktion). FAM™ (Wildtyp-Allel) als blauer Graph und VIC® (mutiertes Allel) als grüner Graph in RFU („relative fluorescent units“, relative Fluoreszenz-Einheiten) dargestellt. Quelle: Eigene Abbildung Lara Feldkamp

2.3.6 Gruppeneinteilung der Patienten nach Genotypen

In unserer longitudinalen Betrachtung haben wir uns dazu entschlossen, aufgrund der geringen Anzahl von Patienten mit einem mutierten Allel, vor allem der SNPs ER22/23EK und N363S, zwei Gruppen mit entweder hoher (Gruppe "hoch": Minor-Allel für N363S und BclI; n=22) oder niedriger (Gruppe "niedrig": Minor-Allel für ER22/23EK und A3669G; n=8) GR-Sensitivität zu bilden (Tabelle 3). Tabelle 7 im Ergebnisteil zeigt die Allel-Häufigkeiten in unserer Patientenkohorte. In dieser Studie haben wir uns nicht mit Haplotypen, bei denen mehrere SNPs in einem Genotyp kombiniert auftreten, befasst.

Tabelle 3: Gruppe 1 mit N363S und BclI -Polymorphismus, die eine erhöhte GR-Sensitivität aufweisen und Gruppe 2 mit ER22/23EK und A3669G und einer niedrigeren GR-Sensitivität. Rot sind die jeweils in einzelnen Analysen betrachteten mutierten SNPs, grün die Wildtyp SNPs.
 Quelle: Eigene Darstellung Lara Feldkamp

Group 1				
Increased GR sensitivity	ER22/23EK wildtype	A3669G wildtype	Bcl-I wildtype	N363S minor allele carrier
Increased GR sensitivity	ER22/23EK wildtype	A3669G wildtype	Bcl-I minor allele carrier	N363S minor allele carrier
Increased GR sensitivity	ER22/23EK wildtype	A3669G wildtype	Bcl-I minor allele carrier	N363S wildtype
Group 2				
Decreased GR sensitivity	ER22/23EK minor allele carrier	A3669G wildtype	Bcl-I wildtype	N363S wildtype
Decreased GR sensitivity	ER22/23EK minor allele carrier	A3669G minor allele carrier	Bcl-I wildtype	N363S wildtype
Decreased GR sensitivity	ER22/23EK wildtype	A3669G minor allele carrier	Bcl-I wildtype	N363S wildtype

2.4 Fragebögen zur Erfassung der Lebensqualität

Die von uns verwendeten Fragebögen zur Erfassung der Lebensqualität sind zu einem Teil krankheitsspezifisch (CushingQoL (59) und Tuebingen CD-25 (60)) und zum anderen Teil allgemein gesundheitsbezogen (SF-36 Health Survey (61)). In allen drei Fragebögen können die Werte von null bis 100 reichen. Im SF-36 und im CushingQoL deuten höhere Werte auf eine bessere Lebensqualität hin, während für den Tübinger CD-25 das Gegenteil zutrifft.

Beim SF-36 handelt es sich um einen allgemeinen, subjektiven Gesundheitsfragebogen zur Erfassung der Lebensqualität (61, 62). Der Fragebogen erfasst neben dem psychischen Zustand, inklusive Depression und Angst, auch die Funktionsfähigkeit im Rahmen normaler sozialer Aktivitäten oder zum Beispiel körperliche Schmerzen. Er setzt sich aus acht Themenbereichen mit jeweils unterschiedlich vielen Fragen zusammen.

Darunter fallen:

- 1) körperliche Funktionsfähigkeit (zehn Fragen)
- 2) körperliche Rollenfunktion (vier Fragen)
- 3) körperliche Schmerzen (zwei Fragen)
- 4) allgemeine Gesundheitswahrnehmung (fünf Fragen)
- 5) Vitalität (vier Fragen)
- 6) soziale Funktionsfähigkeit (zwei Fragen)
- 7) emotionale Rollenfunktion (drei Fragen)
- 8) psychisches Wohlbefinden (fünf Fragen)

Die Fragen werden zusammengerechnet und es entstehen acht Dimensionen mit Werten von null bis 100. Wie oben erwähnt weisen höhere Werte auf einen besseren Gesundheitszustand hin. Die Daten, die uns aus Berlin, Würzburg und München hier zur Verfügung standen, umfassten die Punktwerte jeder der acht Teilbereiche.

Der Cushing QoL Fragebogen ist krankheitsspezifisch und wurde in 16 Sprachen übersetzt und jeweils kulturell angepasst. Cushing QoL ist einfach auszufüllen und wurde auf Umsetzbarkeit und gute psychometrische Eigenschaften in Bezug auf Validität und Aussagekraft getestet (59).

Der Fragebogen setzt sich aus zwölf Fragen zusammen:

- 1) Ich habe Schlafstörungen (ich wache nachts auf, kann lange nicht einschlafen, etc.).
- 2) Ich habe Schmerzen, die es mir unmöglich machen, ein normales Leben zu führen.
- 3) Verletzungen heilen nur langsam.
- 4) Ich bekomme leicht blaue Flecken.
- 5) Ich bin leicht reizbar, habe Stimmungswechsel und rege mich plötzlich auf.
- 6) Ich habe weniger Selbstvertrauen, fühle mich unsicherer.

- 7) Ich habe weniger Lust, auszugehen oder mich mit Freunden oder Verwandten zu treffen.
- 8) Wegen meiner Krankheit habe ich meine privaten Beschäftigungen und meine Freizeitaktivitäten einstellen müssen.
- 9) Meine Krankheit beeinträchtigt meine Alltagsaktivitäten wie Arbeiten oder Lernen.
- 10) Ich bin vergesslicher geworden.
- 11) Mein verändertes Aussehen aufgrund meiner Krankheit bereitet mir Sorgen.
- 12) Ich mache mir Sorgen um meine zukünftige Gesundheit.

Die Patientenantworten wurden mit 1 bis 5 Punkten bewertet, wobei "1" für "Immer" oder "Sehr viel" und "5" für "Nie" oder "Gar nicht" steht. Der Effekt auf die HRQoL ist bei niedrigen Werten umso größer. 12 Punkte ergeben dabei die geringste HRQoL und 60 Punkte die höchste HRQoL. Das Ergebnis kann nur verwertet werden, wenn höchstens 25 % der Fragen nicht beantwortet wurden. In einem nächsten Schritt können die Punktwerte (12-60 Punkte) in einen Wert zwischen null und 100 umgerechnet werden (Formel: $Y=(X)-\min(\max-\min)\times 100$), um so die Werte zu standardisieren und die Auswertung zu erleichtern. Null ist, wie weiter oben bereits erwähnt, die schlechteste HRQoL und 100 die beste HRQoL (63). Im „Custodes“ Register wurden die Subkategorien nicht einzeln betrachtet, sondern nur als eine Endsumme.

Der Fragebogen Tuebingen CD-25 ist ebenfalls spezifisch für das CS und ermöglicht die Unterscheidung zwischen sechs Teilbereichen der HRQoL beim CS. Er ist einfach zu handhaben und bietet alters- und geschlechtsnormierte Referenzen (60). Die Teilbereiche setzen sich aus folgenden Punkten zusammen:

- 1) *Depression*
- 2) *Sexuelle Aktivität*
- 3) *Umwelt*
- 4) *Essverhalten*
- 5) *Körperliche Belastbarkeit*
- 6) *Kognitive Leistungsfähigkeit*

Die einzelnen Fragen beginnen alle mit „Wegen meiner Cushing Erkrankung...“. Die Skala der Antwortmöglichkeiten geht von eins bis vier, wobei „1“ für „stimmt niemals“ und

„4“ für „stimmt immer“ steht. Es wurde festgelegt, dass der Gesamtwert jedes Teilbereichs mindestens null und höchstens 100 beträgt, wobei höhere Werte eine geringere Lebensqualität bedeuten. Die einzelnen Fragen (1-4 Punkte) werden zusammengerechnet und ergeben einen Punktwert pro Kategorie. Dieser Punktwert wird ebenfalls mithilfe einer Formel umgerechnet, um Werte von null bis 100 zu generieren.

2.4.1 Weitere klinische und laborchemische Daten

Die biochemischen Tests wurden wie bereits in unserer Publikation beschrieben durchgeführt (53, 64, 65). Die Messung von Serum-Cortisol und Plasma-ACTH erfolgte mit Festphasen-Antigen-gebundener Technik (Cortisol: Liaison®, DiaSorin, Saluggia, Italien) und Chemilumineszenz-Immunoassays (ACTH mit Liaison®, DiaSorin; ACTH und Cortisol mit IMMULITE®, Siemens, Deutschland). Die Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten lagen unter 5 % und 7 % (Cortisol) bzw. unter 13 % (ACTH). Das freie Cortisol im Urin wurde mit einem Chemilumineszenz-Immunoassay (ADVIA Centaur®, Siemens) oder einem Radioimmunoassay (Beckman Coulter) mit Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten von unter 7 % analysiert. Speichelcortisol wurde mit einem Lumineszenz-Immunoassay (IBL, Hamburg, Deutschland) gemessen, wobei die Intra- und Inter-Assay-Koeffizienten unter 9 % bzw. 6 % lagen.

Die klinischen und biochemischen Merkmale unserer CS-Patientenkohorte mit GR-Analyse und mindestens einem ausgefüllten Fragebogen sind in Tabelle 4 im Ergebnisteil dargestellt. Zur näheren Charakterisierung unserer Kohorte haben wir des Weiteren den CS Subtypen, in dem Fall adrenal und hypophysär, erhoben. In den Fragebögen nicht erfasste Daten zu Komorbiditäten, Medikamenten und dem bisherigen Krankheitsverlauf wurden anamnestisch erfragt. Darüber hinaus generierten wir Parameter wie Puls und Blutdruck, Geschlecht, Alter, Körpergewicht, Körpergröße, Oberarm-, Hüft- und Taillenumfang und den BMI. Außerdem bestimmten wir einige Laborwerte, darunter Natrium, Kalium, Retentionsparameter, Glucose und HbA1c, Triglyzeride, Cholesterol, HDL, LDL, TSH und 25-OH-Vitamin D3.

