

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

**Molekulare Pathogenese Morbus Cushing: Auf der Suche nach möglichen
Zielproteinen der Ubiquitin-spezifischen-Peptidase 8 in corticotropen
Hypophysenadenomen**

Inaugural -Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Lisanne Caroline Knobloch

Würzburg, März 2020

Referent: Prof. Dr. med. Martin Fassnacht

Korreferent bzw. Korreferentin: Priv.-Doz. Dr.med. Camelia-Maria Monoranu

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2020

Die Promovierende ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse	1
1.2 Cushing Syndrom: Klassifikation	2
1.3 Morbus Cushing	3
1.3.1 Allgemeines	3
1.3.2 Epidemiologie und Mortalität	4
1.3.3 Klinisches Bild	4
1.3.4 Diagnostik	5
1.3.5 Therapien und ihre Grenzen	5
1.3.6 Molekulare Pathogenese	7
1.4 Ubiquitin-spezifische-Peptidase 8	13
1.4.1 Prävalenz und Genotyp/ Phänotyp Korrelation	13
1.4.2 Funktion	15
1.4.3 Aktivierende USP8 Mutation	16
1.4.4 Rolle der USP8 Mutation in der Entwicklung von Morbus Cushing	17
1.5 Fragestellung	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Patientenkollektiv für die Analyse der klinischen Daten	23
2.2 Probenkollektiv für die immunhistochemische Untersuchung	25
2.2.1 Tissue Micro Arrays	26
2.3 Chromogene Immunhistochemie	26
2.3.1 Entparaffinierung, Antigendemaskierung und Hemmung der endogenen Peroxidase	26
2.3.2 Spezifische Färbung	28
2.3.3 Negativkontrollen	28
2.3.4 Signalamplifikation	29
2.3.5 Gegenfärbung und Deckelung	30
2.4 Semiquantitative Analyse der Immunreaktivität	30
2.5 Statistische Analyse	31
3. Ergebnisse	33
3.1 Zusammenhänge zwischen klinischen Daten und Mutationsstatus	33
3.1.1 Patientenalter	33
3.1.2 Geschlechterverteilung	33
3.1.3 Body Mass Index	33
3.1.4 Tumorgröße	34

3.1.5 Invasivität des Tumors	34
3.1.6 Resektionsgrad des Tumors	34
3.1.7 Rezidive	35
3.1.8 Präoperative Hormonspiegel	36
3.2. Proteinexpressionen	39
3.2.1 Ubiquitin-spezifische Peptidase 8	39
3.2.2 Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor	40
3.2.3 P27/ Kip1	42
3.2.4 Cyclin E	43
3.2.5 Corticotropin Releasing Hormone-Rezeptor 1	44
3.2.6 Arginin Vasopressin -Rezeptor 1b	45
3.2.7 Testicular-Orphan-Rezeptor 4	46
3.2.8 Hitzeschockprotein 90	47
3.2.9 cAMP Response Element Binding Protein	49
3.2.10 Phosphoryliertes CREB	50
3.2.11 Proteinkinase A (PKA)	51
4. Diskussion	52
4.1 Klinische Zusammenhänge	52
4.2 Deregulierte Proteine und USP8	55
4.2.1 USP8	55
4.2.2 EGFR	55
4.2.3 P27/Kip1	56
4.2.4 Cyclin E	58
4.2.5 CRHR1	59
4.2.6 AVPR1b	59
4.2.7 TR4	60
4.2.8 HSP90	61
4.2.9 CREB, pCREB und PKA	62
4.3 Limitationen und Stärken der Studie	62
4.4 Ausblick	64
5. Zusammenfassung	66
6. Literaturverzeichnis	68
7.Tabellen-und Abbildungsverzeichnis	86
7.1. Tabellen	86
7.2. Abbildungen	86

1. Einleitung

1.1 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

Die endogene Cortisolsekretion des Menschen unterliegt unter physiologischen Bedingungen der Regulation des hypothalamisch-hypophysären-adrenokortikalen Regelkreises (Abbildung (Abb.)1). Die Achse ist eine interaktive neuroendokrine Einheit, die ihre Schlüsselrolle in der Regulation der basalen Cortisol-Homöostase und in der Antwort des Körpers auf Stress hat.¹

Die durch das zentrale Nervensystem bedingte Sekretion des Corticotropin-Releasing-Hormons (CRH) aus dem Hypothalamus stimuliert in der Adenohypophyse die Ausschüttung des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) aus den corticotropen Zellen. Die Aktivität der CRH Neuronen im Hypothalamus wird durch einen circadianen Rhythmus und durch Stress beeinflusst. Viele hypothalamische Neurone, die CRH synthetisieren, synthetisieren zudem Arginin Vasopressin (AVP). Es wird angenommen, dass eine erhöhte AVP Freisetzung aus den hypophysiotropischen Nerven zusammen mit CRH für die vollständige ACTH-Antwort notwendig ist. CRH und AVP gelangen über die portalen Blutgefäße in die anteriore Hypophyse wo sie die corticotropen Zellen stimulieren.¹ CRH bindet dort an den G-Protein gekoppelten Rezeptor (CRHR1) auf der Zelloberfläche und aktiviert das stimulierende G-Protein der Alpha Untereinheit, welches mittels des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) und der Proteinkinase A die intrazelluläre Signalkaskade initiiert.^{2,3} Das letzte Stadium der Signalkaskade ist die Transkription des Proopiomelanocortin Gens (POMC) sowie die ACTH Freisetzung. POMC ist ein Vorläuferpolypeptid, welches unter anderem in das Peptidhormon ACTH gespalten wird. ACTH bindet an den Melanocortin 2-Rezeptor (MC2R) an der Oberfläche der adrenokortikalen Zellen in der *Zona fasciculata* der Nebennierenrinde und stimuliert dort die Steroidgenese.⁴

Das Endprodukt, Cortisol, wird dann in die Zirkulation freigesetzt und reguliert die hypothalamisch-hypophysäre Achse mit einem negativen Feedbackmechanismus durch die Typ 2 Glukokortikoid-Rezeptoren (GR) in der

Hypophyse und im Hypothalamus.⁵ Der GR/ Cortisol Komplex transloziert vom Zytoplasma in den Nukleus und bindet dort an regulatorische Einheiten und inhibiert somit die Synthese von POMC, der CRH und AVP mRNA und reduziert somit letztendlich die ACTH-Sekretion.^{6,7}

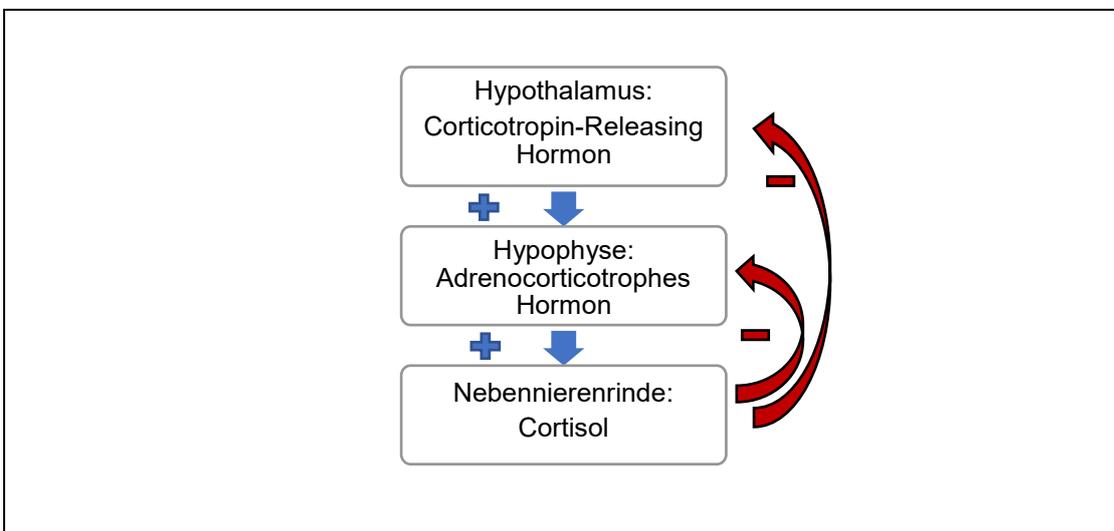


Abb. 1: Regulation der Cortisol-Produktion in der Nebennierenrinde durch Hypothalamus und Hypophyse (+ stimuliert die Ausschüttung; - inhibiert die Ausschüttung)

1.2 Cushing Syndrom: Klassifikation

Das Cushing-Syndrom wird durch erhöhte zirkulierende Cortisolspiegel verursacht. Während das exogene Cushing-Syndrom durch die Langzeiteinnahme von Kortikosteroiden und sehr selten auch durch die Gabe von ACTH bedingt ist, zeichnet sich das endogene Cushing-Syndrom durch eine pathologische körpereigene erhöhte Produktion von Cortisol aus und kann in ACTH-abhängig und ACTH-unabhängig klassifiziert werden (Abb.2).⁸

ACTH-abhängige Cushing-Syndrome sind mit 80-85% für die Mehrheit der Fälle verantwortlich. Davon haben 75-80% ihre Ursache zentral in ACTH-sezernierenden Hypophysenadenomen. Diese gutartigen Tumore führen zu einer Überproduktion von ACTH. ACTH stimuliert konsekutiv die Hormonproduktion in der Nebennierenrinde und hat einen Anstieg von Cortisol im Blut zur Folge. Neben den Hypophysenadenomen können die Ursachen der Überproduktion von ACTH bei 15-20% auch in anderen Organen, wie bei dem ektopen Cushing-

Syndrom liegen.^{9,10} Hierzu zählen paraneoplastische Syndrome oder neuroendokrine Tumore. Ein sehr geringer Anteil ist zudem auf CRH-produzierende Tumore zurückzuführen.^{11–13}

Das ACTH-unabhängige adrenale Cushing-Syndrom macht lediglich 15-20% des endogenen Cushing-Syndroms aus.^{9,14} Ursächlich sind hier in den meisten Fällen Tumore der Nebennierenrinde, welche zu 90% unilaterale Tumore sind und in 80% der Fälle als gutartig eingestuft werden.¹⁵ Seltener adrenale Ursachen sind die makronoduläre adrenale Hyperplasie, der Carney' s Komplex und das McCune-Albright Syndrom.^{9,16,17}

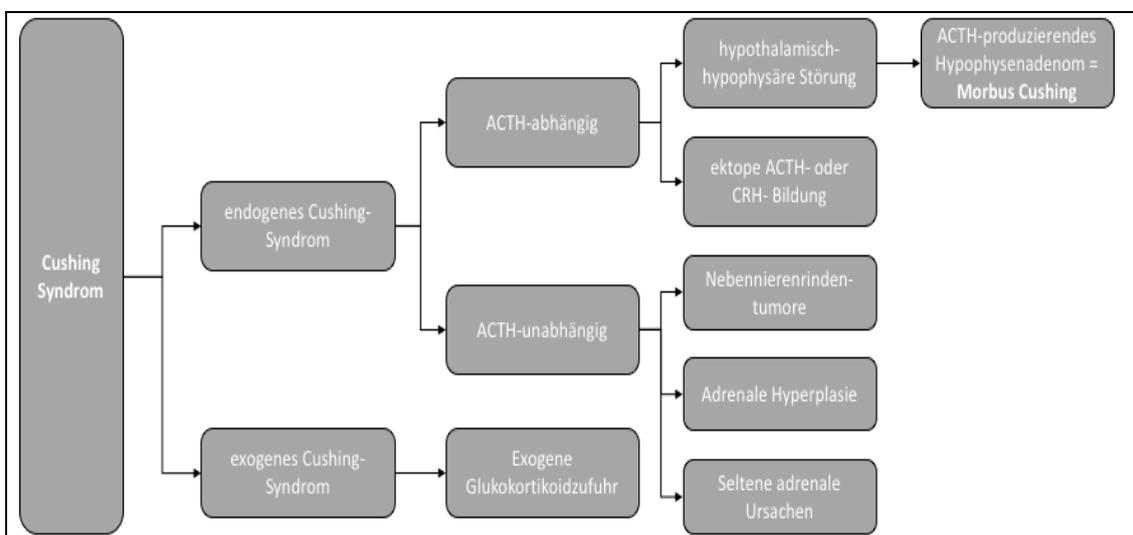


Abb. 2: Klassifikation des Cushing-Syndroms

1.3 Morbus Cushing

1.3.1 Allgemeines

Der Begriff Morbus Cushing (MC) wird eigens für ACTH-sezernierende Hypophysenadenome und dem daraus resultierenden Hypercortisolismus verwendet.¹³ Von allen Hypophysenadenomen, repräsentieren ACTH-produzierende Adenome 10-12%.¹⁸ MC wurde erstmals 1932 von dem Neurochirurgen Harvey Cushing beschrieben. Er war auch der Pionier der transspenoidalen operativen Entfernung des zugrundeliegenden Hypophysenadenoms.¹⁹ Die meisten corticotropen Adenome sind sporadische isolierte Tumore aus monoklonalen Zellpopulationen.^{20,21} Ihre Größe ist für gewöhnlich eher klein; 80% der Patienten leiden an einem Mikroadenom (<10

mm).²² Eine Tumorinvasion liegt in 13-25% der Fälle vor und zeigt ein gehäuftes Vorkommen in Patienten mit dem Nelson Syndrom, welches seine Ursache in der bilateralen Adrenalektomie bei Cushing Syndrom hat und die Gefahr eines aggressiven Hypophysentumors mit sich bringt.^{23,24}

1.3.2 Epidemiologie und Mortalität

MC ist mit einer Inzidenz von 0,7-2,4 pro Millionen Einwohner pro Jahr eine seltene, aber lebensbedrohliche Erkrankung. Die Mortalität liegt bei fast 4% mit der höchsten Sterberate im ersten Jahr nach der Diagnose.^{9, 25,26, 27}