2.5 Statistik

Für die statistische Analyse wurde die Software IBM SPSS Statistics 27 verwendet. Die Normalverteilung haben wir mit dem Shapiro-Wilks-Test ($p > 0,05$) überprüft und die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Nicht-normalverteilte Werte haben wir mit Median und Spannweite dargestellt. Die Daten in der Querschnittsanalyse wurden bei Normalverteilung durch einen ungepaarten t-Test und bei nicht-normalverteilten Daten durch den Mann-Whitney-U-Test und χ^2 - oder Kruskal-Wallis-Test für kategoriale Zahlen ermittelt. Um den Zeitraum zwischen Registereintritt und Follow-up im Rahmen der Längsschnittstudie zu analysieren habe ich den gepaarten t-Test oder, für kontinuierliche Daten, den Wilcoxon signed-rank-test und für kategoriale Zahlen den McNemar-Test angewandt. Ein P-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Allgemeine Charakterisierung der Patienten-Kohorte

Die klinischen und biochemischen Charakteristika aller CS-Patienten unserer Kohorte unterteilten wir in einer ersten Analyse in Patienten mit aktivem CS ($n=81$) und Patienten in Remission ($n=214$) mit vorhandener GR-Analyse und mindestens einem ausgefüllten Fragebogen. Diese Untersuchung ist in Tabelle 4 dargestellt. Es zeigte sich, dass CS-Patienten in Remission deutlich niedrigere systolische und diastolische Blutdruckwerte aufweisen (systolisch: 135 vs. 124 mmHg, $p<0,000$; diastolisch: 84,6 vs. 80,4 mmHg, $p<0,000$) und häufiger normotensiv sind als Patienten, die sich in der aktiven Krankheitsphase befinden (Hypertension: 71,6 % vs. 46,8 %, $p<0,000$). Auch das Verhältnis von Taille zu Hüfte (Waist-to-hip-ratio: 0,94 vs. 0,89, $p<0,002$) und Taille zu Arm (Waist-to-arm-ratio: 3,41 vs. 3,14, $p<0,002$), der Plasmaglukose- (97 mg/dl vs. 89 mg/dl, $p<0,000$) und HbA1c-Wert (5,9 % vs. 5,0 %, $p<0,001$) sowie die Diagnose eines Diabetes mellitus (34,2 % vs. 18,4 %, $p<0,007$) waren bei Patienten mit CS in Remission

signifikant niedriger als bei Patienten mit aktivem CS (Tabl. 4). Der TSH-Wert nimmt dagegen zu (1,09 vs. 1,63, $p < 0,008$).

Die Hydrocortison-Ersatztherapie kann einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die Lebensqualität bei CS-Patienten in Remission haben, demnach korrelierten wir die Lebensqualität bei dieser Patientengruppe mit der Einnahme von Hydrocortison in Tabelle 5. Wir konnten keinen Unterschied in den ausgewerteten Antworten der Fragebögen SF-36-, CushingQoL- oder Tübinger CD-25 zwischen CS-Patienten in Remission ohne und mit Hydrocortisonsubstitution feststellen.

Patienten mit CS in Remission zeigten ebenfalls einen besseren subjektiven Gesundheitszustand in den Unterkategorien des SF-36-Fragebogens, „physical functioning“ (60 vs. 75, $p = 0,000$) und „social functioning“ (62,5 vs. 75, $p = 0,011$), „role physical“ (25 vs. 75, $p = 0,006$), „bodily pain“ (44,5 vs. 67, $p = 0,005$) und „Vitality“ (36,3 vs. 42,5, $p = 0,004$) im Vergleich zu Patienten mit aktivem CS (Tabelle 4). Auch der CushingQoL zeigte einen signifikant höheren Wert bei Patienten in Remission als bei aktivem CS (44 vs. 54, $p = 0,007$) (Tabelle 4). Der Tübinger CD-25-Gesamtscore unterschied sich nicht signifikant zwischen CS in Remission und Patienten mit aktivem CS (31 vs. 27, $p = 0,627$).

Tabelle 4: Klinische und biochemische Charakteristika von Patienten mit aktivem ($n = 81$) und geheiltem ($n = 214$) endogenem Cushing-Syndrom (CS). Normal verteilte Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Nicht-normalverteilte Werte werden als Median mit Spannweite angegeben. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen Quelle: Feldkamp L. et al. 2023 (64).

	active CS n=81	CS in remission n=214	p-value
Age at examination (years)	59.8 ± 12.9	54.4 ± 13.5	p = 0.002
CS subtype:			
Pituitary (%)	58	69.2	p = 0.071
Adrenal (%)	42	30.8	
Sex (% Female)	71.6	85.5	p = 0.006
BMI (kg/m ²)	27.9 (17.6 – 55.3)	27.0 (17.6 – 60.5)	p = 0.302
Waist-to-arm-ratio	3.41 ± 0.49	3.14 (2.29 – 4.90)	p = 0.002
Waist-to-hip-ratio	0.94 ± 0.11	0.89 ± 0.10	p = 0.002
Systolic BP (mmHg)	135 (90 – 189)	124 (90 – 200)	p = 0.000
Diastolic BP (mmHg)	84.66 (58.67 – 118)	80.4 ± 9.83	p = 0.000
Hypertension (%)	71.6	46.8	p = 0.000
Depression (%)	27.5	36.1	p = 0.196
Anxiety disorder (%)	4.2	6.2	p = 0.525
Diabetes mellitus (%)	34.2	18.4	p = 0.007
Osteoporosis (%)	20.6	25.2	p = 0.146
Potassium (mmol/L)	4.31 ± 0.46	4.36 ± 0.38	p = 0.329
Sodium (mmol/L)	141 ± 2.40	140 ± 2.34	p = 0.050
Creatinine (mg/dL)	0.88 ± 0.22	0.80 (0.49 – 1.48)	p = 0.570
GFR (ml/min/1.73m ²)	76.6 ± 18.8	81.4 ± 21.2	p = 0.088
Calcium (mmol/L)	2.44 ± 0.11	2.41 (1.37 – 2.88)	p = 0.266
Glucose (mg/dL)	97 (66 – 356)	89 (66 – 239)	p = 0.000
HbA1c (%)	5.90 (4.70 – 12.9)	5.50 (4.40 – 8.90)	p = 0.001
Total cholesterol (mg/dL)	210 ± 51.6	211 ± 40.1	p = 0.938
Triglycerides (mg/dL)	126 (33 – 425)	128 (36 – 638)	p = 0.721
HDL (mg/dL)	56.5 (27 – 120)	57 (28 – 114)	p = 0.639
LDL (mg/dL)	117 (41 – 259)	123 ± 35.2	p = 0.816
TSH (µU/mL)	1.09 (0.01 – 19.3)	1.63 (0 – 86.8)	p = 0.008
25-OH-Vit. D3 (ng/mL)	27.1 ± 11.9	28.8 (6.80 – 80)	p = 0.125
PTH (pg/mL)	49.4 (17 – 127)	44.5 (9.40 – 192)	p = 0.257
Insulin (µU/mL)	7.90 (1.90 – 55)	8.25 (0.90 – 40.9)	p = 0.381

Tabelle 5: Klinische Charakteristika und Lebensqualität (QoL) von Patienten in Remission (n=214) nach endogenem Cushing-Syndrom (CS) mit oder ohne Hydrocortison-Hormonersatztherapie. Normalverteilte Werte werden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Nicht-normalverteilte Werte werden als Median mit Spannweite angegeben. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen Quelle: Feldkamp L. et al. 2023 (64).

Cross-sectional study (n=215)	In remission <u>without</u> hydrocortisone (n=109)	n	In remission <u>and</u> on hydrocortisone (n=106)	n	p-value
Age (years) at examination	51.4 \pm 13.9	108	53 \pm 13.3	106	p = 0.759
CS subtype Adrenal/Pituitary (%)	33.3/66.7	108	28.3/71.7	106	p = 0.426
Bilateral adrenalectomy (%)	0	56	36.2	69	p = 0.000
Female sex (%)	88.9	108	82.1	106	p = 0.157
BMI (kg/m ²)	26.6 (19.5 – 41.5)	105	26.8 (18.8 – 46.9)	105	p = 0.493
Hypertension (%)	46.1	89	47.5	99	p = 0.847
Diabetes mellitus (%)	20.2	84	16.8	95	p = 0.559
Osteoporosis (%)	21.2	80	23.1	95	p = 0.012
SF-36 physical functioning	80 (0 – 100)	105	75 (0 – 100)	106	p = 0.931
SF-36 role-physical	75 (0 – 100)	106	50 (0 – 100)	103	p = 0.224
SF-36 bodily pain	67 (0 – 100)	106	67 (0 – 100)	105	p = 0.466
SF-36 general health	53.2 \pm 21.6	104	50.2 \pm 23	104	p = 0.430
SF-36 vitality	46.21 \pm 23.8	104	43.13 \pm 21	106	p = 0.646
SF-36 social functioning	75 (0 – 100)	106	75 (12.5 – 100)	106	p = 0.990
SF-36 role-emotional	100 (0 – 100)	106	100 (0 – 100)	106	p = 0.425
SF-36 mental health	64.7 \pm 19.8	104	68 (20 – 100)	105	p = 0.511
Cushing QoL	52 (16 – 96)	107	54 (19 – 98)	106	p = 0.931
Tübingen CD-25 total score	22 (0 – 64)	104	28 (0 – 79)	101	p = 0.738
Depression (%)	35.9	92	36.4	99	p = 0.943
Anxiety disorder (%)	<1	82	<1	95	p = 0.572

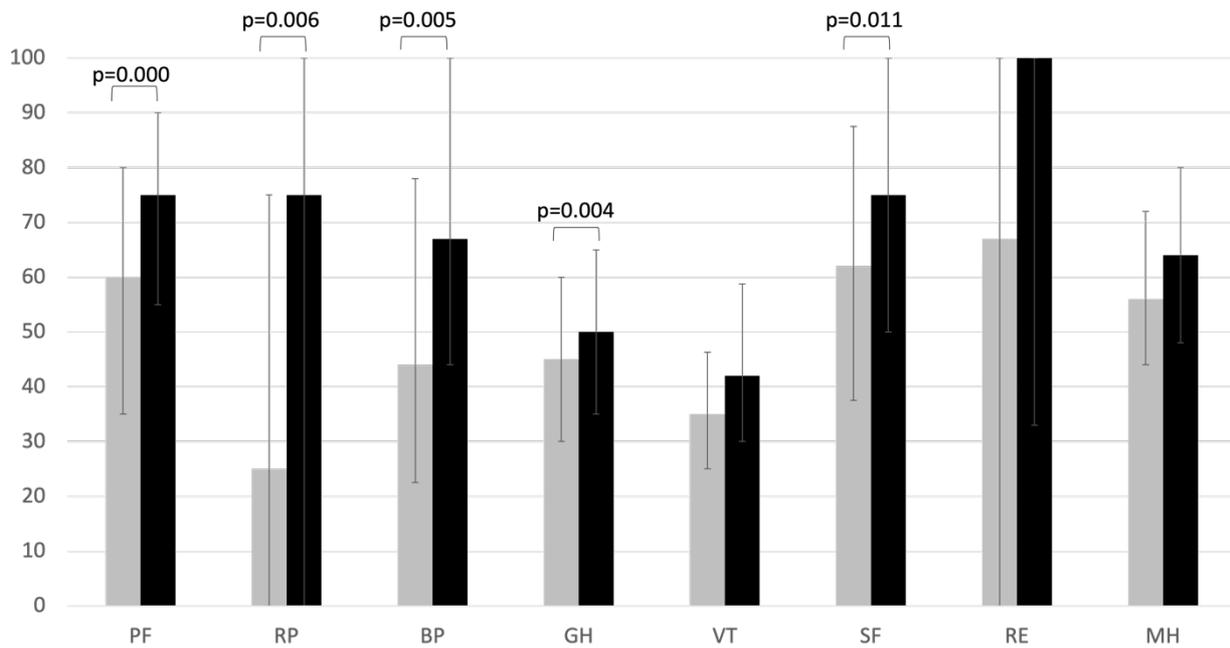


Abbildung 5: Subjektiver Gesundheitszustand nach dem Short Form-36 (SF-36) Fragebogen bei Patienten mit aktivem Cushing-Syndrom (CS) (n=81; graue Skala) und CS in Remission (n=214; schwarze Skala). Abkürzungen: Körperliche Funktionsfähigkeit (PF); Einschränkungen bei den üblichen Aktivitäten aufgrund körperlicher Gesundheitsprobleme (role functioning physical, RP); körperliche Schmerzen (bodily pain, BP); allgemeine Gesundheitswahrnehmung (GH); Vitalität (Energie und Müdigkeit, VT); Einschränkungen bei sozialen Aktivitäten aufgrund körperlicher oder emotionaler Probleme (social functioning, SF); Einschränkungen bei den täglichen Aktivitäten aufgrund emotionaler Probleme (role functioning emotional, RE); allgemeine psychische Gesundheit (psychische Belastung und Wohlbefinden) (mental health, MH). Die Werte der Bereiche reichen von 0-100, wobei höhere Werte einen besseren subjektiven Gesundheitszustand anzeigen Quelle: Feldkamp L. et al. 2023 (64).