Obwohl die populations-basierten Studien eine geringe Inzidenz des endogenen Cushing-Syndroms aufzeigen, lassen mehrere Beurteilungen von Patienten mit unkontrolliertem Diabetes Mellitus oder Hypertension eine weitaus höhere Zahl vermuten.²⁸⁻³⁰ MC wird häufig 3-6 Jahre nach Krankheitsbeginn diagnostiziert. Der typische MC Patient ist weiblich (Ratio Frauen/ Männer: 9: 1) und im Alter von 50-60 Jahren.^{18,31}

1.3.3 Klinisches Bild

Bei Diagnosestellung haben über 50% der Patienten mit MC ein Hypophysen-Mikroadenom mit einem Diameter von <5mm. Nur 10% der Adenome üben durch eine Tumorkompression einen Effekt auf das umliegende zerebrale Gewebe aus.³² Durch das verdrängende Wachstum können sich Hypophysentumore beispielsweise durch Gesichtsfeldausfälle wie die bitemporale Hemianopsie und häufig auch durch Kopfschmerzen äußern. Auch Hirnnervendefekte, eine Unterfunktion der Hypophyse sowie eine Ischämie der Hypophyse können entstehen.³³ Die Hauptsymptomatik der Patienten resultiert jedoch aus der chronischen Glukokortikoidaussetzung des Gewebes.¹⁸ Die Patienten leiden häufig unter Gewichtszunahme, Stammfettsucht, arterieller Hypertension, proximalen Myopathien, Hautatrophie, Diabetes Mellitus und Osteoporose.^{18,22,34} Frauen leiden zudem unter Menstruationsstörungen, Hirsutismus und Virilismus.^{35,36} Die Lebensqualität der Patienten ist deutlich eingeschränkt und psychiatrische Krankheiten wie Depressionen, Angststörungen und kognitive

Dysfunktionen sind keine Seltenheit.³⁷ Die mit MC assoziierten Todesfälle resultieren in der Mehrheit der Fälle aus kardiovaskulären und metabolischen Komplikationen, venösen Thrombosen sowie Infektionen.^{26, 38–41}

1.3.4 Diagnostik

Besteht der klinische Verdacht auf MC, so wird zunächst einer von vier möglichen Screening Tests auf Hypercortisolismus durchgeführt. Hierzu gehören die Messung des freien Cortisols im 24-Stunden Urin, die Cortisolbestimmung im Speichel um Mitternacht, der 1mg Dexamethason-Hemmtest (DHT) oder ein längerer niedrigdosierter DHT.⁴² Die Diagnose gilt als bestätigt, wenn zwei der Screeningtests positiv sind.⁴³ Um die pathologische Veränderung zu lokalisieren, sind weitere Tests zur Bestätigung sowie bildgebende Verfahren notwendig.

Es werden die Serumspiegel von ACTH bestimmt um den ACTH-abhängigen von dem ACTH-unabhängigen Hypercortisolismus zu differenzieren.⁴² Ein CRH-Test wird durchgeführt, um einen MC von einer ektope ACTH-Ausschüttung abzugrenzen. Alternativ kann ein hochdosierter DHT oder eine Magnetresonanztomographie (MRT) der Sella mit Kontrastmittel angewandt werden.^{31, 44} 85-87% der Patienten mit einem im MRT identifizierten Adenom, weisen ein Mikroadenom mit einem Diameter von <10mm auf, die übrigen 13-15% sind Makroadenome.^{23,45} Das MRT kann in bis zu 40% der Fälle des MC trotz Vorhandenseins eines Mikroadenoms unauffällig sein.⁴⁶ Wenn die biochemischen und anatomischen Untersuchungen nicht verlässlich zwischen einem MC und einer ektope ACTH-Produktion unterscheiden können, wird das Bilaterale Inferiore Petrosal Sinus Sampling (BIPSS) als Goldstandard mit einer Sensitivität und Spezifität von je nahezu 94% in der Diagnostik des MC angewendet.^{31,47, 48–50}

1.3.5 Therapien und ihre Grenzen

1.3.5.1 Transsphenoidale Resektion

Die transsphenoidale Resektion des Adenoms ist für Patienten mit ACTH-Adenomen der Goldstandard und zeigt gute Ergebnisse sowie ein geringes

operatives Risiko.⁵¹⁻⁵³ Sie ist weniger erfolgreich in Patienten mit nicht sichtbaren Tumoren sowie Makroadenomen.⁵⁴ Die Remissionsraten nach der Resektion liegen zwischen 65-90% bei Mikroadenomen und > 65% bei Makroadenomen und sind abhängig von der Tumorgöße und der Invasivität in umliegendes Gewebe.^{51,55-60} Postoperative Rezidive konnten bislang in 3-47% beobachtet werden und traten im Durchschnitt nach 16-49 Monaten auf.⁶¹ Die Rezidivrate bei Mikroadenomen nach transsphenoidaler Resektion liegt zwischen 5-10% in den ersten 5 Jahren nach der Operation und bei 10-20% ab 10 Jahren postoperativ. Makroadenome haben eine weitaus höhere Rezidivrate von 12-45%.¹⁸

1.3.5.2 Radiotherapie

Die Radiotherapie wird angewandt, wenn der Hypercortisolismus nach der chirurgischen Resektion weiter fortbesteht oder Kontraindikationen für eine Operation vorliegen. Die konventionelle, fraktionierte Bestrahlung ist sehr effektiv; eine begleitende medikamentöse Therapie bis zum eintretenden Effekt der Radiotherapie kann jedoch nötig sein.⁶² Die stereotaktische Radiochirurgie erzielt schneller ihren Effekt und weist eine exzellente Tumorkontrolle auf. Unabhängig von der Methode der Radiotherapie, ist die Gefahr eines Rezidivs gegeben und die Patienten haben ein hohes Risiko eine langfristige Hypophysenunterfunktion zu entwickeln.⁶³

1.3.5.3 Medikamentöse Therapie

Die medikamentöse Therapie wird bei Patienten eingesetzt, die zur chirurgischen Resektion geplant sind, die Kontraindikationen für die Operation aufweisen, bei denen die Resektion nicht erfolgreich war oder bei denen die Effekte der Radiotherapie abgewartet werden müssen. Der medikamentöse Therapieansatz ist aktuell noch limitiert und auf wenige Medikamente beschränkt.⁶⁴ In den letzten Jahren hat das Gebiet der medikamentösen Therapie jedoch signifikant an Aufmerksamkeit gewonnen und viele Reviews wurden verfasst, um den fortlaufenden Entwicklungen nachzukommen. Aus dem pathophysiologischen Blickwinkel sind die Medikamente im Wesentlichen auf vier potenzielle Ziele fokussiert: (1) Reduktion der Überproduktion von ACTH aus corticotropen Zellen (2) Blockade der ACTHR Bindung in der Nebennierenrinde, (3) Inhibition der

Steroidgenese und (4) Blockade der GR Bindung im peripheren Gewebe. Allen bisher klinisch angewandten Medikamenten ist gemeinsam, dass sie ein hohes Risiko der Überbehandlung sowie der adrenalen Insuffizienz bergen. Die Medikamente führen nicht selten zu Nebenwirkungen und sind in ihrer Effizienz sehr limitiert.⁶⁵ Ein Review von 2018 stellte die neusten aussichtsreichen Entwicklungen der medikamentösen Therapie des MC dar. Durch die Entdeckung der Überexpression des Hitzeschockproteins 90 (HSP90) in corticotropen Adenomen, soll aktuell mit dem HSP90 Inhibitor Silibinin eine sehr vielversprechende, nicht-invasive Behandlungsmethode in klinischen Studien getestet werden.^{66, 67} Weitere pharmakologische Optionen, die den Zellzyklus und die Signaltransduktion als Angriffsziel haben, sind Inhibitoren der Histon-Deacetylase sowie Kinase Inhibitoren. In präklinischen Studien werden diese aktuell hinsichtlich ihrer Effizienz und Nebenwirkungen getestet.⁶⁶

Ein besseres Verständnis der molekularen Pathogenese des MC ist dringend erforderlich, um optimierte pharmakologische Optionen und somit langfristig eine bessere Therapiekontrolle zu erzielen.⁵²

1.3.5.4 Bilaterale Adrenalektomie

Wenn alle anderen Therapiemöglichkeiten versagen, wird die definitive Behandlungsoption der bilateralen Adrenalektomie in Betracht gezogen.⁶⁸

Diese führt rasch zu einer Reduzierung des Cortisolspiegels und den assoziierten Morbiditäten. Eine lebenslange Substitution von Glukokortikoiden und Mineralkortikoiden werden diese Patienten jedoch ihr Leben lang benötigen.

Weiterhin birgt die beidseitige Adrenalektomie für einen Teil der Patienten die Gefahr des Nelsons Syndroms, ein potenziell aggressiver Hypophysentumor der ACTH produziert und eine Hyperpigmentation verursacht.⁶⁹

1.3.6 Molekulare Pathogenese

1.3.6.1 Allgemeine Tumorgenese

Die molekulare Pathogenese des MC ist seit seiner Erstbeschreibung nur unzureichend verstanden worden. Ein Ansatzpunkt zur Ergründung der Ursache

war es, mögliche Veränderungen in bereits bekannten Prozessen der Zellteilung und Zellproliferation, zu finden.

Die chromosomale Instabilität wird u.a. als Kennzeichen der Tumorgenese gesehen. Das Pituitary Transforming Gen (PTTG) kodiert Securin, das die Teilung von Schwesterchromatiden in der Metaphase reguliert und sich in Hypophysenadenomen und MC überexprimiert zeigte sowie mit einer erhöhten Tumoraggressivität assoziiert ist.⁷⁰

Weiterhin ließ sich in corticotropen Adenomen eine Verminderung des Cyclin-abhängigen-Kinase Inhibitors (CKI) P27/Kip1⁷¹⁻⁷³, sowie eine Überexpression verschiedener Cycline, insbesondere Cyclin E, nachweisen.^{74,75} P27/Kip1 spielt neben seiner Funktion als CKI die Rolle eines Tumorsuppressor-Gens und ist an der Zelldifferenzierung beteiligt. P27/Kip1 bindet an Cyclin E-CDK2 oder Cyclin D-CDK4 Komplexe, verhindert deren Aktivierung und kontrolliert somit den Zellzyklus bei G1 und hat als Hauptfunktion, die Zellteilung zu stoppen oder zu verlangsamen.⁷⁴ Die Verminderung von P27/Kip1 in corticotropen Adenomen könnte daher im Sinne einer gesteigerten proliferativen Aktivität zu einer Neoplasie beitragen. Die Ursache für die Herabregulation von P27/Kip1 ist bislang noch unbekannt.⁷⁶

Auch Wachstumsfaktoren sowie ihre Rezeptoren spielen eine Rolle in der Tumorgenese. Eine relevante Beobachtung ist die erhöhte Expression des Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptors (EGFR) in Hypophysenadenomen. Nach der Bindung von EGF, induziert EGFR intrazelluläre Signalkaskaden und stimuliert die Zellproliferation, die POMC Transkription und die ACTH Sekretion in corticotropen Zellen. EGFR ist bereits seit vielen Jahren für seinen allgemeinen stimulierenden Effekt in der hypothalamisch-hypophysären Achse bekannt.^{77,78} Es konnte zudem gezeigt werden, dass die EGFR Expression bei Hypophysenadenomen vor allem gehäuft (85%) in corticotropen Tumoren zu finden ist.⁷⁹ Die Überexpression ist mit größeren Tumoren sowie mit einem MC, der möglicherweise mit EGFR Inhibitoren kontrolliert werden könnte, assoziiert. Primäre Zellkulturen eines resezierten humanen corticotropen Adenoms wurden mit dem EGFR Inhibitor Gefitinib behandelt und zeigten eine dosisabhängige Suppression der POMC

mRNA und der ACTH-Spiegel.⁸⁰ Das zeigt deutlich den potenziellen Nutzen einer medikamentösen Therapie mit EGFR als Angriffspunkt.⁸⁰

Eine weitere neue relevante Beobachtung ist die Herabregulation des CDK5 und ABL Enzym Substrats 1 (CABLES1). CABLES 1 ist ein Tumorsuppressor, der durch eine Inaktivierung mehrerer CDKs den Zellzyklus reguliert. Seine Immunreaktivität zeigt sich in über der Hälfte der untersuchten MC Tumore stark herunterreguliert und korreliert mit einer Verminderung von p27/Kip1.⁸¹ Die Funktion von CABLES1 könnte zwei der bereits bekannten veränderten molekularen Hauptmechanismen des MC verbinden. Die CDKs und Cycline aus der Gruppe der Zellzyklusregulatoren und den EGFR Signalweg.⁸²

Weitere mögliche Auslöser für die Tumorentstehung werden u.a. in einer Fehlregulation von intrazellulären Signalkaskaden⁸³, in einer Fehlexpression verschiedener Entwicklungsfaktoren^{84,85}, sowie in den nicht kodierenden RNA Transkripts, den microRNAs⁸⁶ vermutet. Auch Zytokine und ihre Rezeptoren, wie z.B. das Interleukin 6 und der Leukaemia Inhibitory Factor stimulieren die ACTH Sekretion sowie die Genexpression von POMC in corticotropen Zellkulturen und könnten somit einen möglichen Effekt auf die Tumorprogression haben.⁸⁷⁻⁹⁰

1.3.6.2 POMC Regulation

Die Transkription von POMC wird durch eine Stimulation des Hypothalamus mittels CRH und Vasopressin, einem Arginin Vasopressin-Rezeptor Agonist, getriggert.⁹¹ In corticotropen Tumoren konnte sich eine erhöhte Expression der verschiedenen AVPR sowie des CRHR1 demonstrieren lassen.^{92,93} Corticotrope Tumore exprimieren AVPR1a (oder V1R), AVPR1b (oder V3R) und AVPR2 (oder V2R). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass AVPR1b die größte Rolle unter den Rezeptoren hinsichtlich der ACTH-Stimulation spielt und hohe Expressionen demnach eine Schlüsselrolle in der Überproduktion von ACTH spielen könnten.⁹⁴ Diese Erkenntnis könnte spezifische VR1b Antagonisten wie SSR149415 möglicherweise nützlich in der Therapie von MC machen.⁹⁵ Die Ursache der erhöhten Expression ist jedoch bisher unklar und es konnten keine Mutationen in dem für AVPR1b kodierenden Gen gefunden werden.^{96,97}