3.2 Häufigkeiten der betrachteten Einzelnukleotidpolymorphismen

Die Ergebnisse der genetischen Analyse der menschlichen GR sind in Tabelle 7 dargestellt. Bei Patienten mit aktivem und geheiltem CS wurde ein ähnliches Muster der SNPs (*BclI*, N363S, ER22/23EK und A3669G) festgestellt, was gegen eine Assoziation zwischen dem Vorliegen eines bestimmten SNPs und dem Vorkommen eines CS spricht (*BclI*: $p=0,592$, N363S: $p = 0,756$, ER22/23EK: $p = 0,360$, A3669G: $p = 0,176$).

Tabelle 6: Verteilung der Glucocorticoidrezeptor (GR)-SNPs (Einzelnukleotid-Polymorphismen) bei allen Patienten unserer Kohorte mit endogenem Cushing-Syndrom (CS) Quelle: Feldkamp L. et al. 2023 (64).

GR polymorphism (distribution in %)	patients with CS (n=295)	active CS (n=81)	CS in remission (n=214)	p-value
BclI	n=295	n=81	n=214	p = 0.592
- wildtype	41.9	42.0	42.1	
- heterozygous mutant	49.3	51.8	48.1	
- homozygous mutant	8.8	6.2	9.8	
ER22/23EK	n=295	n=81	n=213	p = 0.360
- wildtype	94.2	92.6	95.3	
- heterozygous mutant	5.4	7.4	4.7	
- homozygous mutant	0	0	0	
N363S	n=293	n=81	n=211	p = 0.756
- wildtype	92.5	91.3	92.9	
- heterozygous mutant	6.8	7.4	6.6	
- homozygous mutant	0.7	1.2	0.5	
A3669G	n=293	n=81	n=211	p =0.176
- wildtype	72.0	76.5	70.1	
- heterozygous mutant	24.9	18.5	27.5	
- homozygous mutant	3.0	4.9	2.4	

3.3 Ergebnisse der Querschnittsanalyse unter Berücksichtigung der SNPs

In der Querschnittsanalyse konnten von uns bei Patienten mit aktivem oder in Remission befindlichem CS keine Unterschiede in der Lebensqualität zwischen hetero- oder homozygot mutiertem Allel und Wildtyp-Trägern für alle getesteten GR-Polymorphismen festgestellt werden. In Tabelle 7 sind die drei Fragebögen zur Lebensqualität bei Patienten mit aktivem CS und Vorhandensein des BclI Polymorphismus dargestellt.

Tabelle 7: Fragebögen zur Lebensqualität bei Patienten mit aktivem CS (n=81) und BclI-Polymorphismus; minor allele = heterozygote und homozygote Mutationsallele wurden aufgrund ihrer geringen Prävalenz als "minor allele carrier" zusammengefasst. Eigene Darstellung: Lara Feldkamp

Quality of Life assessment	Bcl-I wildtype (n=34)	n	Bcl-I minor allele (n=47)	n	p-value
SF-36 physical functioning	60 (0 – 100)	32	60 (0 – 100)	45	p = 0.840
SF-36 role-physical	25 (0 – 100)	33	37.5 (0 – 100)	44	p = 0.551
SF-36 bodily pain	55 (0 – 100)	33	44 (0 – 100)	45	p = 0.242
SF-36 general health	45.63 ± 23.13	32	45.20 ± 20.42	45	p = 0.932
SF-36 vitality	35.76 ± 20.24	33	36.74 ± 18.22	43	p = 0.824
SF-36 social functioning	63 (0 – 100)	33	62.25 (0 – 100)	44	p = 0.930
SF-36 role-emotional	50.16 (0 – 100)	32	67 (0 – 100)	43	p = 0.766
SF-36 mental health	64 (8 – 92)	33	58.18 ± 20.09	44	p = 0.984
Cushing QoL	47.34 ± 20.35	32	48.04 ± 21.17	45	p = 0.885
Tübingen CD-25 total score	31.06 ± 17.61	31	28.55 ± 17.94	40	p = 0.557

Tabelle 8: Fragebögen zur Lebensqualität bei Patienten mit aktivem CS (n=81) und ER22/23EK-Polymorphismus; minor allele = heterozygote und homozygote Mutationsallele wurden aufgrund ihrer geringen Prävalenz als "minor allele carrier" zusammengefasst. Eigene Darstellung: Lara Feldkamp

Quality of Life assessment	ER22/23EK wildtype (n=75)	n	ER22/23EK minor allele (n=6)	n	
SF-36 physical functioning	60 (10 – 100)	71	62.50 ± 23.82	6	p = 0.607
SF-36 role-physical	25 (0 – 100)	71	37.50 ± 34.46	6	p = 0.711
SF-36 bodily pain	44.50 (0 – 100)	72	52.25 ± 26.53	6	p = 0.985
SF-36 general health	45.20 ± 22.04	71	47.50 ± 13.32	6	p = 0.802
SF-36 vitality	36.21 ± 19.42	70	37.50 ± 14.41	6	p = 0.875
SF-36 social functioning	62.50 (0 – 100)	71	60.50 ± 19.79	6	p = 1
SF-36 role-emotional	67 (0 – 100)	69	38.89 ± 39.03	6	p = 0.277
SF-36 mental health	57.58 ± 21.67	71	54.67 ± 17.28	6	p = 0.750
Cushing QoL	47.46 ± 21.27	71	51.17 ± 12.91	6	p = 0.677
Tübingen CD-25 total score	29.95 ± 18.4	65	26.33 ± 6.86	6	p = 0.334

Tabelle 9: Fragebögen zur Lebensqualität bei Patienten mit aktivem CS (n=81) und N363S-Polymorphismus; minor allele = heterozygote und homozygote Mutationsallele wurden aufgrund ihrer geringen Prävalenz als "minor allele carrier" zusammengefasst. Eigene Darstellung: Lara Feldkamp

Quality of Life assessment	N363S wildtype (n=74)	n	N363S minor allele (n=7)	n	
SF-36 physical functioning	60 (0 – 100)	71	61.67 ± 32.35	6	p = 0.594
SF-36 role-physical	25 (0 – 100)	71	75 (0 – 100)	6	p = 0.435
SF-36 bodily pain	45 (0 – 100)	72	44 (0 – 100)	6	p = 0.503
SF-36 general health	45.41 ± 22	71	45.00 ± 14.49	6	p = 0.965
SF-36 vitality	35.93 ± 19.10	70	40.83 ± 19.10	6	p = 0.547
SF-36 social functioning	62.50 (0 – 100)	71	54.17 ± 28.14	6	p = 0.626
SF-36 role-emotional	67 (0 – 100)	69	55.67 ± 45.57	6	p = 0.870
SF-36 mental health	57.75 ± 21.14	71	52.67 ± 24.45	6	p = 0.578
Cushing QoL	47.80 ± 20.26	71	47.17 ± 27.73	6	p = 0.943
Tübingen CD-25 total score	30.20 ± 17.22	65	23.67 ± 23.49	6	p = 0.391

Tabelle 10: Fragebögen zur Lebensqualität bei Patienten mit aktivem CS (n=81) und A3669G-Polymorphismus; minor allele = heterozygote und homozygote Mutationsallele wurden aufgrund ihrer geringen Prävalenz als "minor allele carrier" zusammengefasst. Eigene Darstellung: Lara Feldkamp

Quality of Life assessment	A3669G wildtype (n=62)	n	A3669G minor allele (n=19)	n	
SF-36 physical functioning	60 (0 – 100)	59	57.78 ± 28.14	18	p = 0.722
SF-36 role-physical	50 (0 – 100)	58	25 (0 – 100)	19	p = 0.232
SF-36 bodily pain	44 (0 – 100)	59	56 (0 – 100)	19	p = 0.479
SF-36 general health	44.81 ± 22.14	59	47.22 ± 19.42	18	p = 0.679
SF-36 vitality	37.19 ± 20.02	57	33.68 ± 15.71	19	p = 0.489
SF-36 social functioning	62.5 (0 – 100)	58	56.68 ± 22.55	19	p = 0.564
SF-36 role-emotional	67 (0 – 100)	56	33 (0 – 100)	19	p = 0.074
SF-36 mental health	58.28 ± 21.48	58	54.53 ± 20.96	19	p = 0.509
Cushing QoL	48.02 ± 21.82	59	46.89 ± 17.04	18	p = 0.841
Tübingen CD-25 total score	29.75 ± 18.82	55	29.31 ± 13.8	16	p = 0.932

3.4 Ergebnisse der longitudinalen Analyse unter Berücksichtigung der SNPs

In der Längsschnittanalyse von Patienten, die mit Registereintritt ein aktives CS hatten und bei der Nachuntersuchung in Remission waren, zeigten Träger des Bc/I-Minor-Allel im Vergleich zu Wildtyp-Trägern eine signifikante Besserung in den beiden Unterkategorien des SF-36-Fragebogens „vitality“ (35,86 vs. 45,33, p=0,038) und „mental health“ (psychische Gesundheit) (53,24 vs. 63,60, p=0,013) im Laufe der Zeit (Tabelle 11, Abbildung 6). Die Unterkategorie „physical functioning“ verbesserte sich jedoch bei den Wildtyp-Trägern vom Ausgangswert bis zur Nachuntersuchung (58,5 vs. 75 p=0,032), während dies bei den Trägern des Bc/I-Minor-Allels nicht zu beobachten war (Tabelle 9).