Die ACTH Synthese ist neben CRH und Vasopressin auch durch eine ACTHR Rückkopplung mittels ACTH reguliert. ACTHR zeigt sich in 70% der corticotropen

Adenome herabreguliert und der Verlust der Expression könnte demnach eine Rolle hinsichtlich der Resistenz gegen das Feedback der hypothalamisch-hypophysären Achse spielen. Interessanterweise ergaben jedoch diagnostische präoperative ACTH-Messungen einen niedrigeren ACTH Spiegel in ACTHR positiven Adenomen als in solchen mit herabreguliertem ACTHR. Da es keine bisher entdeckten Gendefekte gibt, wurde angenommen, dass die Herabregulation von ACTHR bei MC vielmehr eine Konsequenz der Erkrankung ist als die eigentliche Ursache.⁹⁸

Die POMC Regulation ist weiterhin durch verschiedene Transkriptionsfaktoren bedingt zu denen als nennenswertes Beispiel der Transkriptionsfaktor Nuclear Testicular Orphan-Rezeptor 4 (TR4) gilt, welcher in der gesunden Hypophyse fast ausschließlich im Zytosol der corticotropen Zellen exprimiert ist. In ACTH-sezernierenden Adenomen wird er jedoch auch gehäuft im Zellkern beobachtet. TR4 bindet an den POMC Promotor, stimuliert seine Transkription und seine Überexpression in corticotropen Adenomen zeigte *in vitro* eine dosisabhängige erhöhte POMC Transkription und ACTH Sekretion. *In vivo* konnte ein positiver Einfluss der TR4 Expression auf das Tumorwachstum beobachtet werden.⁹⁹ TR4 könnte daher als interessantes Angriffsziel für die pharmakologische Therapiekontrolle des MC dienen. TR4 spielt durch seine Interaktion mit dem GR zudem eine Rolle in der Glukokortikoid-induzierten POMC Suppression. Es konnte gezeigt werden, dass die negative Regulation des GR auf die POMC Transkription und ACTH Sekretion durch eine Interaktion mit TR4 überwunden werden konnte, was darauf hinweisen lässt, dass TR4 die Resistenz gegen das negative glukokortikoide Feedback fördert.¹⁰⁰

1.3.6.3 Glukokortikoidresistenz

Eine bekannte Eigenschaft der corticotropen Tumore ist die Aufhebung des inhibitorischen Feedbacks der Glukokortikoide auf die hypothalamisch-hypophysäre Achse. Die molekularen Ursachen, die zu der Resistenz gegen Glukokortikoide sowie zum Tumorwachstum führen, sind jedoch noch weitestgehend ungeklärt. Eine Studie, die in corticotropen Adenomen nach möglichen Mutationen und Polymorphismen des GR suchte, konnte zeigen, dass genetische Veränderungen in dem für den GR kodierenden Gen NR3C1 sehr

selten sind und es unwahrscheinlich ist, dass diese zur einer Glukokortikoidresistenz führen. Allerdings könnten Polymorphismen im NR3C1 Gen für einen selektiven Vorteil in der Tumorgenese verantwortlich sein.^{101,102}

Ein deregulierter Cortisol-Metabolismus könnte ebenfalls eine Rolle in der Resistenzbildung spielen. Eine erhöhte Expression des Isoenzym Typ 2 der 11- β -Dehydrogenase in corticotropen Adenomen könnte durch eine vermehrte Inaktivierung von Cortisol zu Cortison zu einem unzureichenden negativen Feedback beitragen.^{103, 104}

Ein weiterer Erklärungsansatz für die Unempfindlichkeit des negativen Glukokortikoid-Feedbacks könnte die deutlich verminderte Expression des Brahma-Related-Gen 1 (Brg1) und der Histon-Deacetylase 2 (HDAC2) sein, welche von essenzieller Bedeutung für die transkriptionelle GR-gesteuerte Suppression von POMC sind.¹⁰⁵ Durch ihre Abwesenheit verliert der GR die Fähigkeit die POMC Transkription zu unterdrücken und es resultiert eine erhöhte POMC Expression und eine Resistenz gegen Glukokortikoide.¹⁰⁶

Auch Chaperone spielen in der Transkriptions-Aktivierung des GR eine Rolle. Das 90 Kilodalton Hitzeschockprotein (HSP90) ist verantwortlich für die Faltung und Aktivierung des GR.^{107,108} Aktuelle Studien konnte eine Überexpression von Isoformen von HSP90 in corticotropen Tumoren zeigen, welche die Glukokortikoide unfähig macht, die POMC Transkription zu unterdrücken.^{109,110} Der C-Terminale HSP90 Inhibitor Silibinin macht die Abspaltung des GR von HSP90 möglich und es zeigte sich *in vitro* und *in vivo* eine Wiederherstellung der Transkriptions-Aktivierung und eine Verbesserung der Glukokortikoid-Sensitivität. Diese Ergebnisse suggerieren, dass ein MC, dessen Pathogenese seine Ursache in der Überexpression von Hitzeschockproteinen hat, pharmakologisch mittels HSP90 Inhibitor bewältigt werden könnte.¹¹¹

1.3.6.4 Genetische Syndrome

MC wird nur selten in dem Kontext von genetischen Syndromen beschrieben. Weniger als 5% aller MCs entstehen auf dem Boden von familiären Adenomen im Rahmen von verschiedenen hereditären endokrinen Syndromen. Die Mehrheit der corticotropen Hypophysenadenome entsteht sporadisch, die meisten

Patienten weisen keine Krankheitsgeschichte in der Familie auf.¹¹²

Keimbahnmutationen, die familiäre endokrine Syndrome verursachen, wirken sich unterschiedlich auf verschiedene Angriffspunkte aus und können nicht den Großteil der corticotropen Adenome oder den gemeinsamen Mechanismus der Tumorgenese erklären.^{86,113} Das lässt eher auf eine erworbene genetische Komponente als Ursache des MC schließen.

1.3.6.5 Somatische Mutationen

Corticotrope Adenome sind in ihrem Ursprung meist monoklonal, sie entwickeln sich aus einer einzelnen Zelle, die sich multipliziert und das Tumorwachstum verursacht. Das weist stark auf einen einzelnen somatischen Gendefekt als Mechanismus der Pathogenese des MC hin.¹¹³

Mutationen in bekannten Proto-Onkogenen wie KRAS, RET, PTTG und c-MYC und in Tumorsuppressor-Genen wie RB1 sind kaum beschrieben.¹¹⁴ Auch Mutationen im p53 Gen wurden bis primär nur in atypischen ACTH-sezernierenden Adenomen und in Karzinomen gefunden.^{115,116} Sbiera et al. zeigten jedoch kürzlich, dass pathogene Varianten des TP53 Gens häufiger (12,5%) in MC Tumoren vorzukommen scheinen, als bisher angenommen.^{117,118} Durch das Whole-Exome-Sequencing eröffneten sich neue Möglichkeiten hinsichtlich der Identifikation einzelner Gendefekte in Hypophysenadenomen.

Ein Meilenstein war 2015 die Entdeckung der somatischen Mutation der Ubiquitin-spezifischen-Peptidase 8 (USP8) in 30-60% der ACTH-sezernierenden Hypophysenadenomen (siehe Kapitel 1.4).^{119,120}

Neben der USP8 Mutation wurden außerdem fünf Jahre später wiederkehrende Mutationen in dem Deubiquitinase Gen USP48 in 13,3% der untersuchten corticotropen Adenomen mit Wildtyp (WT) USP8 entdeckt.^{118,121} Sbiera et al. konnten demonstrieren, dass durch die USP48 Mutation, die katalytische Aktivität und somit die Deubiquitinierung der Substrate von USP48 wie die des Histon 2a und die des Zink Finger Proteins Glioma-Associated Oncogene 1 (Gli1) erhöht wird, sowie der stimulierende Effekt von CRH verstärkt wird. Gli1 spielt eine Rolle in der erhöhten ACTH Produktion während durch die Deubiquitinierung von H2A eine deregulierte DNA-Reparatur resultiert.¹¹⁷

Sbiera et al. zeigten zudem in einer Meta-Analyse 2019, dass neben den

Hotspotmutationen USP8 und USP48 weitere multiple wiederkehrende Mutationen identifiziert werden konnten. Hier fanden sich verschiedene inaktivierende somatische Mutationen des TP53 Gens, die somatische Hotspotmutation p.Val600Gln im BRAF Gen in 7% der analysierten Tumore, 6 verschiedene somatische Mutationen in 6,2% der Tumore im NR3C1 Gen sowie Mutationen im HCFC1 Gen in 3,1% der untersuchten Adenome.¹¹⁸

Kürzlich wurde zudem eine Funktionsverlust-Mutation des CABLES1 Gen beschrieben. Das mutierte CABLES 1 Protein verliert durch die Mutation seine inhibitorische Wirkung auf das corticotrope Zellwachstum und führte bei den betroffenen Patienten zu Makroadenomen.^{81,82,122}

Insgesamt sind die verschiedenen somatischen Mutationen in über 70% ursächlich für die Entstehung der corticotropen Adenome.¹¹⁸

1.4 Ubiquitin-spezifische-Peptidase 8

1.4.1 Prävalenz und Genotyp/ Phänotyp Korrelation

Eine 2019 durchgeführte Meta-Analyse konnte eine Inzidenz der USP8 Mutation von 36,5% (221/605) in corticotropen Adenomen feststellen.¹¹⁸

Eine Kooperation aus Deutschland und Japan sequenzierte 2015 eine kleine Gruppe von zehn corticotropen Adenomen, in der sich eine heterozygote somatische Mutation im USP8 Gen in vier der Adenome zeigte. Die Mutation befand sich in einer eingegrenzten Region in dem Gen, das die mRNA für die Ubiquitin-spezifische-Peptidase 8 transkribiert. Alle Mutationen gruppierten sich zwischen den Aminosäuren 713-720.¹²⁰ Insgesamt wurde in dieser Studie nach Sequenzierung von weiteren Hypophysenadenomen die USP8 Mutation mit einer Prävalenz von 35% in corticotropen Adenomen beschrieben.¹²⁰

Diese initial beschriebene Prävalenz von 35% wurde 2015 nachfolgend in einer multizentrischen Studie mit großen MC Kohorten (Europa/ USA/ Brasilien) und einer Prävalenz von 36% bestätigt. Die Studie zeigte, dass die Prävalenz bei Erwachsenen höher als bei Kindern (41 vs. 17%) und bei Frauen höher als bei Männern (43 vs. 17%) ist. Erwachsene Patienten mit einer USP8 Mutation wurden zu einem früheren Zeitpunkt (36 vs. 44 Jahre) mit MC diagnostiziert als solche vom WT.¹²³

Perez-Rivas et al. konnten zudem zeigen, dass Patienten mit Adenomen vom WT häufiger eine postoperative adrenale Insuffizienz entwickelten als die mutierten Tumore (71 vs. 49%). >50% der mutierten Tumore hatten hier eine Größe zwischen 8-16 mm.¹²³

Eine weitere Studie von Ma et al. entdeckte ebenfalls 2015 in acht von zwölf corticotropen Adenomen die Mutation im 14-3-3 Bindungs-Motiv.¹¹⁹

Die anschließende gezielte Sequenzierung zeigte eine Prävalenz von 62% und war weitaus höher als die der Kohorte aus Europa/USA/ Brasilien. Frauen waren hier ebenfalls häufiger betroffen als Männer (68% vs. 38%). Ma et al. beschrieben ebenfalls ein niedrigeres Alter bei der Erstdiagnose (ED) bei den mutierten Tumoren im Vergleich zu den WT Tumoren.¹¹⁹ Die mutierten Tumore waren hier interessanterweise kleiner als die WT Adenome und nur 13% waren invasiv wachsend. 41% der untersuchten WT Tumore waren sehr groß und zeigten eine Invasion in den parasellären Raum. Jedoch zeigten die Patienten mit USP8 mutierten Tumoren ähnliche Werte für den Plasma ACTH-Spiegel, das Mitternachts Serum Cortisol und das 24 Stunden Urincortisol. Ein Follow-Up von einem Monat bis neun Jahren von Patienten mit initialer Remission konnte keine Relation hinsichtlich der Rezidivrate zum USP8 Mutationsstatus demonstrieren.¹¹⁹

2016 konnten Hayashi et al. ebenfalls kleinere Adenome bei den mutierten Patienten beobachten. Der maximale Tumordiameter lag bei den mutierten Tumoren bei einem Mittelwert von 9,1 mm während er bei den WT Tumoren bei 16,3 mm lag. Das könnte mit der ebenfalls von ihnen beschriebenen Remissionsrate nach der Operation von 95,2% bei mutierten Tumoren und nur 53,8% bei WT Tumoren einhergehen. Frauen waren auch in dieser Kohorte weitaus häufiger von der USP8 Mutation betroffen.