Träger des Bc/I-Minor-Allels wiesen zu Registereintritt im Vergleich zu Wildtyp-Trägern tendenziell schlechtere Werte in den Fragebögen zur Lebensqualität auf. Dies wurde in den meisten Unterkategorien des SF-36-Fragebogens, das heißt physical functioning, general health, vitality, social functioning, emotional role, mental health sowie im CushingQoL (Wildtyp: 48 vs. 61,35, p=0,008; Minor-Allel: 43,03 vs. 59,24, p=0,002) und dem Tübinger CD-25-Fragebogen (Wildtyp: 37,43 vs. 20, p=0,048; Minor-Allel: 43,22 vs. 28,63, p=0,001) beobachtet.

Tabelle 11: Lebensqualität von Patienten mit aktivem CS bei Registereintritt und in Remission bei der Nachuntersuchung und gleichzeitig Träger des BclI-Polymorphismus (n=47) ermittelt durch die Fragebögen SF-36, Cushing QoL und Tübingen CD-25. Eigene Darstellung: Lara Feldkamp

Quality of Life assessment	Bcl-Wildtyp		p-value	Bcl-minor Allele		p-value	p-value Baseline WT und Baseline Minor Allele	p-value Follow-Up WT und Follow-Up minor Allele
	Baseline	Follow-Up		Baseline	Follow-Up			
	n=17	n=17		n=30	n=30			
SF-36 physical functioning	58.53 ± 27.43	75 (30 – 100)	p=0.032	70 (10 – 100)	67.50 (20 – 100)	p=0.262	p=0.756	p=0.609
SF-36 role-physical	50 (0 – 100)	50 (0 – 100)	p=1	25 (0 – 100)	37.50 (0 – 100)	p=0.173	p=0.220	p=0.926
SF-36 bodily pain	60.76 ± 29.26	57.59 ± 29.03	p=0.647	62.50 (0 – 100)	56 (0 – 100)	p=0.474	p=0.867	p=0.824
SF-36 general health	45 ± 21.37	57.50 (20 – 80)	p=0.146	41.67 ± 21.19	48.17 ± 24.05	p=0.186	p=0.615	p=0.594
SF-36 vitality	40 ± 19.2	40.59 ± 17.22	p=0.907	35.86 ± 20.53	45.33 ± 21.33	p=0.038	p=0.503	p=0.438
SF-36 social functioning	63 (0 – 100)	67 ± 36.99	p=0.624	53.07 ± 27.36	63 (0 – 100)	p=0.052	p=0.190	p=0.805
SF-36 role-emotional	67 (0 – 100)	67 (0 – 100)	p=0.719	33 (0 – 100)	67 (0 – 100)	p=0.464	p=0.582	p=0.630
SF-36 mental health	62.75 ± 19.96	64 (20 – 88)	p=0.641	53.24 ± 17.86	63.60 ± 21.79	p=0.013	p=0.108	p=0.681
Cushing QoL	48 ± 21.75	61.35 ± 19.73	p=0.008	43.03 ± 15.85	59.24 ± 21.85	p=0.002	p=0.417	p=0.745
Tübingen CD-25 total score	37.43 ± 21.69	20 (0 – 68)	p=0.048	43.22 ± 18.03	28.63 ± 19.29	p=0.001	p=0.368	p=0.790

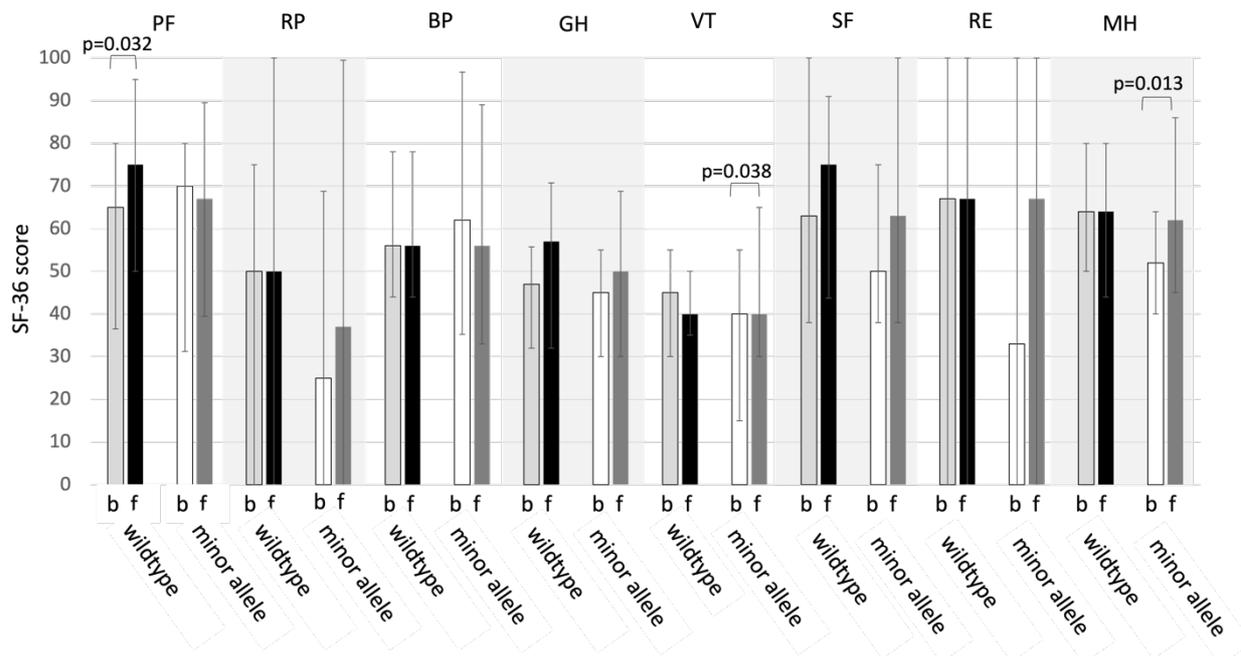


Abbildung 6: Subjektiver Gesundheitszustand gemäß SF-36 bei Patienten mit Cushing-Syndrom (CS) mit *BclI*-Wildtyp (n=17) oder *BclI*-Minor-Allel (n=30) zu Registereintritt (b=aktives CS; graue und weiße Säulen) und bei der Nachuntersuchung (f=CS in Remission; schwarze und dunkelgraue Säulen).

Abkürzungen: Körperliche Funktionsfähigkeit (PF); Einschränkungen bei den üblichen Aktivitäten aufgrund körperlicher Gesundheitsprobleme (role functioning physical, RP); körperliche Schmerzen (bodily pain, BP); allgemeine Gesundheitswahrnehmung (GH); Vitalität (Energie und Müdigkeit, VT); Einschränkungen bei sozialen Aktivitäten aufgrund körperlicher oder emotionaler Probleme (social functioning, SF); Einschränkungen bei den üblichen Aktivitäten aufgrund emotionaler Probleme (role functioning emotional, RE); allgemeine psychische Gesundheit (psychische Belastung und Wohlbefinden) (mental health, MH).

Die Werte der Bereiche reichen von 0-100, wobei höhere Werte einen besseren subjektiven Gesundheitszustand anzeigen. Quelle: Feldkamp L. et al. 2023 (64).

Vom Registereintritt bis zum Follow-up wurde außerdem eine signifikante Verbesserung des Gesamtcholesterins ($203 \pm 42,4$ mg/dL vs. $188 \pm 38,1$ mg/dL; $p=0,022$) und des LDL-Cholesterins ($120,2 \pm 36,4$ mg/dL vs. $111 \pm 33,8$ mg/dL; $p= 0,041$) bei den Trägern des BclI-Minor-Allels beobachtet.

Weder in der Querschnitts- noch in der Längsschnittanalyse konnten Unterschiede in der Lebensqualität bei Trägern der anderen drei Polymorphismen (N363S, ER22/23EK und A3669G) und den Wildtyp-Trägern festgestellt werden.

Auch nach der Gruppeneinteilung zeigen Patienten aus der Gruppe mit hoher GR-Sensitivität (Gruppe 1 mit Minor-Allel für N363S und BclI) eine signifikante Verbesserung in den SF-36-Unterkategorien „vitality“ (35 vs. 40, $p=0,017$) und „mental health“ (psychische Gesundheit) (54 vs. 62, $p=0,039$) zwischen dem Wert bei Registereintritt unter floridem CS bis zum Follow-up in Remission (Abbildung 7). Darüber hinaus wurden in der Gruppe mit hoher GR-Sensitivität signifikante Verbesserungen von HbA1c (5,85% vs. 5,3%, $p=0,002$), Glukose (93mg/dL vs. 85mg/dL, $p=0,049$), Insulin ($12,3\mu\text{U/mL}$ vs. $6,35\mu\text{U/mL}$, $p=0,031$) und HOMA-IR (3 vs. 1,2, $p=0,069$) vom Registereintritt bis zum Follow-up festgestellt (Tabelle 12).

Des Weiteren fanden wir bei den Patienten mit den empfindlicheren GR-Polymorphismen bei Registereintritt schlechtere CushingQoL-Werte, die sich jedoch bei der Nachuntersuchung deutlich verbesserten (41 vs. 50, $p=0,004$). In Bezug auf den Tübinger CD-25-Fragebogen konnten wir keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten mit hoher und niedriger GR-Sensitivität feststellen.

Tabelle 12: Laborwerte von Patienten mit aktivem CS bei Registereintritt und in Remission beim Follow-Up (n=30). Eingeteilt in zwei Gruppen: Erhöhte GR Sensitivität (Gruppe1: N363S, Bcl-I) und erniedrigte GR Sensitivität (Gruppen 2: ER22/23EK, A3669G). Der vorletzte p-Wert korreliert Gruppe 1 und Gruppe 2 zu Registereintritt, der letzte p-Wert korreliert Gruppe 1 und 2 in Remission. Eigene Darstellung: Lara Feldkamp