2018 zeigten Ballmann et al. in einer weiteren Studie eine geringere Mutationsfrequenz (21,4%) in einer Kohorte mit 42 Patienten. Die mutierten Tumore waren im Durchschnitt 11,4 mm groß und die Patienten im Durchschnitt 43,9 Jahre alt.¹²⁴

Alle beschriebenen USP8 Mutationen sind somatische, heterozygote Single-point-Mutationen. USP8 ist in allen Studien ausschließlich in ACTH-

sezernierenden Adenomen, einschließlich des Nelson Tumors, mutiert und zeigt sich nicht mutiert in inaktiven Tumoren, Prolaktinomen, und somatotropen Tumoren. Das demonstriert die hohe Spezifität und Wichtigkeit dieser USP8 Mutation.¹²⁵ In einer großen Kohorte mit Hunden mit MC wurde kein mutiertes USP8 gefunden, was zudem eine speziespezifische Mutation vermuten lässt.¹²⁶

1.4.2 Funktion

USP8 ist auf dem Chromosom 15q21.2 lokalisiert und kodiert eine Deubiquitinase (DUB), ein Mitglied der Ubiquitin-spezifischen Proteasen (USP) Familie.¹²⁷ Die Ubiquitinierung ist eine reversible posttranslationale Modifikation von Proteinen und bestimmt dessen Funktion und Expression in eukaryoten Zellen. Proteine, eingeschlossen Zelloberflächenrezeptoren, werden während der Ubiquitinierung mit einer E3 Ubiquitin Ligase für die nachfolgende Degradierung in den Lysosomen markiert und im Proteasom abgebaut.¹²⁸

Die E3 Ubiquitinierung wird durch DUBs antagonisiert, die die konjugierten Ubiquitin Moleküle von ihren Zielproteinen entfernen und somit die Proteine vor ihrem Abbau schützt. USP8 ist im Transport verschiedener Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) und in der Endosom-Lysosom Funktion involviert, was zu einem Recycling der Rezeptoren an der Zelloberfläche führt (Abb.3).^{129–132}

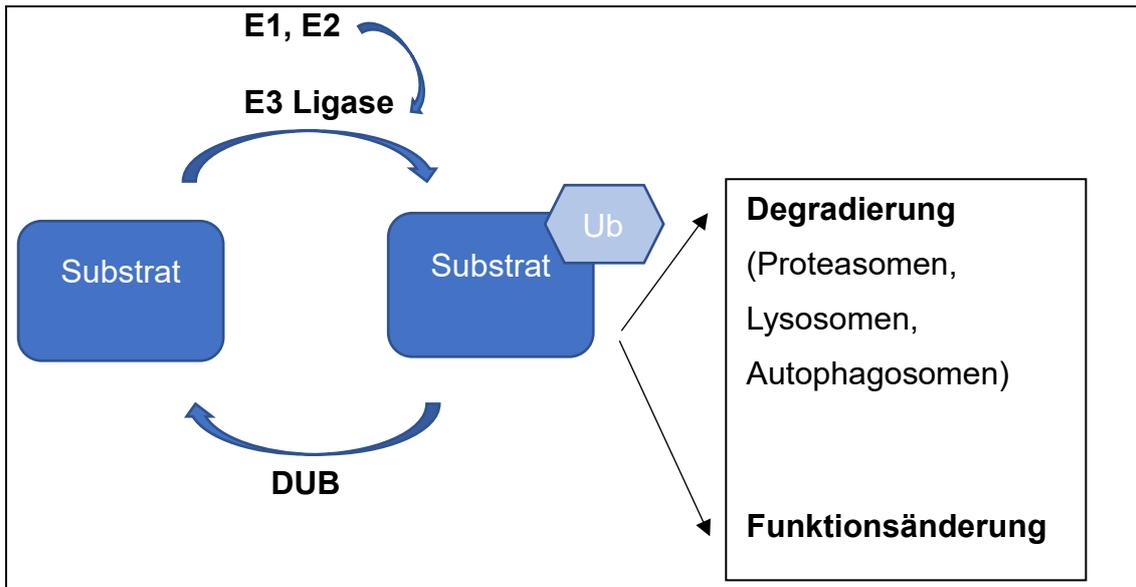


Abb. 3: Ubiquitinierung und Deubiquitinierung

Die Ubiquitinierung besteht aus drei Prozessen: Aktivierung, Konjugierung und Ligierung durchgeführt durch Ubiquitin-aktivierende Enzyme (E1), Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2) und schließlich Ubiquitin-Ligasen Enzyme (E3). Bei der Ubiquitinierung werden die Substrate mittels E3 Ubiquitin Ligasen für die anschließende Degradierung in Proteasomen, Lysosomen und Autophagosomen markiert. Zudem bestimmt die Ubiquitinierung von Substraten dessen Funktion und Expression in eukaryoten Zellen. Bei der Deubiquitinierung (DUB) wird die E3 Ubiquitinierung durch DUBs antagonisiert, indem sie die konjugierten Ubiquitin Moleküle wieder von ihren Zielproteinen entfernen und sie damit vor ihrem Abbau schützen.¹³³

1.4.3 Aktivierende USP8 Mutation

Bisher konnten 26 verschiedene USP8 Mutationen, die sich nahezu alle in der 14-3-3 Hotspot -Region von USP8 (94,5% der Fälle Ser718 und Pro720) sammeln, identifiziert werden. Nur zwei einzelne pathogene Varianten, die bisher nur jeweils in einem Einzelfall detektiert werden konnten, (p.Asp721Asn und p.Thr735Ile) befanden sich außerhalb der 14-3-3 Bindungsstelle.

Die Mutationen in Ser718 und Pro720 haben von allen analysierten Mutationen die stärksten Effekte auf die 14-3-3 Bindung sowie die Deubiquitinierung.¹¹⁸

14-3-3 Proteine sind regulatorische Proteine, die an bekannte Erkennungsmotive binden und somit die Proteinaktivität und Interaktionen modifizieren. Das 14-3-3 Protein bindet am 14-3-3 Bindungsmotiv an USP8 und blockiert die Zugänglichkeit für Proteasen und verhindert die vollständige Aktivierung.¹¹⁷ Die

USP8 Mutation in dem Hotspot verhindert diese Bindung des 14-3-3 Proteins¹³⁴ und macht USP8 damit leichter zugänglich für die proteolytische Spaltung. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Spaltung von USP8 in Peptidfragmente erhöht ist und das USP8 Protein in zwei unterschiedlich große Fragmente, 40 und 90 Kilodalton (kDA), geschnitten wird. Das C-Terminale 40-kDA Fragment weist eine deutlich höhere DUB Aktivität auf und erhöht somit die Deubiquitinierung der Zielsubstrate (Abb.4).¹²⁰

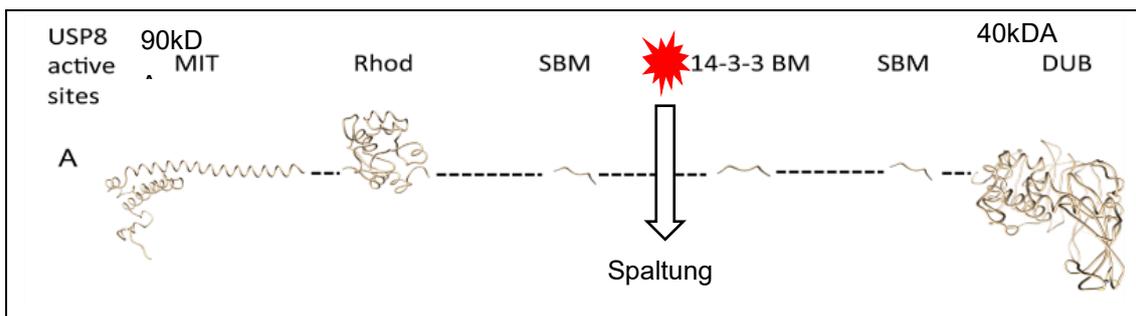


Abb. 4: (A) USP8 Protein; eingeschränkte Bindung (Pfeil) des 14-3-3- Proteins am 14-3-3 Bindungsmotiv (14-3-3 BM) führt zur erhöhten proteolytischen Spaltung von USP8 in zwei Peptidfragmente 90kDA und 40kDA *in vitro* (Sbiera et al.²²)

1.4.4 Rolle der USP8 Mutation in der Entwicklung von Morbus Cushing

Die Entdeckung der aktivierenden USP8 Mutation als Driver-Gen in der Entwicklung des MC wirft die Frage auf, welche zellulären Funktionen durch dieses Protein reguliert werden. Prinzipiell könnten alle durch UPS8 regulierten Proteine, die in MC exprimiert sind, von der Mutation betroffen sein.^{135,136}

Zwei Proteine, die an der Pathogenese des MC mit mutiertem UPS8 beteiligt sein könnten, wurden bereits identifiziert: Der Tyrosinkinase-Rezeptor EGFR und der Somatostatin-Rezeptor SSTR5.^{119,120}

Es konnte gezeigt werden, dass das mutierte USP8 durch die höhere DUB Aktivität eine signifikante Inhibierung der lysosomalen EGFR Degradierung und eine Verstärkung des EGFR-induzierten MAPK Signalwegs ERK1/EKR2 verursacht. Durch das gesteigerte Recycling von EGFR an der Zellmembran ist seine Fähigkeit EGF zu binden erhöht und führt zu einer gesteigerten POMC mRNA Expression und folglich zu einer größeren ACTH-Sekretion (Abb.5).^{119,120,123,137}

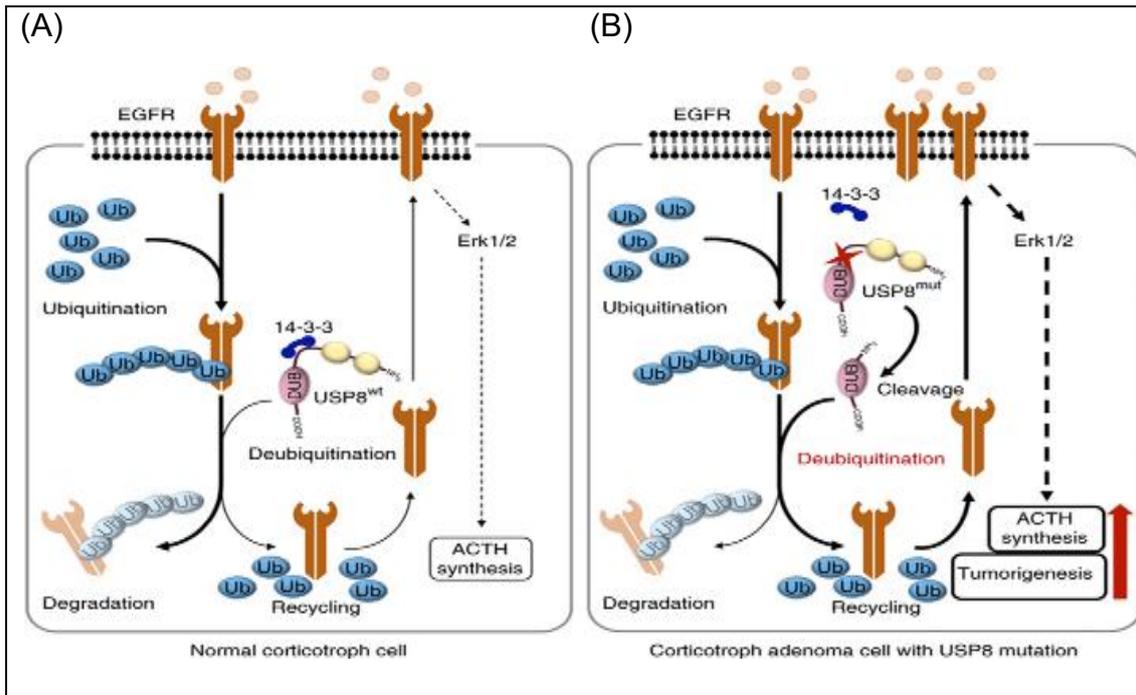


Abb. 5: Schematische Darstellung des postulierten Mechanismus durch den eine USP8 Mutation zu einer erhöhten ACTH Sekretion und Tumorgenese in corticotropen Tumoren führt / USP8 – EGFR Interaktion (Reincke et al.¹²⁰)

(A) Normale corticotrope Zelle mit uneingeschränkter 14-3-3 Bindung

(B) Corticotrope Zelle eines USP8 mutierten Adenoms: aus der eingeschränkten 14-3-3 Bindung resultiert eine verstärkte proteolytische Spaltung von USP8 (Cleavage) und daraus eine erhöhte DUB Aktivität und somit eine Inhibierung der lysosomalen EGFR Degradierung mit einem gesteigerten Recycling von EGFR an der Zellmembran. Dadurch findet eine Verstärkung des EGFR-induzierten MAPK Signalwegs ERK1/EKR2 statt und führt zu einer gesteigerten ACTH-Sekretion und Tumorgenese.

Untersuchungen in humanen corticotropen Adenomen wiesen in USP8 mutierten corticotropen Zellen im Vergleich zum WT eine höhere EGFR Expression und erhöhte POMC Spiegel auf. Durch einen USP8 Gen-Knockdown und eine Hemmung von EGFR in resezierten mutierten Tumorzellen, konnte eine Verringerung der ACTH Sekretion beobachtet werden.¹¹⁹

Hayashi et al. konnten jedoch in einer nachfolgenden Studie in einigen USP8 mutierten Tumoren, die einen erhöhten mRNA Spiegel von POMC aufzeigten, keine aktivierte EGFR Signaltransduktion beobachten. Die EGFR Expression war hier nicht abhängig vom Mutationsstatus.¹³⁸ 2018 ergab eine weitere Studie ebenfalls einen niedrigeren Prozentsatz der EGFR positiven USP8 mutierten Tumore im Vergleich zu anderen publizierten Kohorten.¹²⁴ Daher ist

anzunehmen, dass nicht ausschließlich EGFR für die erhöhte ACTH Sekretion in USP8 mutierten corticotropen Hypophysenadenomen verantwortlich ist. Zudem ist eine erhöhte EGFR Expression charakteristisch für eine Vielzahl von Malignomen, wohingegen Mutationen der 14-3-3 Bindungsstelle hochspezifisch für MC sind und bisher in keiner anderen Neoplasie entdeckt worden sind.¹³⁹

Kürzlich wurde entdeckt, dass ein USP8 Inhibitor in einer corticotropen Tumorzelle fähig ist, die Expression von EGFR und der Tyrosin-Proteinkinase MET sowie die ACTH-Sekretion zu reduzieren und die Apoptose zu fördern. Die Inhibition von USP8 könnte somit eine effektive Strategie in der Behandlung von MC sein.¹⁴⁰ Die Ergebnisse einer weiteren Studie legten kürzlich zum ersten Mal nahe, dass in den corticotropen Zellen einer Ratte POMC direkt durch die Ubiquitinierung abgebaut wird. Eine Behandlung mit dem Polyubiquitinierungs-Inhibitor K48R erhöhte die ACTH Produktion. Ob das auch in humanen corticotropen Zellen der Fall ist muss zum gegebenen Zeitpunkt noch untersucht werden.¹⁴¹

Vieles deutet darauf hin, dass neben den bereits entdeckten Substraten noch weitere zelluläre Funktionen durch USP8 reguliert werden.