	Gruppe 1		Gruppe 2		p-Wert	Gruppe 1 vs Gruppe 2	
	Registereintritt	Remission	Registereintritt	Remission		Registereintritt	Remission
Potassium (mmol/L)	n=22 4.1 (2.6 – 4.8)	n=22 4.15 (0.9 – 4.7)	n=8 4.13 ± 0.4	n=8 4.28 ± 0.35	p=0.369	p=0.850	p=0.495
Sodium (mmol/L)	n=22 141.77 ± 2.74	n=22 140.68 ± 1.84	n=8 141.13 ± 2.59	n=8 140.50 (140 – 143)	p=0.039	p=0.566	p=0.700
Creatinine (mg/dL)	n=21 0.8 (0.5 – 2.2)	n=22 0.8 (0.6 – 1.6)	n=8 0.79 ± 0.12	n=8 0.71 ± 0.11	p=0.460	p=0.861	p=0.088
GFR (ml/min/1.73m²)	n=20 60 (30.9 – 120)	n=22 85.5 (38 – 123)	n=8 60 (59.7 – 114)	n=8 100.5 (60 – 116)	p=0.035	p=0.804	p=0.177
Calcium (mmol/L)	n=21 2.5 ± 0.1	n=19 2.48 ± 0.11	n=8 2.46 ± 0.16	n=8 2.45 ± 0.15	p=0.583	p=0.442	p=0.452
Glucose (mg/dL)	n=20 93 (81 – 220)	n=22 85 (66 – 186)	n=8 109 (79 – 251)	n=8 98 (78 – 173)	p=0.049	p=0.251	p=0.312
HbA1c (%)	n=22 5.85 (4.7 – 9)	n=21 5.3 (4.9 – 6.9)	n=8 6.99 (5.7 – 10.4)	n=8 5.93 ± 0.65	p=0.002	p=0.037	p=0.066
Total cholesterol (mg/dL)	n=22 193.27 ± 38.2	n=21 181.33 ± 38.57	n=8 221.13 ± 72.33	n=8 216.38 ± 53.21	p=0.119	p=0.180	p=0.059
Triglycerides (mg/dL)	n=22 96 (50 – 360)	n=21 103 (52 – 573)	n=8 228 ± 158.91	n=8 155.25 ± 72.61	p=0.532	p=0.033	p=0.150
HDL (mg/dL)	n=22 63.50 (35 – 135)	n=20 56.67 ± 19.19	n=8 54.50 ± 9.91	n=8 52.50 ± 7.73	p=0.087	p=0.270	p=0.412
LDL (mg/dL)	n=22 111.68 ± 33.47	n=22 106.90 ± 34.3	n=8 135.75 ± 71.29	n=8 142.13 ± 48.96	p=0.258	p=0.385	p=0.039
TSH (µU/mL)	n=21 1.17 ± 0.6	n=22 1.87 ± 1.27	n=8 1.27 ± 0.68	n=8 1.84 ± 1.26	p=0.014	p=0.717	p=0.965
25-OH-Vit. D3 (ng/mL)	n=21 25.81 ± 11.91	n=22 27.06 ± 10.5	n=8 20.23 ± 4.66	n=8 26.83 ± 13.82	p=0.542	p=0.212	p=0.960
PTH (pg/mL)	n=21 48.9 (32.2 – 120)	n=20 50.43 ± 18.09	n=8 74.06 ± 23.59	n=8 59.13 ± 20.53	p=0.054	p=0.057	p=0.270
Insulin (µU/mL)	n=18 12.3 (2 – 43)	n=19 6.35 (0.9 – 43.9)	n=7 13.8 (4 – 44.5)	n=8 6.3 (2.3 – 40.9)	p=0.031	p=0.719	p=0.919
HOMA-IR	n=18 3 (0.6 – 18.1)	n=19 1.2 (0.2 – 5.2)	n=7 5.01 ± 3.48	n=8 1.5 (0.5 – 10.5)	p=0.069	p=0.348	p=0.457

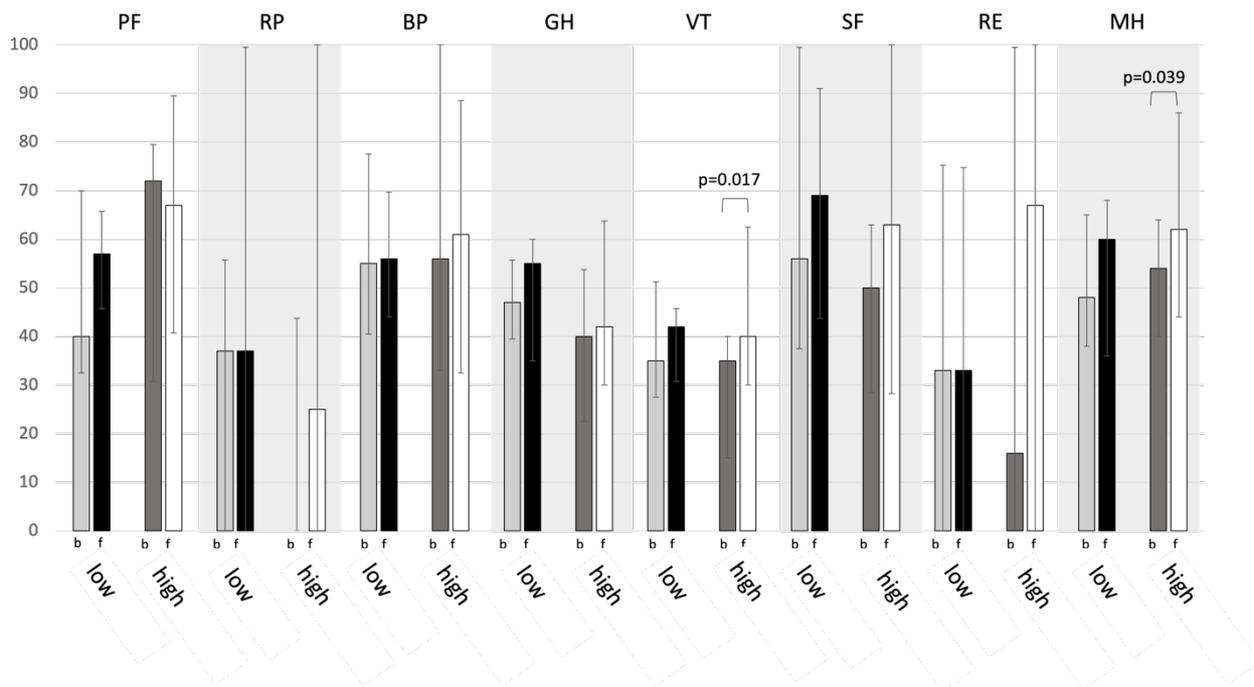


Abbildung 7: Subjektiver Gesundheitszustand gemäß SF-36 bei Patienten mit Cushing-Syndrom (CS), die zu Registereintritt ein aktives CS hatten (b=aktives CS; graue und weiße Säulen) und bei der Nachuntersuchung in Remission waren (f=CS in Remission; schwarze und dunkelgraue Säulen). Die Patienten wurden in zwei Gruppen eingeteilt: höhere GR-Empfindlichkeit (Gruppe "high": Minor-Allel für N363S und BcI; n=22) und niedrigere GR-Empfindlichkeit (Gruppe "low": Minor-Allel für ER22/23EK und A3669G; n=8). Abkürzungen: Körperliche Funktionsfähigkeit (PF); Einschränkungen bei den üblichen Aktivitäten aufgrund körperlicher Gesundheitsprobleme (role functioning physical, RP); körperliche Schmerzen (bodily pain, BP); allgemeine Gesundheitswahrnehmung (GH); Vitalität (Energie und Müdigkeit, VT); Einschränkungen bei sozialen Aktivitäten aufgrund körperlicher oder emotionaler Probleme (social functioning, SF); Einschränkungen bei den üblichen Aktivitäten aufgrund emotionaler Probleme (role functioning emotional, RE); allgemeine psychische Gesundheit (psychische Belastung und Wohlbefinden) (mental health, MH).

Die Werte der Bereiche reichen von 0-100, wobei höhere Werte einen besseren subjektiven Gesundheitszustand anzeigen. Quelle: Feldkamp L. et al. 2023 (64).

4. DISKUSSION

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Studie berichten wir über eine große Kohorte von 331 CS-Patienten aus dem Deutschen Cushing-Register, die in eine Querschnittsstudie (n=295) und ein Teil der Kohorte in eine Längsschnittstudie (n=120) aufgenommen wurden, um unter anderem den Einfluss genetischer Faktoren auf die Erholung der Lebensqualität zu untersuchen.

Wir haben den potenziellen Einfluss der GR-SNPs Bc/I, N363S, ER22/23EK und A3669G auf die Lebensqualität von Patienten mit endogenem Hyperkortisolismus bei Registereintritt und nach etwa 1,5 Jahren bei Follow-up untersucht. Die Häufigkeit aller SNPs war bei Patienten mit aktivem und geheiltem CS gleich verteilt, und es gab in unserer Studie keinen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit des CS und dem Auftreten eines bestimmten Polymorphismus. In anderen Studien wurden ebenfalls keine Unterschiede in der Häufigkeit der GR-Polymorphismen zwischen CS-Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe festgestellt (45, 53).

Wir konnten zeigen, dass Patienten mit endogenem CS und dem Bc/I-Minor-Allel eine initial schlechtere Lebensqualität aufweisen, sich dann aber besser von einer beeinträchtigten Lebensqualität erholen, als Träger des Wildtyps. In unserer longitudinalen Betrachtung zeigten Träger des mutierten Bc/I-Allels eine signifikante Verbesserung in den SF-36-Unterkategorien Vitalität und psychische Gesundheit im Vergleich zum Wildtyp. Außerdem konnte bei den Trägern des Bc/I-Minor-Allels vom Registereintritt bis zum Follow-up eine signifikante Verbesserung des Gesamtcholesterins und des LDL-Cholesterins beobachtet werden.

In der Gruppe mit hoher GR-Sensitivität zeigten sich signifikante Verbesserungen von HbA1c, Glukose, Insulin und HOMA-IR zwischen Registereintritt und Follow-up.

Weitere Unterschiede in der Lebensqualität zwischen Trägern der anderen drei Polymorphismen (N363S, ER22/23EK und A3669G) und den Wildtyp-Trägern konnten von uns nicht festgestellt werden.

4.2 Interpretation der Ergebnisse und Einbettung in den bisherigen Forschungsstand

Unsere Ergebnisse sind die ersten, die zeigen, dass Patienten mit endogenem CS und die gleichzeitig Träger des Bc/I-Minor-Allels sind, welches eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Glucocorticoiden charakterisiert (34), eine bessere Erholung von einer beeinträchtigten Lebensqualität aufweisen als Träger mit dem Bc/I-Wildtyp (64). Es wurden bereits verschiedene Hypothesen und Erklärungsmodelle für eine schlechte Genesung nach leitliniengerechter Behandlung des CS hervorgebracht (21, 66, 67). Einige Studien haben nach der Ätiologie der CS differenziert, aber keinen signifikanten Unterschied in den Remissionsraten festgestellt (55, 68). Außerdem haben zahlreiche Studien an Menschen und Tieren gezeigt, dass ein langanhaltender Hyperkortisolismus aufgrund funktioneller und struktureller Veränderungen in bestimmten Zielbereichen des Gehirns langfristige negative Auswirkungen auf Verhalten und Kognition haben kann (54, 69-72).

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, konnten die SNPs Bc/I- und ER22/23EK mit der Anfälligkeit für die Entwicklung einer schweren depressiven Episode assoziiert werden (40). Für den N363S-Polymorphismus wurden bei depressiven Patienten höhere, aber statistisch nicht signifikante, Häufigkeiten festgestellt, während der ER22/23EK-Polymorphismus mit einem schnelleren klinischen Ansprechen auf eine antidepressive Behandlung in Zusammenhang gebracht wird. In unserer Kohorte von Patienten mit endogenem CS konnten wir keine signifikante Verbesserung der Lebensqualität für den ER22/23EK-Polymorphismus feststellen. Dies könnte auf die kleine Studienpopulation zurückzuführen sein.