In vitro zeigte sich, dass das 40kDA Fragment des mutierten USP8, welches eine hohe DUB Aktivität aufweist, keinen spezifischen Anker hat. Daher könnte es theoretisch jedes ubiquitinierte Substrat deubiquitiniieren. Da es jedoch unzählige Proteine in einer Zelle gibt, die durch die Ubiquitinierung reguliert werden, würde solch ein Mechanismus in einem weitaus schlimmeren Phänotyp resultieren. ACTH-sezernierende Tumore sind jedoch gut differenziert und in der Regel nicht aggressiv. Weiterhin werden USP8 mutierte Tumore mit erhöhten Proteinexpressionen im Nukleus assoziiert, was auf eine spezifische Assoziation von USP8 mit zellulären Proteinen hinweist.²²

Die Entdeckung der USP8 Mutationen ist ein wichtiger Meilenstein in der Ergründung der Pathogenese von corticotropen Adenomen, doch ist die genaue Beziehung zwischen USP8 Mutationen und den bereits beschriebenen Abnormalitäten bisher nicht verstanden. Basierend auf den oben genannten Informationen, wird die Hypothese aufgestellt, dass USP8 Mutationen in corticotropen Adenomen zu feinen Veränderungen der Aktivität führen und

Signalwege, die bereits in ACTH-sezernierenden Zellen vorhanden sind, beeinflusst werden (Abb. 6).

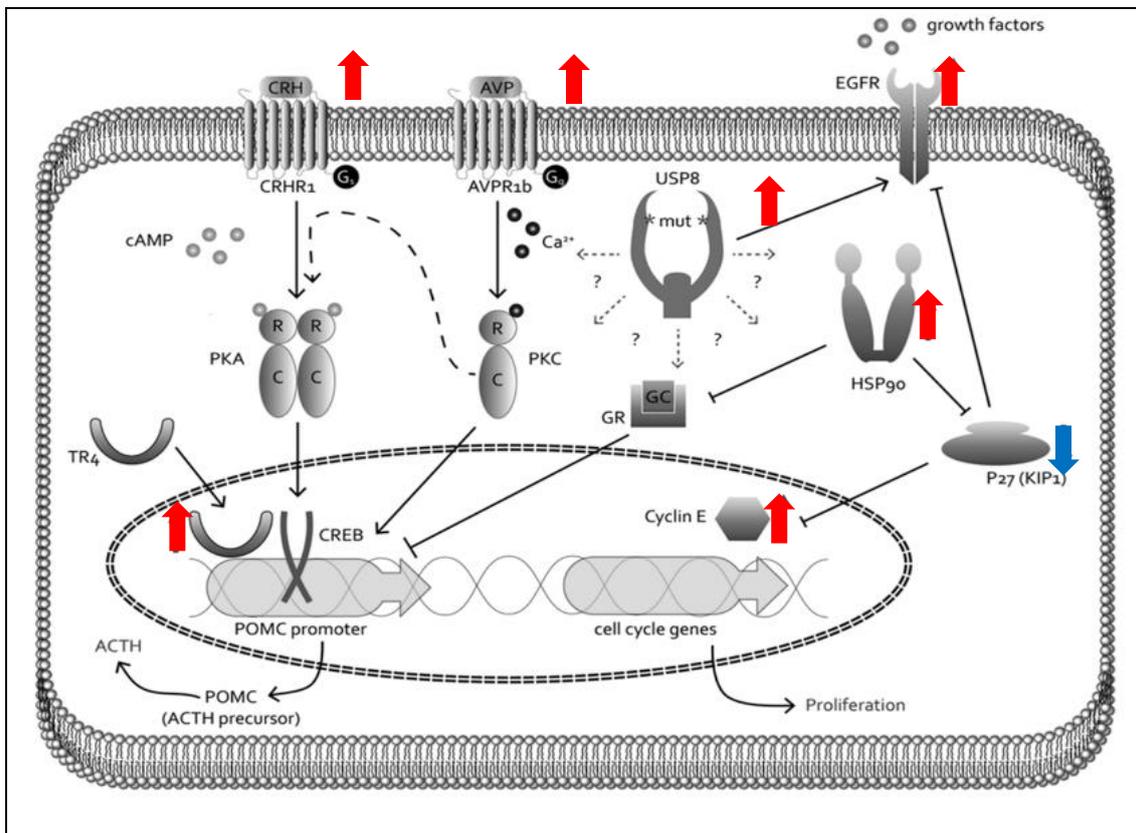


Abb. 6: Normale Wege in einer corticotropen Zelle sowie Darstellung deregulierter Proteine (\uparrow_{rot} = überexprimiert; \downarrow_{blau} = herabreguliert) als mögliche Angriffspunkte für USP8 (modifiziert nach Sbiera et al. 2015)

Demnach müssten sich die Proteinexpressionen in USP8 mutierten Adenomen von denen in Adenomen vom WT USP8 unterscheiden. Neben den bereits bekannten deregulierten Proteinen in corticotropen Adenomen, die eine mögliche Rolle spielen könnten (Abb. 6), sind auch Proteine der cAMP/ Proteinkinase A (PKA) Signaltransduktion in Betracht zu ziehen.

In einer normalen ACTH-sezernierenden Zelle, induziert die Bindung von CRH an CRHR1 die Freisetzung von cAMP und somit die Aktivierung der PKA. Diese wiederum phosphoryliert CREB im Nukleus und führt schließlich zur Induzierung der POMC Expression und ACTH-Sekretion.¹⁴² Von Interesse ist hier die Expression des Transkriptionsfaktors cAMP Response Element Binding Protein (CREB), seine aktivierte Form phosphoryliertes-CREB (pCREB) sowie die PKA,

welche CREB phosphoryliert; siehe Tabelle (Tab.) 1.

Tab. 1: Mögliche Zielproteine von USP8

Protein	Funktion	↑ oder ↓ in corticotropen Tumoren
USP8	Deubiquitinase, verhindert Substratdegradierung durch Proteasomen	↑
EGFR	Membranständige Rezeptor-Tyrosinkinase: stimuliert Zellwachstum, verhindert Apoptose	↑
P27/Kip1	CDK-Inhibitor, Zellzyklusregulator: kontrolliert Progression des Zellzyklus in G1-Phase	↓
Cyclin E	Zellzyklusregulator, bildet Komplexe mit CDKs und aktiviert deren Kinasefunktion	↑
CRHR1	G-Protein gekoppelter Oberflächenrezeptor: initiiert mittels cAMP und Proteinkinase A die intrazelluläre Signalkaskade und ACTH Sekretion	↑
AVPR1b	G-Protein gekoppelter Oberflächenrezeptor: initiiert mittels Phosphatidylinositolcalcium ein Second-messenger System und die ACTH-Sekretion	↑
TR4	Nukleärer Transkriptions-Faktor	↑
HSP90	Chaperon: vermittelt Faltung und Aktivierung des GR	↑
CREB	Transkriptionsfaktor	
pCREB	Phosphoryliertes/ aktives CREB	
PKA	Proteinkinase, phosphoryliert CREB	

↑ = überexprimiert; ↓ = herabreguliert

1.5 Fragestellung

Das Ziel dieser Studie ist es, mögliche klinischen Zusammenhänge bei Patienten mit USP8 mutierten Tumoren zu untersuchen sowie Zielproteine von USP8, die an der Tumorgenese des MC beteiligt sein könnten, zu identifizieren. Konkrete Fragestellungen hierbei sind:

1. Gibt es Zusammenhänge zwischen dem USP8 Mutationsstatus und den klinischen Daten von Patienten mit MC?
2. Gibt es einen Unterschied in der Expression von bereits mit MC assoziierten deregulierten Proteinen (EGFR, p27/ Kip1, Cyclin E, CRHR1, AVPR1b, TR4, HSP90) in corticotropen USP8 mutierten Tumoren im Vergleich zu USP8 WT Tumoren sowie im Vergleich zu anderen Hypophysenadenomen (inaktiv, somatotrop) und gesunden Hypophysen?
3. Gibt es eine veränderte Expression der Proteine der cAMP Proteinkinase A Signaltransduktion (CREB, pCREB und PKA) in corticotropen USP8 mutierten Tumoren im Vergleich zu USP8 WT Tumoren sowie im Vergleich zu anderen Hypophysenadenomen (inaktiv, somatotrop) und gesunden Hypophysen?

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv für die Analyse der klinischen Daten

Für die Analyse der klinischen Daten wurden in dieser Studie Patienten mit corticotropen Hypophysenadenomen eingeschlossen, die sich zwischen 1997 und 2016 einer transsphenoidalen Operation in der Uniklinik Hamburg, der Uniklinik Würzburg oder der Uniklinik Erlangen unterzogen haben und bei denen der USP8 Mutationsstatus bestimmt worden war. Bei allen Patienten lag bereits eine histopathologische Bestätigung eines ACTH-immunreaktiven Hypophysenadenoms vor. Die Diagnose des M. Cushing wurde aufgrund von etablierten klinischen, biochemischen und morphologischen Kriterien⁴² durch die behandelnden Ärzte gestellt.

Die Daten wurden von 125 unterschiedlichen Patienten mit 127 corticotropen Hypophysenadenomen ausgewertet (Abb. 7). 34 davon zeigten eine Mutation im USP8 Gen (24 vom Uniklinikum Hamburg Eppendorf und 10 aus dem Uniklinikum Würzburg). 93 der Hypophysenadenome waren vom USP8 WT (56 vom Uniklinikum Hamburg Eppendorf, 15 aus dem Uniklinikum Würzburg und 22 aus dem Uniklinikum Erlangen).

Die klinischen Parameter der Patienten wurden retrospektiv durch Aktenrecherche in der Universitätsklinik Würzburg und Hamburg Eppendorf 2018 durch mich erfasst. Für die 22 Patienten des Uniklinikums Erlangen lagen bereits erhobene Daten aus der Neuropathologie zum Geschlecht der Patienten sowie zur Tumorgöße vor.

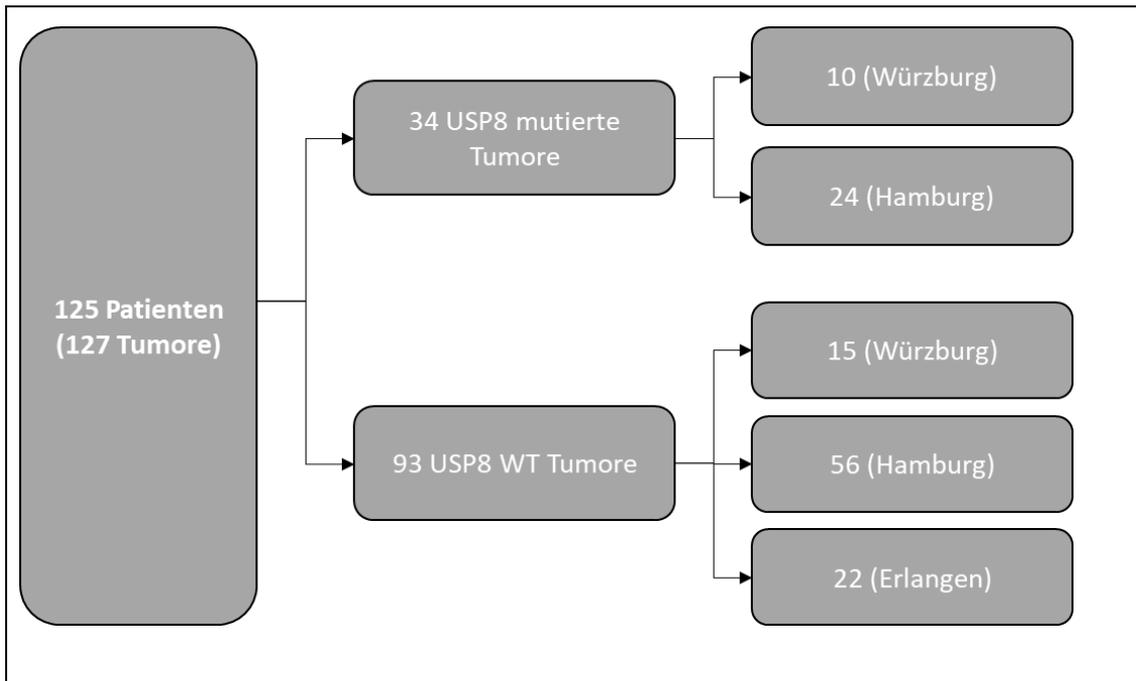


Abb. 7: gesamtes Patientenkollektiv für die Analyse der klinischen Daten

Es wurden klinische Daten des Patienten (Alter, Geschlecht, Alter bei ED MC, BMI), die präoperativen Hormonspiegel, die Daten zur OP (Resektionsgrad, Invasivität) sowie Tumorcharakteristika (Größe, USP8 Mutationsstatus) und das Auftreten von Rezidiven durch die elektronische und teilweise bereits archivierte schriftliche Aktenrecherche erfasst.

Bei der Auswertung der Rezidive wurden Patienten mit Tumoren eingeschlossen, dessen Tumorschnitt in der Neuropathologie mindestens der eines Zweitumors war, sowie Patienten mit Tumoren die laut klinischen Daten in retrospektiv erfassten Nachfolgeuntersuchungen in der Uniklinik Hamburg in dem Zeitraum von 1997 bis 2018 ein Rezidiv aufwiesen.

Um die Tumorgöße zwischen den beiden Patientengruppen zu vergleichen, wurde der maximale Diameter in mm für die Auswertung genutzt. Wurde die Tumorgöße als linsengroß, erbsengroß oder bohngroß von den Neuropathologen beschrieben, so wurden diese in eine bestimmte mm Zahl umgerechnet (Tab. 2).

Tab. 2: Umrechnung der Tumorgrößen in mm

Vergleich	Größe in mm
Linsengroß	6
Erbsengroß	7,5
Bohnengroß	20

Alle Patienten gaben ihre informierte Zustimmung und die Studie wurde durch die Ethikkommissionen der Universität Würzburg (# 85/12) und der Ärztekammer in Hamburg genehmigt.

2.2 Probenkollektiv für die immunhistochemische Untersuchung

Insgesamt wurden Proben von 111 Hypophysenadenomen und 5 normalen Hypophysen immunhistochemisch gefärbt und ausgewertet (Abb. 8).