Kürzlich wurde beschrieben, dass Träger des mutierten Allels A6639G bei Patienten mit aktivem CS eine bessere Muskelkraft aufweisen, was auf eine schützende Wirkung der Mutation auf GR-induzierte Signalwege hindeutet (53). Eine geringere Muskelkraft wird auch mit einer schlechteren Lebensqualität und Morbidität in Verbindung gebracht (73), was möglicherweise erklären könnte, warum Patienten mit dem Minor-Allel A6639G eine bessere Lebensqualität haben. Eine andere Studie zeigt, dass das Vorhandensein des GR-Polymorphismus A3669G bei Patienten mit CS im Vergleich zu Wildtyp-Trägern mit einer geringeren Prävalenz von Typ-2-Diabetes verbunden ist (50). Demnach hat der

Polymorphismus A3669G offensichtlich ebenfalls eine schützende Wirkung, indem er die Auswirkungen eines Hypercortisolismus auf den Glukosestoffwechsel abschwächt und das Risiko für Diabetes mellitus verringert (50). In unserer Studie konnten wir bei Patienten mit CS in Remission und gleichzeitigen Trägern des A6639G Minor-Allels eine geringere Hypertonie-Rate und die Tendenz zu einer geringeren Diabetes-Mellitus-Prävalenz feststellen.

Im Gegensatz zu anderen Studien (34) konnten wir keine Korrelation zwischen Trägern des N363S-Minor-Allels und einem erhöhten BMI feststellen, aber ein signifikant niedrigeres Vorkommen von Hypertonie bei CS-Patienten in Remission.

In der Literatur finden sich bei Patienten mit CS, die Träger des *BclI*-Polymorphismus sind, eine verminderte Knochenmineraldichte (45) und eine Reihe negativer metabolischer und vaskulärer Auswirkungen, darunter ein höherer Fettanteil an den Extremitäten, höhere Leptin- und E-Selektin-Serumspiegel und eine höhere Intima-Media-Dicke (74). In Bezug auf die kognitiven Fähigkeiten fanden Ragnarsson et al. heraus, dass *BclI* mit vermehrter Fatigue und einer schlechteren Leistung in einem von sieben kognitiven Tests bei CS-Patienten nach einem Median von 13 Jahren nach Remissionseintritt assoziiert werden kann (44). Die Ergebnisse der Studie deuten darauf hin, dass Hyperkortisolismus bei Patienten mit CS, die Träger des *BclI*-Polymorphismus sind, eine ausgeprägtere und irreversible Wirkung auf das zentrale Nervensystem haben könnte als bei Nicht-Trägern (44). Allerdings handelte es sich bei der Studie um eine Querschnittsstudie, und es standen keine Daten zum Zeitpunkt der Diagnose zur Verfügung.

Die Ergebnisse unserer CS-Kohorte zeigen, dass Träger des *BclI*-Minor-Allels bei Studienbeginn eine tendenziell schlechtere Lebensqualität aufweisen als Wildtyp-Träger. Außerdem verbesserte sich die beeinträchtigte Lebensqualität bei CS-Patienten mit dem *BclI*-Minor-Allel deutlicher als bei Wildtyp-Trägern, was im Gegensatz zu den Ergebnissen der Studie von Ragnarsson et al. zu stehen scheint (44). Allerdings wurden in der letztgenannten Studie die Remissionsdaten nicht mit den Ausgangsdaten verglichen. In unserer Studie verbesserte sich die SF-36-Unterkategorie körperliche Funktionsfähigkeit bei den *BclI*-Wildtyp-Trägern signifikant vom Ausgangswert bis zur Nachuntersuchung, nicht aber bei den Trägern des Minor-Allels. Dieses Ergebnis

bestätigt die Studie von Ragnarsson et al. (44), die bei Bc/II-Trägern im Vergleich zu Wildtyp-Trägern nach langfristiger Remission Fatigue und eine schlechtere kognitive Funktion nachwies. Dies deutet darauf hin, dass es im Laufe der Zeit zu einer Erholung und weiteren Verbesserung kommen kann, aber auch zu einer Verschlechterung von Aspekten der Lebensqualität, wenn z. B. Bewältigungsstrategien versagen oder unzureichend sind. Die Komplexität der Thematik wird hier unterstrichen und deutet auf eine vielfältige Regulierung körperlicher und emotionaler Bereiche durch verschiedene Faktoren, einschließlich SNPs, hin. Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2022 über die Auswirkung des endogenen CS auf die allgemeine und ursachenspezifische Sterblichkeit zeigt, dass 2,2 % aller Todesfälle von Patienten mit CS auf Selbstmord zurückzuführen sind (75). Noch einmal ist zu betonen, dass neuropsychiatrische Manifestationen des CS häufig sind (21) und es umso wichtiger ist, diese vorzubeugen und sie frühzeitig zu erkennen.

4.3 Stärken und Schwächen der Studie

Eine Stärke unserer Studie ist die Größe der Kohorte, da das CS zu den seltenen Erkrankungen zählt.

Unsere Studie hat mehrere Schwächen, die bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen ist. Obwohl unsere Kohorte für eine seltene Krankheit wie das endogene CS groß ist, hätte eine noch größere Studienpopulation wahrscheinlich die Zahl der Träger des Minor-Allels und damit möglicherweise auch die Wahrscheinlichkeit signifikanter Ergebnisse erhöht.

Weiterhin haben nicht alle Patienten jeden Fragebogen ausgefüllt, was zu Datenverlusten und zum Ausschluss von Patienten aus der Lebensqualitäts-Analyse führte.

Für den CushingQoL standen uns aus Registergründen nur der Gesamtscore und nicht die einzelnen Unterkategorien zur Verfügung.

Darüber hinaus liegen in unserer Kohorte keine Daten zu wichtigen Störfaktoren wie sozioökonomischem- und Bildungsstatus vor, die jedoch relevante Auswirkungen auf die Lebensqualität und psychische Beeinträchtigungen haben können. Auch andere Faktoren wie die Dauer des Hyperkortisolismus vor der Diagnose und der Therapie, die Art der Operation und nachfolgende Komplikationen, Strahlentherapie oder Radiochirurgie, wiederholte therapeutische Eingriffe, Rezidive und Zeit bis zum Rezidiv

können einen Einfluss auf die Lebensqualität haben, waren aber für unsere Analyse nicht verfügbar.

Darüber hinaus stand uns keine gesunde Kontrollgruppe zur Verfügung, mit der wir unsere Patienten vergleichen konnten. Abschließend ist das betrachtete Zeitintervall zwischen Registereintritt und Follow-up möglicherweise zu kurz, um den potenziellen Einfluss der SNPs auf die Lebensqualität zuverlässig zu bewerten.

4.4 Schlussfolgerung, Implikationen für die Praxis und zukünftige Forschung

Bereits einleitend haben wir den hohen Anteil psychischer Krankheiten und die starke Beeinträchtigung der Lebensqualität in Patienten mit CS beschrieben und in vielen Fällen deren Andauern weit über die Remission hinaus. Bislang ist immer noch unklar, warum einige, aber nicht alle Patienten mit CS eine Depression oder Beeinträchtigung der Lebensqualität entwickeln und warum die Dauer dieser Beeinträchtigungen trotz biochemischer Heilung sehr verschieden ist. GR- und Mineralokortikoidrezeptor-Polymorphismen wurden als Determinanten von Anfälligkeit und Widerstandsfähigkeit beschrieben (74). Während einige Genvarianten das Risiko für stressbedingte Erkrankungen wie Depressionen erhöhen, sind wieder andere Teil der genetischen Ausstattung für den individuellen Bewältigungsstil und beeinflussen die Anfälligkeit für Krankheiten. Um diese Hypothese weiter zu erforschen, haben wir den Einfluss von GR-Polymorphismen auf die Lebensqualität in unserer großen Kohorte von Patienten mit endogenem CS untersucht. Die schlechteren Ausgangswerte der Lebensqualität bei Patienten mit aktivem CS und empfindlicheren GR-Polymorphismen konnten wir in der Gruppenbildung bestätigen, genau wie die darauffolgende deutliche Verbesserung der Werte bis zur Nachuntersuchung (Remission) und die signifikante Verbesserung in den SF-36-Unterkategorien Vitalität und psychische Gesundheit vom Ausgangswert bis zur Folgeuntersuchung. Dies zeigt, dass GR-Polymorphismen Teil der genetischen Veranlagung sind, die die individuelle Stressempfindlichkeit und den Bewältigungsstil bestimmen und die Anfälligkeit für Krankheiten mitbeeinflussen (31).

Unsere Ergebnisse können die erheblichen interindividuellen Unterschiede bei Patienten mit CS in Bezug auf die Entwicklung einer psychischen Erkrankung und einer geringen Lebensqualität zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und während der Folgeuntersuchungen

teilweise erklären. Ein Screening auf solche genetischen Veränderungen (SNPs) könnte daher für die frühzeitige Behandlung psychiatrischer Erkrankungen und das Erlernen und die Stärkung von Bewältigungsstrategien nützlich sein. Träger des BclI-Minor-Allels mit erhöhter Empfindlichkeit gegenüber Glucocorticoiden erholen sich besser von der Beeinträchtigung der Lebensqualität als Wildtyp-Träger, was eventuell auch auf eine ausgeprägtere klinische Beeinträchtigung durch die Länge des Zeitraums des bestehenden Hyperkortisolismus bis zur erfolgreichen Behandlung zurückzuführen sein könnte. Dies wird in zukünftigen Forschungsprojekten weiter zu untersuchen sein.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Newell-Price J, Jorgensen JO, Grossman A. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Horm Res.* 1999;51 Suppl 3:81-94.
2. Jeffcoate WJ, Silverstone JT, Edwards CR, Besser GM. Psychiatric manifestations of Cushing's syndrome: response to lowering of plasma cortisol. *Q J Med.* 1979;48(191):465-72.
3. Hopkins RL, Leinung MC. Exogenous Cushing's syndrome and glucocorticoid withdrawal. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2005;34(2):371-84, ix.
4. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet.* 2006;367(9522):1605-17.
5. Ilias I, Torpy DJ, Pacak K, Mullen N, Wesley RA, Nieman LK. Cushing's syndrome due to ectopic corticotropin secretion: twenty years' experience at the National Institutes of Health. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(8):4955-62.
6. Boscaro M, Arnaldi G. Approach to the patient with possible Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(9):3121-31.
7. Raff H, Carroll T. Cushing's syndrome: from physiological principles to diagnosis and clinical care. *J Physiol.* 2015;593(3):493-506.
8. Boscaro M, Barzon L, Fallo F, Sonino N. Cushing's syndrome. *Lancet.* 2001;357(9258):783-91.
9. Balomenaki M, Margaritopoulos D, Vassiliadi DA, Tsagarakis S. Diagnostic workup of Cushing's syndrome. *J Neuroendocrinol.* 2022;34(8):e13111.
10. 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.
11. Nieman LK. Recent Updates on the Diagnosis and Management of Cushing's Syndrome. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2018;33(2):139-46.
12. Galm BP, Qiao N, Klibanski A, Biller BMK, Tritos NA. Accuracy of Laboratory Tests for the Diagnosis of Cushing Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(6).
13. Kannankeril J, Carroll T, Findling JW, Javorsky B, Gunsolus IL, Phillips J, Raff H. Prospective Evaluation of Late-Night Salivary Cortisol and Cortisone by EIA and LC-MS/MS in Suspected Cushing Syndrome. *J Endocr Soc.* 2020;4(10):bvaa107.