Von dem oben genannten Patientenkollektiv der ACTH-produzierenden Tumoren für die Auswertung der klinischen Daten lagen uns insgesamt Proben von 78 dieser Tumore zur immunhistochemischen Färbung vor. Hiervon wurden 55 Schnitte der corticotropen Hypophysenadenome (48 WT, 7 mutiert) der Universität Hamburg auf einem Tissue Micro Array zusammengefügt. Es konnten nicht alle initial vorhandenen Proben von Patienten mit Antikörpern gefärbt werden, da durch den Anschnitt des TMAs bedingt deutlich weniger Proben auf dem TMA zu finden waren als in der ursprünglichen Kohorte. Aus diesem Grund unterscheiden sich auch die hier aufgeführten Zahlen leicht von den Zahlen in der inzwischen veröffentlichten Arbeit.¹⁴³ Weitere 23 Tumore (13 WT, 10 mutiert) lagen uns auf ganzen Objektträgern der Universität Würzburg vor.

Insgesamt sind 61 corticotrope Adenome vom WT und 17 USP8 mutierte Tumore untersucht und verglichen worden. Als Vergleichsgruppen wurden zudem aus Würzburg 14 somatotrope und 19 inaktive Adenome gefärbt und ausgewertet.

Zusätzlich wurden fünf normale Hypophysen (n=5) aus Autopsien des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Würzburg genutzt.

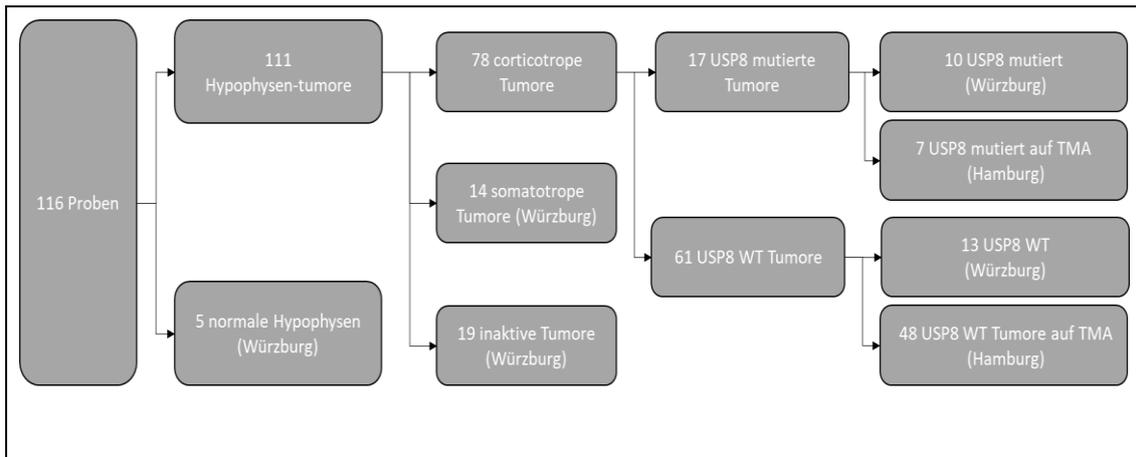


Abb. 8: Gesamtes Probenkollektiv für die immunhistochemische Färbung

2.2.1 Tissue Micro Arrays

Der Tissue Micro Array (TMA) wurde durch die Pathologie der Universität Hamburg erstellt. Um ein repräsentatives Areal mit einer gut erhaltenen Morphologie von jedem einzelnen Adenom für den Tissue Micro Array zu wählen, wurden Haematoxylin und Eosin gefärbte Gewebe von einem erfahrenen Pathologen (Wolfgang Saeger, Pathologie des Universitätsklinikums Eppendorf Hamburg) reevaluiert und das entsprechende Gebiet für die Gewebsstanze markiert. Es wurden zwei Stücke mit einem Durchmesser von 0,6 mm aus jedem Gewebsblock gestanzt und in einem neuen Block angeordnet. 2µm dicke Scheiben der Blöcke wurden auf silanisierte Objektträger geschnitten und bei Raumtemperatur mehrere Tage zum Trocknen gelagert, um den Gewebsverlust zu minimieren.

2.3 Chromogene Immunhistochemie

2.3.1 Entparaffinierung, Antigendemaskierung und Hemmung der endogenen Peroxidase

Bei der Entparaffinierung wurde das Gewebe von Paraffin befreit und somit für die Antikörper frei zugänglich gemacht. Die Gewebsschnitte der ganzen Objektträger und des Tissue Microarray Objektträger wurden dafür zweimal für jeweils 12 Minuten in einem Xylolbad entparaffiniert und anschließend in einer

absteigenden Alkoholreihe rehydriert: 100% EtOH; 90% EtOH, 80% EtOH und 70% EtOH für jeweils 5 Minuten. Anschließend erfolgte 5-mal hintereinander eine Spülung mit destilliertem Wasser (dH₂O).

Die Antigen-Demaskierung erfolgte mit einem Natriumzitat-Puffer mit einem pH-Wert von 6,5 in einem Dampfdrucktopf für 13 Minuten, um den Antikörpern ihre zellulären Antigene zugänglich zu machen (Tab. 3).

Nachdem die Proben abgekühlt waren, wurden die Präparate auf dem Objektträger mit einem Fettstift eingekreist, damit später aufgetragene Flüssigkeiten nicht herunterlaufen und gleichmäßig auf die Objektträger verteilt werden konnten.

Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurde eine Lösung von 3% H₂O₂ in Methanol auf die Objektträger aufgetragen und für 10 Minuten inkubiert.

Tab. 3: Übersicht über verwendete Substanzen und Materialien

Substanz/ Material	Firma	Zusammensetzung/Kommentar
Natriumzitat-Puffer		2,1 g in 1000 ml Aqua destilliert, pH= 6,5
H ₂ O ₂		10 ml H ₂ O ₂ 30% in 100 ml Methanol
Fettstift	Dako	
Human AB Serum		Sigma-Aldrich
PBS	Sigma	1Tablette/200 ml Aqua destilliert
Advance HRP Link Kit	Dako	Detektionssystem
DAB+ Liquid Kit	Dako	Detektionssystem
N-Universal Anti-Rabbit oder Anti-Mouse	Dako	Negativkontrolle
Saures Hämalaun nach Mayer	Sigma Aldrich	
Entellan Eindeckmittel	Merck	
Mikroskop	Zeiss Axioscope A1	
Camera MRm	Carl Zeiss AG	

2.3.2 Spezifische Färbung

Unspezifische Bindungen wurden im Anschluss mit 20% humanen AB Serum bei Raumtemperatur für eine Stunde blockiert.

Dann wurde der primäre Antikörper (Tab.4) in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) in verschiedenen angepassten Verdünnungsstufen bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert.

Tab. 4: Verwendete Antikörper

Antikörper	Wirt	Firma	Nummer	Verdünnung
USP8	Kaninchen	Sigma	HPA004869	1:500
EGFR	Kaninchen	Santa Cruz	SC-03	1:500
P27/kip1	Maus	BD	610242	1:1000
Cyclin E	Kaninchen	Santa Cruz	SC-481	1:400
CRHR1	Kaninchen	LSBio	LS- A3737/41992	1:250
AVPR1b	Kaninchen	LSBio	LS- A3737/41899	1:250
TR4	Kaninchen	Sigma	HPA006313	1:200
HSP90	Maus	ABCAM	EPR3953	1:500
CREB	Kaninchen	Cell Signaling	9197	1:500
pCREB	Kaninchen	Cell Signaling	91987	1:500
PKA	Maus	BD	610980	1:1000

2.3.3 Negativkontrollen

Um die Spezifität des Detektionssystems zu überprüfen, diente bei jeder Färbung ein Präparat, bei dem der Primärantikörper weggelassen wurde, als Negativkontrolle (Tab. 3).

2.3.4 Signalamplifikation

Um eine Signalverstärkung von primären Antikörpern, die in niedriger Konzentration vorliegen, zu erreichen, wurde eine Zweischnitt-IHC-Färbetechnik angewandt (Abb.9).

Das System beruht auf einem mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) markierten Polymer, das an sekundäre Antikörper konjugiert ist. Primär gebildete Antikörper, welche zuvor inkubiert wurden, reagieren deutlich mit dem markierten sekundären Antikörper.¹⁴⁴ Zur Detektion wurden die Proben zunächst für 20 Minuten mit dem Advance HRP Link Kit mit Meerrettich-Peroxidase inkubiert, um anschließend die Signalamplifikation mit dem DAB+ Liquid Kit mittels 3,3'-Diaminobenzidin und H₂O₂ für 10 Minuten zu erreichen (Tab. 3).

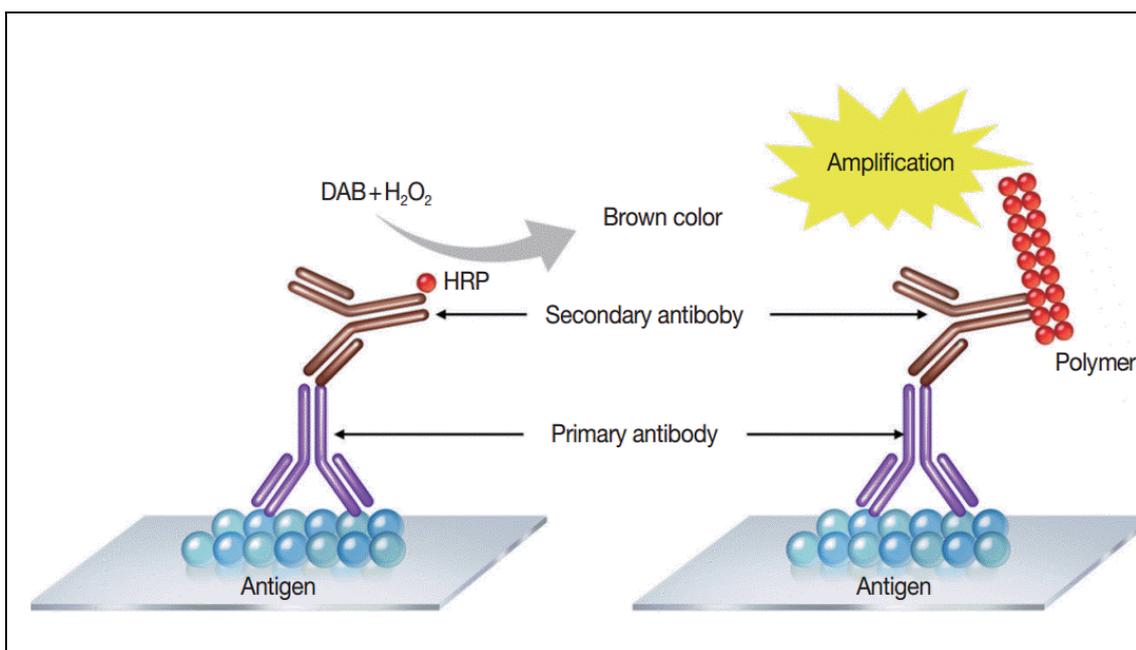


Abb. 9: Polymerische Signalamplifikation mittels DAB, H₂O₂ und HRP (So-Woon Kim et al.¹⁴⁴)

Der primäre Antikörper (Primary antibody) bindet an den gegen ihn gerichteten sekundären Antikörper (Secondary antibody), der an den Meerrettich-Peroxidase (HRP) markierten Polymer gekoppelt ist. Mittels Daminbenzidine (DAB) und H₂O₂ entsteht durch eine Enzym-Substrat-Reaktion die Farbentstehung (Brown color) und die Amplifikation des primären Antikörpers.

2.3.5 Gegenfärbung und Deckelung

Um die nachfolgende histologische Beurteilung zu vereinfachen, wurden die Nuklei mit Mayer's Hämalaunlösung gegengefärbt. Hierzu wurden die Schnitte zunächst für 2 Minuten in Hämalaun inkubiert. Um die blaue Färbung zu erhalten, muss anschließend ein pH-Wert von größer 7 eingestellt werden, was durch intensives Spülen für 5 Minuten in fließendem Leitungswasser erreicht wurde.

Die gefärbten Objektträger wurden schließlich in 100% EtOH dehydriert und anschließend für 30 Minuten bei 56°C getrocknet. Anschließend erfolgte die Deckelung der Objektträger mit Entellan (Tab. 3).

2.4 Semiquantitative Analyse der Immunreaktivität

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung der Proben erfolgte unabhängig durch mich und eine meiner naturwissenschaftlichen Betreuerinnen der Arbeit (Dr. rer.nat. Isabel Weigand). Gab es Diskrepanzen zwischen den beiden Untersuchern, wurden die Proben erneut gemeinsam bewertet und der finale H-Score wurde im Einverständnis festgelegt. Der Spearman r für die Interrater-Reliabilität für jede Färbung war hoch ($>0,85$).

Zur Auswertung wurde ein Lichtmikroskop mit einer Vergrößerung zwischen 10 und 100-fach verwendet. Zum Zeitpunkt der mikroskopischen Untersuchung waren beide Untersucher geblindet auf die Charakteristika (Mutationsstatus, Hormonsekretion) der Tumore. Die Färbung des Zytoplasmas, der Membran (bei Membranrezeptoren) und der Nuklei wurden bei jeder Probe unabhängig voneinander bestimmt. Die Färbeintensität wurde in die Stufen 0 (negativ), 1 (schwach), 2 (mäßige) und 3 (stark) eingeteilt (Tab. 5).

Tab. 5: Stufen der Färbeintensität

0	negativ
1	schwache Färbeintensität
2	mäßige Färbungsintensität
3	starke Färbeintensität

Der Prozentsatz immunhistochemisch positiver Zellen wurde für jede Probe bestimmt und mit dem Score 0 bewertet, wenn 0% positiv waren; mit 0,1, wenn 0,1-9% positiv waren; mit 0,5 wenn 10-49% positiv waren und mit 1, wenn $\geq 50\%$ positiv waren (Tab. 6).^{145,146}

Tab. 6: Score Prozentsatz positiver Zellen

0	0% positive Zellen
0,1	0,1-9% positive Zellen
0,5	10-49% positive Zellen
1	>50% positive Zellen

Dann wurde die Stufe der Färbungsintensität mit dem Score des Prozentsatzes positiver Tumorzellen multipliziert und damit der semiquantitative H-Score berechnet.¹⁴⁷

Es wurden zudem repräsentative Fotos in 20-facher Vergrößerung von jedem Antikörper gemacht. Diese werden jeweils von einem USP8 mutierten Tumor und von einem WT Tumor in den Ergebnissen exemplarisch dargestellt.