14. Newell-Price J, Trainer P, Besser M, Grossman A. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. *Endocr Rev.* 1998;19(5):647-72.
15. Fleseriu M, Auchus R, Bancos I, Ben-Shlomo A, Bertherat J, Biermasz NR, Boguszewski CL, Bronstein MD, Buchfelder M, Carmichael JD, Casanueva FF, Castinetti F, Chanson P, Findling J, Gadelha M, Geer EB, Giustina A, Grossman A, Gurnell M, Ho K, Ioachimescu AG, Kaiser UB, Karavitaki N, Katznelson L, Kelly DF, Lacroix A, McCormack A, Melmed S, Molitch M, Mortini P, Newell-Price J, Nieman L, Pereira AM, Petersenn S, Pivonello R, Raff H, Reincke M, Salvatori R, Scaroni C, Shimon I, Stratakis CA, Swearingen B, Tabarin A, Takahashi Y, Theodoropoulou M, Tsagarakis S, Valassi E, Varlamov EV, Vila G, Wass J, Webb SM, Zatelli MC, Biller BMK. Consensus on diagnosis and management of Cushing's disease: a guideline update. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2021;9(12):847-75.
16. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Murad MH, Newell-Price J, Savage MO, Tabarin A. Treatment of Cushing's Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(8):2807-31.
17. Webb SM, Crespo I, Santos A, Resmini E, Aulinas A, Valassi E. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Quality of life tools for the management of pituitary disease. *Eur J Endocrinol.* 2017;177(1):R13-R26.
18. Rubin RR, Peyrot M. Quality of life and diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 1999;15(3):205-18.
19. Frimodt-Moller KE, Mollegaard Jepsen JR, Feldt-Rasmussen U, Krogh J. Hippocampal Volume, Cognitive Functions, Depression, Anxiety, and Quality of Life in Patients With Cushing Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(10):4563-77.
20. Broersen LHA, Andela CD, Dekkers OM, Pereira AM, Biermasz NR. Improvement but No Normalization of Quality of Life and Cognitive Functioning After Treatment of Cushing Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(11):5325-37.
21. Piasecka M, Papakokkinou E, Valassi E, Santos A, Webb SM, de Vries F, Pereira AM, Ragnarsson O. Psychiatric and neurocognitive consequences of endogenous hypercortisolism. *J Intern Med.* 2020;288(2):168-82.

22. Andela CD, Scharloo M, Pereira AM, Kaptein AA, Biermasz NR. Quality of life (QoL) impairments in patients with a pituitary adenoma: a systematic review of QoL studies. *Pituitary*. 2015;18(5):752-76.
23. Valassi E, Feelders R, Maiter D, Chanson P, Yaneva M, Reincke M, Krsek M, Tóth M, Webb SM, Santos A, Paiva I, Komerdus I, Droste M, Tabarin A, Strasburger CJ, Franz H, Trainer PJ, Newell-Price J, Wass JA, Papakokkinou E, Ragnarsson O, ERCUSYN Study Group. Worse Health-Related Quality of Life at long-term follow-up in patients with Cushing's disease than patients with cortisol producing adenoma. Data from the ERCUSYN. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2018;88(6):787-98.
24. Webb SM, Santos A, Resmini E, Martinez-Momblan MA, Martel L, Valassi E. Quality of Life in Cushing's disease: A long term issue? *Ann Endocrinol (Paris)*. 2018;79(3):132-7.
25. Webb SM, Valassi E. Quality of life impairment after a diagnosis of Cushing's syndrome. *Pituitary*. 2022;25(5):768-71.
26. Pereira AM, Tiemensma J, Romijn JA. Neuropsychiatric disorders in Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology*. 2010;92 Suppl 1:65-70.
27. Santos A, Resmini E, Pascual JC, Crespo I, Webb SM. Psychiatric Symptoms in Patients with Cushing's Syndrome: Prevalence, Diagnosis and Management. *Drugs*. 2017;77(8):829-42.
28. Zhang H, Zhao Y, Wang Z. Chronic corticosterone exposure reduces hippocampal astrocyte structural plasticity and induces hippocampal atrophy in mice. *Neurosci Lett*. 2015;592:76-81.
29. Gold PW, Drevets WC, Charney DS. New insights into the role of cortisol and the glucocorticoid receptor in severe depression. *Biol Psychiatry*. 2002;52(5):381-5.
30. Santos A, Resmini E, Martinez Momblan MA, Valassi E, Martel L, Webb SM. Quality of Life in Patients With Cushing's Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:862.
31. Derijk RH, van Leeuwen N, Klok MD, Zitman FG. Corticosteroid receptor-gene variants: modulators of the stress-response and implications for mental health. *Eur J Pharmacol*. 2008;585(2-3):492-501.
32. Derijk RH. Single nucleotide polymorphisms related to HPA axis reactivity. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16(5):340-52.

33. DeRijk R, de Kloet ER. Corticosteroid receptor genetic polymorphisms and stress responsivity. *Endocrine*. 2005;28(3):263-70.
34. van Rossum EF, Lamberts SW. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res*. 2004;59:333-57.
35. Di Blasio AM, van Rossum EF, Maestrini S, Berselli ME, Tagliaferri M, Podesta F, Koper JW, Liuzzi A, Lamberts SWJ. 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.
36. 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.
37. Lin RC, Wang WY, Morris BJ. High penetrance, overweight, and glucocorticoid receptor variant: case-control study. *BMJ*. 1999;319(7221):1337-8.
38. Wust S, Van Rossum EF, Federenko IS, Koper JW, Kumsta R, Hellhammer DH. Common polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene are associated with adrenocortical responses to psychosocial stress. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(2):565-73.
39. van Rossum EF, Koper JW, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Arp P, Ester W, Janssen JAMJL, Brinkmann AO, de Jong FH, Grobbee DE, Pols HAP, Lamberts SWJ. Identification of the BclI 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.
40. van Rossum EF, Binder EB, Majer M, Koper JW, Ising M, Modell S, Salyakina D, Lamberts SWJ, Holsboer F. Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene and major depression. *Biol Psychiatry*. 2006;59(8):681-8.
41. Spijker AT, van Rossum EF. Glucocorticoid receptor polymorphisms in major depression. Focus on glucocorticoid sensitivity and neurocognitive functioning. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1179:199-215.
42. Krishnamurthy P, Romagni P, Torvik S, Gold PW, Charney DS, Detera-Wadleigh S, Cizza G; P.O.W.E.R. (Premenopausal, Osteoporosis Woman, Alendronate,

- Depression) Study Group. Glucocorticoid receptor gene polymorphisms in premenopausal women with major depression. *Horm Metab Res.* 2008;40(3):194-8.
43. Zobel A, Jessen F, von Widdern O, Schuhmacher A, Hofels S, Metten M, Rietschel M, Scheef L, Block W, Becker T, Schild HH, Maier W, Schwab SG. Unipolar depression and hippocampal volume: impact of DNA sequence variants of the glucocorticoid receptor gene. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008;147B(6):836-43.
44. 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.
45. Szappanos A, Patocs A, Toke J, Boyle B, Sereg M, Majnik J, Borgulya G, Varga I, Likó I, Rácz K, Tóth 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.
46. van Rossum EF, Koper JW, Huizenga NA, Uitterlinden AG, Janssen JA, Brinkmann AO, Grobbee DE, de Jong FH, van Duyn CM, Pols HAP, Lamberts SWJ. 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.
47. Koper JW, Stolk RP, de Lange P, Huizenga NA, Molijn GJ, Pols HA, Grobbee DE, Karl M, de Jong FH, Brinkmann AO, Lamberts SWJ. Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance. *Hum Genet.* 1997;99(5):663-8.
48. van Rossum EF, de Jong FJ, Koper JW, Uitterlinden AG, Prins ND, van Dijk EJ, Koudstaal PJ, Hofman A, de Jong FH, Lamberts SWJ, Breteler MMB. Glucocorticoid receptor variant and risk of dementia and white matter lesions. *Neurobiol Aging.* 2008;29(5):716-23.
49. van West D, Van Den Eede F, Del-Favero J, Souery D, Norrback KF, Van Duijn C, Sluijs S, Adolfsson R, Mendlewicz J, Deboutte D, Van Broeckhoven C, Claes S. Glucocorticoid receptor gene-based SNP analysis in patients with recurrent major depression. *Neuropsychopharmacology.* 2006;31(3):620-7.

50. 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.
51. 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.
52. van den Akker EL, Koper JW, van Rossum EF, Dekker MJ, Russcher H, de Jong FH, Uitterlinden AG, Hofman A, Pols HA, Witteman JCM, Lamberts SWJ. Glucocorticoid receptor gene and risk of cardiovascular disease. *Arch Intern Med.* 2008;168(1):33-9.
53. 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).
54. Tiemensma J, Biermasz NR, Middelkoop HA, van der Mast RC, Romijn JA, Pereira AM. Increased prevalence of psychopathology and maladaptive personality traits after long-term cure of Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(10):E129-41.
55. Ragnarsson O, Berglund P, Eder DN, Johannsson G. Long-term cognitive impairments and attentional deficits in patients with Cushing's disease and cortisol-producing adrenal adenoma in remission. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(9):E1640-8.
56. Valassi E, Crespo I, Keevil BG, Aulinas A, Urgell E, Santos A, Trainer PJ, Webb SM. Affective alterations in patients with Cushing's syndrome in remission are associated with decreased BDNF and cortisone levels. *Eur J Endocrinol.* 2017;176(2):221-31.
57. Derijk RH, de Kloet ER. Corticosteroid receptor polymorphisms: determinants of vulnerability and resilience. *Eur J Pharmacol.* 2008;583(2-3):303-11.
58. Kreuzer KA, Bohn A, Lupberger J, Solassol J, le Coutre P, Schmidt CA. Simultaneous absolute quantification of target and control templates by real-time fluorescence reverse transcription-PCR using 4-(4'-dimethylaminophenylazo)benzoic acid as a dark quencher dye. *Clin Chem.* 2001;47(3):486-90.
59. Webb SM, Badia X, Barahona MJ, Colao A, Strasburger CJ, Tabarin A, van Aken MO, Pivonello R, Stalla G, Lamberts SWJ, Glusman JE. Evaluation of health-related

quality of life in patients with Cushing's syndrome with a new questionnaire. *Eur J Endocrinol.* 2008;158(5):623-30.

60. Milian M, Teufel P, Honegger J, Gallwitz B, Schnauder G, Psaras T. The development of the Tuebingen Cushing's disease quality of life inventory (Tuebingen CD-25). Part I: construction and psychometric properties. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012;76(6):851-60.

61. Ware JE, Jr., Sherbourne CD. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med Care.* 1992;30(6):473-83.

62. McHorney CA, Ware JE, Jr., Raczek AE. The MOS 36-Item Short-Form Health Survey (SF-36): II. Psychometric and clinical tests of validity in measuring physical and mental health constructs. *Med Care.* 1993;31(3):247-63.