2.5 Statistische Analyse

Für die Auswertung der immunhistochemischen Färbung und der klinischen Parameter wurden Unterschiede in den vorliegenden Daten mittels des Mann-Whitney-U Test auf statistische Signifikanz geprüft.

Der One-way ANOVA Test mit dem Tukey post-hoc Test wurde durchgeführt, um Unterschiede zwischen mehreren Gruppen auf Signifikanz zu prüfen.

Außerdem wurde der exakte Fisher-Test angewendet, um zu prüfen, ob zwei dichotome Merkmale unabhängig voneinander sind.

Um mögliche Unterschiede in der Dauer bis zum Auftreten eines Rezidivs zu visualisieren, wurde eine Kaplan-Meier-Kurve erstellt und die jeweiligen Gruppen nach Mutationsstatus stratifiziert.

Für die statistischen Analysen wurde GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, Version 7.0) und IBM SPSS Statistics 25 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) benutzt.

P-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant eingestuft.

Die klinischen Daten werden als Mittelwert und Standardfehler sowie mit dem p-Wert angegeben.

Die immunhistochemischen Daten sind im Boxplot als Mittelwert mit Standardabweichung aufgezeichnet. Im Boxplot wurden nicht-signifikante Ergebnisse zwischen WT Tumoren und mutierten Tumoren mit nicht signifikant (ns) betitelt. Nicht-signifikante Unterschiede zwischen den anderen Tumorentitäten und der normalen Hypophyse wurden in der Graphik nicht bezeichnet. Ansonsten wurden nur die signifikanten Ergebnisse mit in den Boxplot aufgenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Zusammenhänge zwischen klinischen Daten und Mutationsstatus

Insgesamt wurden 125 Patienten (72,8% weiblich; mittleres Alter: 48,4±15,8 Jahre) in diesen Teil der Analyse eingeschlossen.

3.1.1 Patientenalter

Hierbei war das Alter bei ED des MC in den WT Tumoren (n=69) signifikant höher als in den mutierten Tumoren (n=34) (51,7±1,7 Jahre vs. 41,5±2,8 Jahre; p=0,002; Tab. 7).

Auch nach Ausschluss der Patienten mit Rezidivtumoren und gesonderter Bestimmung bei Ersttumoren (WT n=53 Mut n= 27) (Rezidive ausgeschlossen) fand sich ein signifikanter Unterschied (MUT 41,9±3,21 Jahre vs. WT 52,1±1,94 Jahre; p=0,007). Bei den Rezidivtumoren war der Unterschied nicht statistisch signifikant.

3.1.2 Geschlechterverteilung

Bei der Geschlechterverteilung zeigte sich in den corticotropen Tumoren insgesamt eine weibliche Dominanz.

Die USP8 mutierten Tumore (n=34) wiesen eine relative Häufigkeit des weiblichen Anteils der Patienten von 100% auf. Der USP8 WT (n=93) ergab eine relative Häufigkeit von Frauen mit 62,4% und von Männern mit 37,6%. Der Anteil von Frauen war somit in den mutierten Tumoren statistisch signifikant (p <0,001) höher als in den WT Tumoren (Tab. 7).

3.1.3 Body Mass Index

Der Body Mass Index (BMI) zeigte bei mutierten (n=31) und WT Tumoren (n=62) keinen signifikanten Unterschied. Während WT Tumore einen Mittelwert von 29.2±0,7 aufwiesen, zeigten mutierte Tumore einen Mittelwert von 31,4±1,2 (p= 0,136; Tab. 7).

3.1.4 Tumorgröße

Bei der Auswertung der Tumorgröße konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den WT (n=86) und mutierten (n=29) USP8 Tumoren beobachtet werden. Der mittlere maximale Durchmesser betrug bei den WT Tumoren $14,9 \pm 1,1$ mm, während er bei den mutierten Tumoren nur $8,8 \pm 1,0$ mm ergab ($p=0,001$; Tab. 7).

Nach Ausschluss der Rezidivtumore und Auswertung der Ersttumore waren die USP8 mutierten Tumore (n=23) ebenfalls signifikant ($p=0,001$) kleiner ($8,7 \pm 1,2$ mm) als die WT Tumore (n=53; $16,5 \pm 1,6$ mm).

Bei den Rezidivtumoren (WT n=23, MUT n=6) zeigten sich die mutierten Tumore ebenfalls kleiner, jedoch ohne statistische Signifikanz (WT $14 \pm 2,1$ vs. Mut $9 \pm 2,7$ mm; $p=0,212$).

3.1.5 Invasivität des Tumors

Die relative Häufigkeit der Invasivität der Hypophysentumore in umliegendes Gewebe war bei den beiden Patientengruppen sehr ähnlich.

Bei den WT Tumoren (n=66) und mutierten Tumoren (n=28) waren jeweils 39% der Tumore invasiv wachsend. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p > 0,999$; Tab. 7).

3.1.6 Resektionsgrad des Tumors

Der Resektionsgrad wurde als subtotal/inkomplett mit verbleibenden Teilresten oder als total/komplett beschrieben.

Bei den WT Tumoren hatten 32 von 55 (58,2%) eine totale Resektion und 23 von 55 (41,8%) eine subtotale Resektion. Bei den USP8 mutierten Tumoren hingegen, hatte die Mehrheit mit 29 von 32 (90,6%) eine totale Resektion, und nur 3 von 32 (9,4%) eine subtotale Tumorentfernung. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p=0,001$; Tab. 7).

Wenn man den Resektionsgrad nach Mutationsstatus stratifiziert, wiesen WT Tumore, die vollständig reseziert wurden eine kleinere Tumorgröße auf als die,

die subtotal reseziert wurden ($12,2 \pm 1,8$ vs. $21,8 \pm 2,5$; $p=0,001$). USP8 mutierte Tumore zeigten einen vergleichbaren Unterschied, jedoch war dieser nicht signifikant ($8,1 \pm 1,0$ vs. $15,0 \pm 5,1$; $p=0,192$).

3.1.7 Rezidive

Prozentual zeigte sich bei 31 von 72 (43,1%) Patienten mit WT Hypophysenadenomen und bei 10 von 31 (32,3%) der Patienten mit mutierten Adenomen das Auftreten eines oder mehrerer Rezidive. Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($p=0,382$; Tab. 7).

Bei der genaueren Untersuchung, ob es einen Unterschied in der Anzahl der Rezidive gab, wiesen 14 der 72 (19,4%) WT Patienten mehr als ein Rezidiv auf, wohingegen nur 2 von 31 der mutierten Patienten (6,5%) >1 Rezidiv aufwiesen. Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($p=0,139$). Ebenfalls zeigte sich, dass 3 von 72 (4,2%) Patienten mit WT Tumoren mehr als 2 Rezidive aufwiesen, wohingegen es bei den mutierten Tumoren 0 von 31 (0,0%) Patienten waren ($p=0,564$).

Es zeigte sich kein eindeutiger Unterschied bezüglich der Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs. Hier konnten insgesamt nur Daten von 4 Patienten mit mutierten Tumoren und 14 mit WT Adenomen analysiert werden, da nur bei diesen Patienten ein Rezidiv mit vorhandener Zeitangabe des Auftretens vorlag.

Tab. 7: Vergleich klinische Daten bei USP8 mutierten und WT Tumoren

	USP8 mutiert (n=34)		USP8 WT (n=93)		P-Wert	
	n (%)	Mittelwert ± SEM	n (%)	Mittelwert ± SEM		
Alter bei ED [Jahre]	<i>fehlend</i>	-	24	41,5±2,8	51,7±1,7	0,002
Geschlecht	weiblich	34 (100)	58 (62.4)			<0,001
	männlich	0 (0)	35 (37.6)			
	<i>fehlend</i>	-	-			
BMI	<i>fehlend</i>	3	31	31,4±1,2	29.2±0,7	0,136
Tumorgröße [mm]	<i>fehlend</i>	5	7	8,8±1,0	14,9±1,1	0,001
Invasivität	Invasiv	11 (39,3)	26 (39,4)			>0,999
	Nicht-Invasiv	17 (60,7)	40 (60,6)			
	<i>fehlend</i>	6	27			
Resektionsgrad	Total	29 (90,6)	32(58,2)			0,001
	Subtotal	3 (9,4)	23 (41,8)			
	<i>fehlend</i>	2	38			
Rezidive	Ja	10 (32,3)	31 (43,1)			0.949
	Nein	21 (67,7)	42 (56,9)			
	<i>fehlend</i>	3	21			

SEM=Standardfehler; ED=Erstdiagnose; BMI=Body-Mass-Index

3.1.8 Präoperative Hormonspiegel

3.1.8.1 Mitternachtscortisol

Der Cortisolwert um Mitternacht konnte nur bei einer geringen Anzahl von Patienten erhoben werden und dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT Tumoren (n=6) und mutierten Tumoren (n=6) (WT 184,2±125 vs. Mut 193,7±45,5 µg/l; p=0,180; Tab. 8).

3.1.8.2 Basaler Cortisolspiegel

Die basalen Cortisolspiegel beliefen sich bei Patienten mit mutierten Tumoren (n=29) auf einen Mittelwert von 219,9±16,2 µg/l im Vergleich zu WT Tumoren (n=57) mit 201,9±24,6 µg/l (p= 0,049) und waren damit signifikant höher (Tab. 8).

3.1.8.3 Freies Cortisol im 24 Stunden Urin

Das vor der Operation bestimmte freie Cortisol im 24 Stunden Sammelurin war bei Patienten mit mutierten (n=15) und WT (n=15) Tumoren nicht signifikant unterschiedlich (WT 827,9±337,4 vs. Mut 518,4±131,7 µg/24h; p=0,744; Tab. 8).

3.1.8.4. Niedrig dosierter 1mg Dexamethason Hemmtest

Im Dexamethason Hemmtest belief sich der gemessene Serumcortisolwert nach der Gabe von 1mg Dexamethason am Folgetag bei den mutierten Tumoren (n=12) auf 148,5±113,9 µg/l und bei den WT Tumoren (n=19) auf 190,1±238,0 µg/l (Tab. 8). Der Unterschied war statistisch nicht signifikant (p=0,921).

3.1.8.5 ACTH Spiegel

Der präoperative ACTH Spiegel ergab bei den WT Tumoren (n=59) einen höheren Mittelwert von 149,2±50,0 ng/l als bei den mutierten Tumoren (n=30) mit einem Mittelwert von 74,2±13,6 ng/l (Tab. 8). Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied (p=0,631).

3.1.8.6 CRH-Test

Bei der Auswertung des maximalen ACTH Wertes im CRH Test konnte kein signifikanter Unterschied zwischen mutierten (n=16) und WT (n=13) Patienten beobachtet werden (WT 210,3±51,0 ng/l, Mut 160 ±26,6 ng/l; p=0,496; Tab. 8).

Der maximale Cortisolspiegel im CRH Test wies ebenfalls keinen signifikanten Unterschied auf. Der Mittelwert lag beim WT (n=10) bei 306,9±77,1 und bei mutierten Tumoren (n=15) bei 335,1±88,2 µg/l (p=0,436).

Tab. 8: Vergleich der präoperativen Hormonspiegel bei USP8 mutierten und WT Tumoren

	USP8 mutiert (n=34)	USP8 WT (n=93)	P-Wert	
	Mittelwert ± SEM	Mittelwert ± SEM		
Präoperativer Hormonspiegel	Mitternachts Cortisol [µg/l]	193,7±45,5	184,2±125,0	0,180
	<i>fehlend</i>	28	87	
	Basaler Cortisolspiegel [µg/l]	219,9±16,2	201,9±24,6	0,049
	<i>fehlend</i>	5	36	
	freies Cortisol ¹ [µg/24h]	518,4±131,7	827,9±337,4	0,744
	<i>fehlend</i>	19	78	
	Dexamethason Hemmtest ² [µg/l]	148,5±113,9	190,1±238,0	0,921
	<i>fehlend</i>	22	74	
	ACTH [ng/l]	74,2±13,6	149,2±50,0	0,631
	<i>fehlend</i>	4	34	
ACTH _{max} ³ [ng/l]	160,0 ±26,6	210,3±51,0	0,496	
<i>fehlend</i>	18	80		
Cortisol _{max} ³ [µg/l]	335,1±88,2	306,9±77,1	0,436	
<i>fehlend</i>	19	83		

SEM=Standardfehler; BMI=Body-Mass-Index;

¹im 24 Stunden Urin

²Niedrig dosierter 1mg Dexamethason Hemmtest

³Gemessen mittels Corticotropin Releasing Hormone (CRH) Test

3.2. Proteinexpressionen

Vergleich der Proteinexpressionen in USP8 WT (WT) vs. USP8 mutierten (Mut) corticotropen Tumoren sowie im Vergleich zu inaktiven und somatotropen Hypophysenadenomen und normalen Hypophysen (NH).

3.2.1 Ubiquitin-spezifische Peptidase 8

Die Expression von USP8 im Zytoplasma zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen USP8 WT und mutierten (WT $1,1 \pm 0,6$ vs. Mut $1,2 \pm 0,5$; $p=0,49$).

Die Expression von USP8 im Nukleus dominierte jedoch signifikant in den mutierten Tumoren (WT $0,7 \pm 0,6$ vs. Mut $1,6 \pm 0,8$; $p < 0,001$; Abb. 10).

Auch im Vergleich zu den anderen Tumorentitäten sowie zur normalen Hypophyse zeigt sich die USP8 Expression im Nukleus erhöht, im Vergleich zu den inaktiven Tumoren mit einem statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,001$).

Im Zytoplasma war die Expression in den somatotropen Tumoren signifikant höher als in den WT Tumoren ($p=0,001$).