63. Bleicken B, Hahner S, Loeffler M, Ventz M, Decker O, Allolio B, Quinkler M. Influence of hydrocortisone dosage scheme on health-related quality of life in patients with adrenal insufficiency. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010;72(3):297-304.

64. Feldkamp L, Muller L, Deutschbein T, Detomas M, Hahner S, Strasburger CJ, Künzel H, Oßwald A, Braun L, Rubinstein G, Reincke M, Quinkler M, Kienitz T. Glucocorticoid receptor polymorphism Bcl1 with increased glucocorticoid sensitivity has a positive influence on quality of life in endogenous Cushing's syndrome in remission. *Eur J Endocrinol.* 2023;188(4):366-74.

65. Berr CM, Stieg MR, Deutschbein T, Quinkler M, Schmidmaier R, Oßwald A, Reisch N, Ritzel K, Dimopoulou C, Fazel J, Hahner S, Stalla GK, Beuschlein F, Reincke M. Persistence of myopathy in Cushing's syndrome: evaluation of the German Cushing's Registry. *Eur J Endocrinol.* 2017;176(6):737-46.

66. Lindsay JR, Nansel T, Baid S, Gumowski J, Nieman LK. Long-term impaired quality of life in Cushing's syndrome despite initial improvement after surgical remission. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(2):447-53.

67. Lindholm J, Juul S, Jorgensen JO, Astrup J, Bjerre P, Feldt-Rasmussen U, Hagen C, Jørgensen J, Kosteljanetz M, Kristensen L, Laurberg P, Schmidt K, Weeke J. Incidence and late prognosis of cushing's syndrome: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(1):117-23.

68. Sonino N, Fava GA, Belluardo P, Girelli ME, Boscaro M. Course of depression in Cushing's syndrome: response to treatment and comparison with Graves' disease. *Horm Res.* 1993;39(5-6):202-6.
69. Crespo I, Santos A, Gomez-Anson B, Lopez-Mourelo O, Pires P, Vives-Gilabert Y, Webb SM, Resmini E. Brain metabolite abnormalities in ventromedial prefrontal cortex are related to duration of hypercortisolism and anxiety in patients with Cushing's syndrome. *Endocrine.* 2016;53(3):848-56.
70. Brown ES. Effects of glucocorticoids on mood, memory, and the hippocampus. Treatment and preventive therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1179:41-55.
71. Tiemensma J, Kokshoorn NE, Biermasz NR, Keijser BJ, Wassenaar MJ, Middelkoop HA, Pereira AM, Romijn JA. Subtle cognitive impairments in patients with long-term cure of Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(6):2699-714.
72. Fietta P, Fietta P, Delsante G. Central nervous system effects of natural and synthetic glucocorticoids. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2009;63(5):613-22.
73. 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.
74. Roerink SH, Wagenmakers MA, Smit JW, van Rossum EF, Netea-Maier RT, Plantinga TS, Hermus ARMM. Glucocorticoid receptor polymorphisms modulate cardiometabolic risk factors in patients in long-term remission of Cushing's syndrome. *Endocrine.* 2016;53(1):63-70.
75. Limumpornpetch P, Morgan AW, Tiganeşcu A, Baxter PD, Nyawira Nyaga V, Pujades-Rodriguez M, . The Effect of Endogenous Cushing Syndrome on All-cause and Cause-specific Mortality. *J Clin Endocrinol Metab.* 2022;107(8):2377-88.
74. Müller H-J. PCR-Polymerase-Kettenreaktion. *Das Methodenbuch Spektrum Aka de mischer Verlag.* 2001.
75. 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.
76. Constitution of the World Health Organization : Amendments to Articles 24 and 25, Adopted by the Fifty-First World Health Assembly at Geneva May 16, 1998. Washington, D.C.: Palais des Nations, 1952. Print.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Lara Lou Isabella Feldkamp, 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 Lebensqualität in Patienten mit Cushing-Syndrom / Investigation of the association between polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene and quality of life in patients with Cushing's syndrome* 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:innen 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.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung).

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

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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 den erfolgten Publikationen

Publikation 1: **Feldkamp L**, Müller L, Deutschbein T, Detomas M, Hahner S, Strasburger CJ, Künzel H, Oßwald A, Braun L, Rubinstein G, Reincke M, Quinkler M, Kienitz T. Glucocorticoid receptor polymorphism Bcll with increased glucocorticoid sensitivity has a positive influence on quality of life in endogenous Cushing's syndrome in remission. Eur J Endocrinol. 2023 Apr 5;188(4):366-374. doi: 10.1093/ejendo/lvad043. PMID: 36995896.

Beitrag im Einzelnen:

Die Datenerhebung für diese Arbeit erfolgte in drei Zentren des Deutschen Cushing Registers und wurde in Würzburg und München durch die dortigen Mitarbeiter:innen ausgeführt. Nachdem ich in München durch Stephanie Zopp in die Arbeit mit dem Cushing-Register eingeführt wurde, habe ich in Berlin über drei Jahre im Rahmen meiner Arbeit als Doktorandin die Daten aus der Endokrinologiepraxis am Stuttgarterplatz pseudonymisiert und in das Register eingepflegt. Für meine Forschung habe ich im Verlauf die benötigten Datensätze der drei Standorte aus dem Register und den Auszügen daraus herausgefiltert. Frau Dr. Lisa Müller arbeitete mich im Labor der Charité ein und lehrte mich die Methodik der DNA-Extraktion und die anschließende Genotypisierung. Die Supervision im Labor erfolgte durch Frau Dr. Tina Kienitz. Die zur Genotypisierung der Kohorte nötigen EDTA-Vollblut-Proben wurden mir ebenfalls von den jeweiligen Standorten zur Verfügung gestellt, aus München bekam ich bereits extrahierte DNA-Proben. Im Verlauf bestimmte ich die Polymorphismen der gesamten Kohorte selbstständig und ohne fremde Hilfe. Die Statistik führte ich nach einer Statistikberatung an der Charité und in Absprache mit meinem Doktorvater eigenständig durch. Sämtliche Tabellen und Abbildungen der Publikation habe ich selbst mit dem Programm Microsoft Power Point erstellt. Das von mir eigenständig verfasste Manuskript zu unserer Publikation wurde von meinem Betreuer und sämtlichen Ko-Autoren gegengelesen und überarbeitet.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

PUBLIKATION

Feldkamp L, Müller L, Deutschbein T, Detomas M, Hahner S, Strasburger CJ, Künzel H, Oßwald A, Braun L, Rubinstein G, Reincke M, Quinkler M, Kienitz T. Glucocorticoid receptor polymorphism BclI with increased glucocorticoid sensitivity has a positive influence on quality of life in endogenous Cushing's syndrome in remission. *Eur J Endocrinol.* 2023 Apr 5;188(4):366-374. doi: 10.1093/ejendo/lvad043. PMID: 36995896.

<https://doi.org/10.1093/ejendo/lvad043>

<https://doi.org/10.1093/ejendo/lvad043>

<https://doi.org/10.1093/ejendo/lvad043>

<https://doi.org/10.1093/ejendo/lvad043>

<https://doi.org/10.1093/ejendo/lvad043>

<https://doi.org/10.1093/ejendo/lvad043>

<https://doi.org/10.1093/ejendo/lvad043>

<https://doi.org/10.1093/ejendo/lvad043>

<https://doi.org/10.1093/ejendo/lvad043>

LEBENS LAUF

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

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

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

KOMPLETTE PUBLIKATIONSLISTE

Feldkamp LLI, Kaminsky E, Kienitz T, Quinkler M. Central Diabetes Insipidus Caused by Arginine Vasopressin Gene Mutation: Report of a Novel Mutation and Review of Literature. *Horm Metab Res.* 2020 Nov;52(11):796-802. doi: 10.1055/a-1175-1307. Epub 2020 Jul 6. PMID: 32629514.

Feldkamp L, Müller L, Deutschbein T, Detomas M, Hahner S, Strasburger CJ, Künzel H, Oßwald A, Braun L, Rubinstein G, Reincke M, Quinkler M, Kienitz T. Glucocorticoid receptor polymorphism BclI with increased glucocorticoid sensitivity has a positive influence on quality of life in endogenous Cushing's syndrome in remission. *Eur J Endocrinol.* 2023 Apr 5;188(4):366-374. doi: 10.1093/ejendo/lvad043. PMID: 36995896.

DANKSAGUNG

Ein großes Dankeschön an alle Menschen, die einen Teil zu meiner Dissertation beigetragen haben und ohne die die Forschungsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Vordergründig möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Marcus Quinkler für die Möglichkeit bedanken, zu diesem spannenden Thema forschen zu dürfen. Ich bin ihm außerdem sehr dankbar für die gute wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit, die Möglichkeit zu Präsentationen meiner Daten auf endokrinologischen Kongressen, die Lehre und nicht zu vergessen die stetige Motivation.

Für die Hilfe bei der Einarbeitung im Deutschen Cushing Register und der Dateneingabe möchte ich Stephanie Zopp und Dr. med. Lisa Müller meinen großen Dank aussprechen.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. med. Christian Strasburger und Dr. med. Zida Wu dafür, dass ich meine Analysen im Endokrinologischen Forschungslabor der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchführen durfte. Für die geduldige Einarbeitung in die Laborarbeit und die Weitergabe Ihrer wertvollen Erfahrungen bin ich Dr. med. Lisa Müller sehr dankbar. Außerdem für die generöse Überlassung Ihrer Forschungsdaten.

Danke auch an Dr. med. Tina Kienitz für die großzügige Unterstützung meiner Forschung im Labor, sowie die Beantwortung meiner Fragen während der gesamten Zeit. Sabine Kaiser möchte ich an dieser Stelle für die gemeinsame Zeit und Unterstützung in Sachen Organisation und Bestellungen im Labor danken. Zuletzt hätte ich ohne die Bereitstellung der PCR-Maschine der Arbeitsgruppe Keilholz meine Arbeit nicht zu Ende führen können, vielen Dank.

Einen großen Dank auch an die Ko-Autoren meiner Publikation. Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Martin Reincke und Stephanie Zopp aus München, sowie PD Dr. med. Timo Deutschbein aus Würzburg, für die unkomplizierte und inspirierende Zusammenarbeit. Darüber hinaus möchte ich mich bei allen MitarbeiterInnen des Deutschen Cushing Registers und den Mitarbeiterinnen der Endokrinologiepraxis Charlottenburg herzlich bedanken.

Weiterhin danke ich meiner Doktorschwester Pauline Gendreitzig für den stetigen Austausch und das gemeinsame Besuchen von Kongressen.

Auch den Patienten, welche an der Studie teilgenommen haben, möchte ich herzlich danken für die umfassende und gewissenhafte Bearbeitung der sicherlich zeitaufwendigen Fragebögen und die Partizipation am Deutschen Cushing Register.

Für die stetige Ermutigung und Motivation gerade in schwierigen Zeiten bin ich meinen Eltern, Großeltern, Geschwistern, Freunden und meinem Partner sehr dankbar.