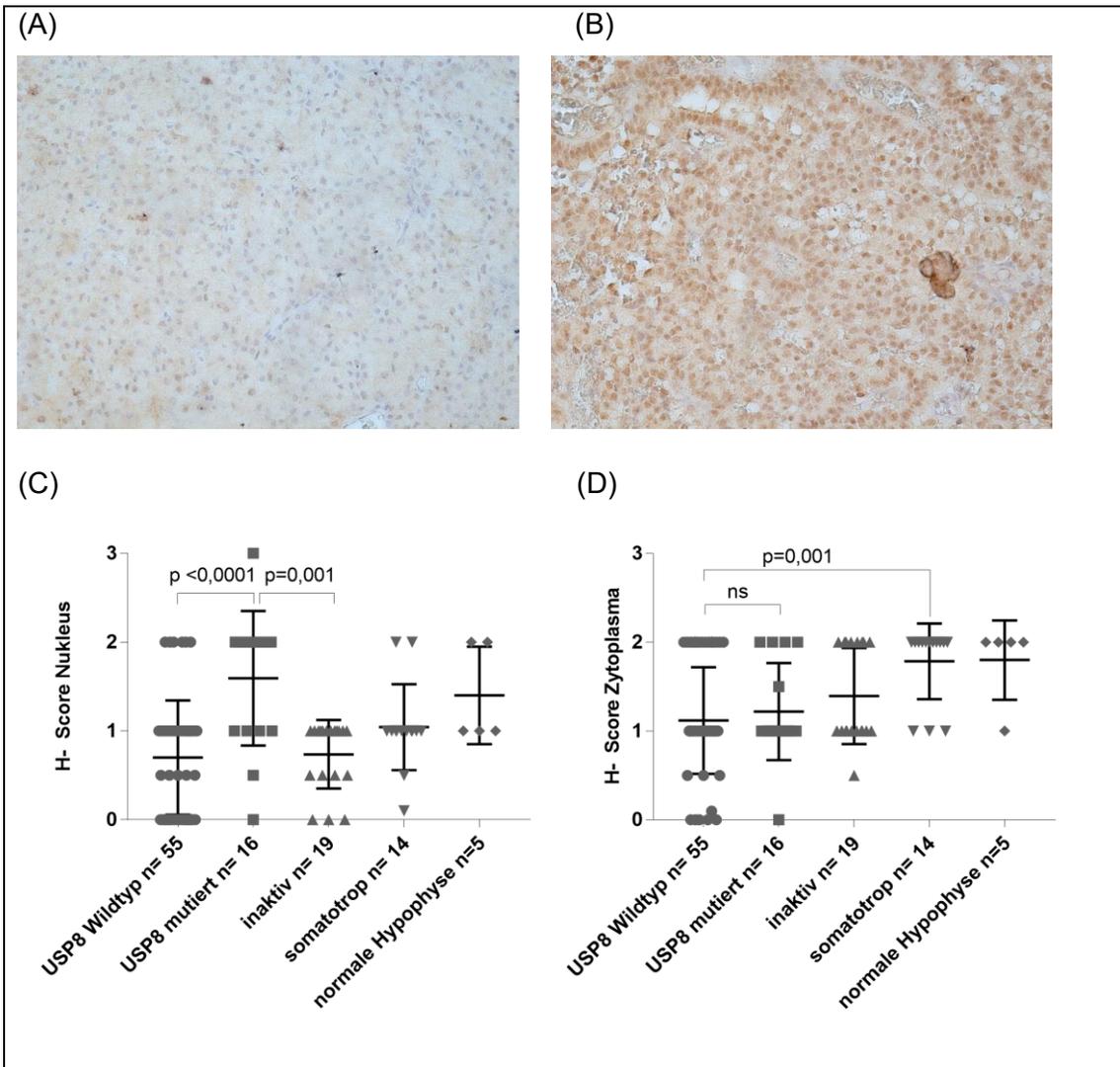


Abb.10: Immunhistochemische Färbung USP8: (A) WT (B) mutiert (C) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression im Nukleus (D) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression im Zytoplasma

3.2.2 Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor

Bei der Färbung des membranösen Rezeptors EGFR wurden für die vorliegende Arbeit durch mich lediglich die Proben aus Würzburg immunhistochemisch gefärbt.

EGFR zeigte sich hier im Nukleus in den mutierten Tumoren ähnlich exprimiert im Vergleich zum WT (WT $0,3 \pm 0,6$ vs. Mut $0,4 \pm 0,6$; $p=0,475$), während die Expression in der Membran in den USP8 mutierten Tumoren im Vergleich zum

WT tendenziell leicht höher war, jedoch ohne statistische Signifikanz (WT $0,5 \pm 0,6$ vs. Mut $0,9 \pm 0,4$; $p = 0,097$; Abb. 11).

In den normalen Hypophysen sowie auch in den inaktiven und somatotropen Tumoren ergaben sich weder im Nukleus noch im Zytoplasma signifikante Unterschiede im Vergleich zu den mutierten und WT Tumoren.

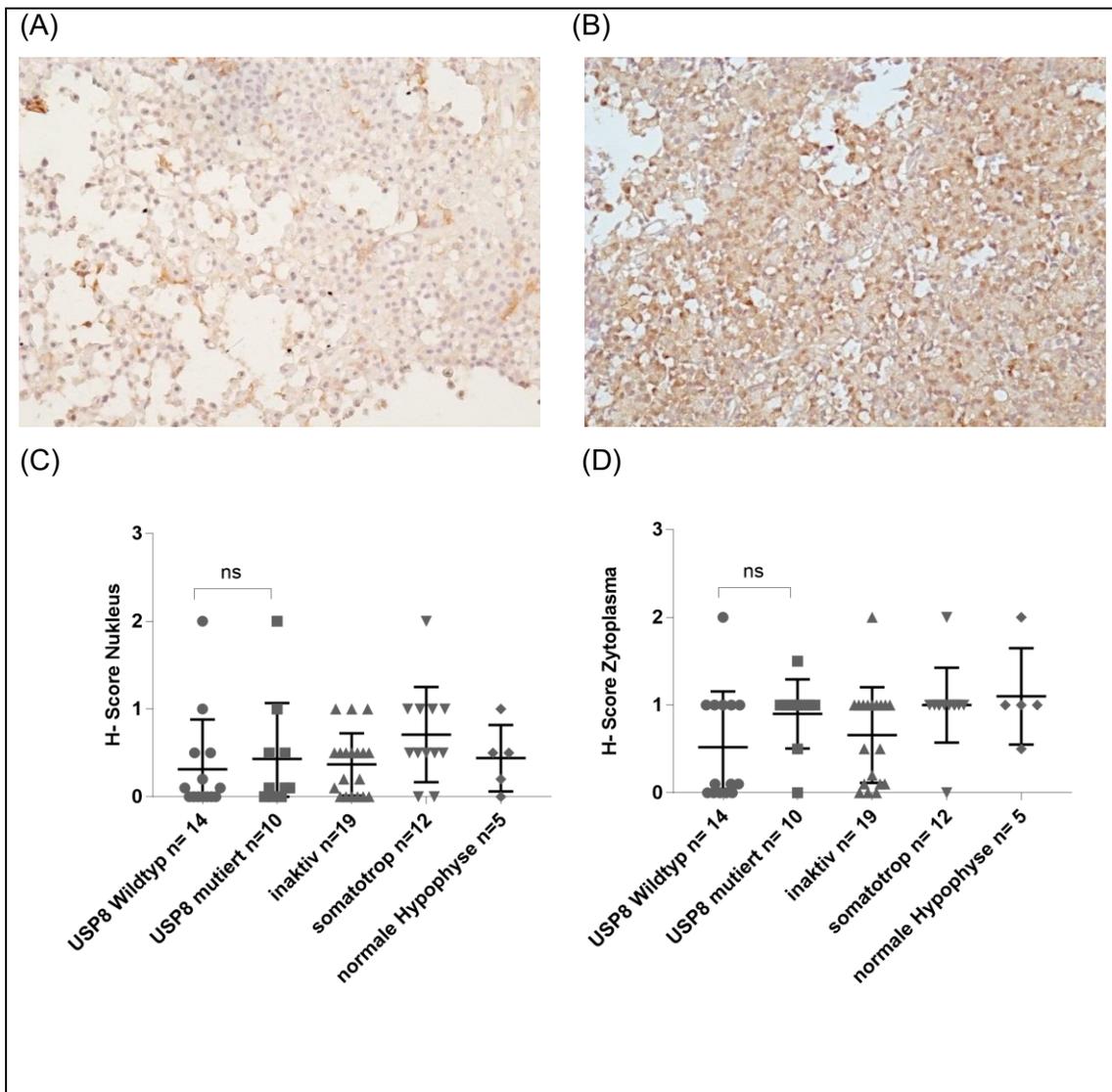


Abb. 11: Immunhistochemische Färbung EGFR: (A) WT (B) mutiert (C) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression im Nukleus (D) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression im Zytoplasma

3.2.3 P27/ Kip1

Der CDK Inhibitor P27/Kip1 zeigte sich in USP8 mutierten Tumoren im Vergleich zum WT im Zytoplasma (WT $1,0 \pm 0,7$ vs. Mut $0,4 \pm 0,6$; $p=0,003$) sowie auch im Nukleus (WT $2,0 \pm 1,0$ vs. Mut $1,1 \pm 1,1$; $p=0,004$; Abb. 12) signifikant reduziert.

Auch im Vergleich zu den inaktiven und somatotropen Tumoren, zeigten die mutierten corticotropen Tumore eine signifikant verminderte Expression im Nukleus.

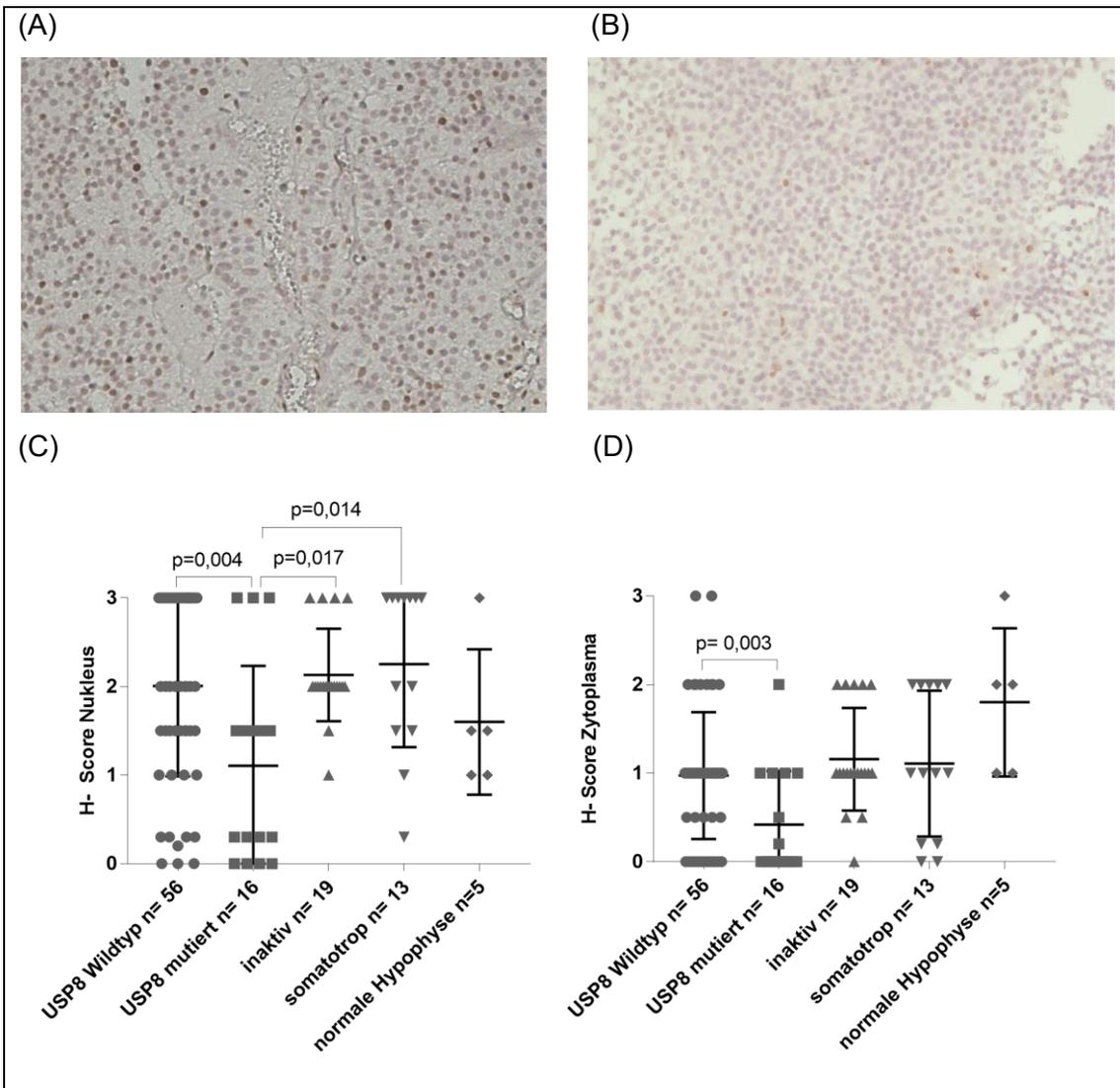


Abb. 12: Immunhistochemische Färbung P27/Kip1: (A) WT (B) mutiert (C) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression im Nukleus (D) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression im Zytoplasma

3.2.4 Cyclin E

In unserer Kohorte zeigte der Zellzyklusregulator Cyclin E tendenziell eine erhöhte, jedoch nicht signifikante Expression in allen Hypophysenadenomen im Vergleich zur normalen Hypophyse, unabhängig von der Hormonsekretion.

In corticotropen Tumoren zeigte sich die Expression mutationsunabhängig (Zytoplasma: WT $1,7 \pm 0,7$ vs. Mut $1,5 \pm 0,7$; $p=0,199$; Nuklei: WT $0,8 \pm 0,6$ vs. Mut $0,7 \pm 0,5$; $p=0,533$; Abb. 13).

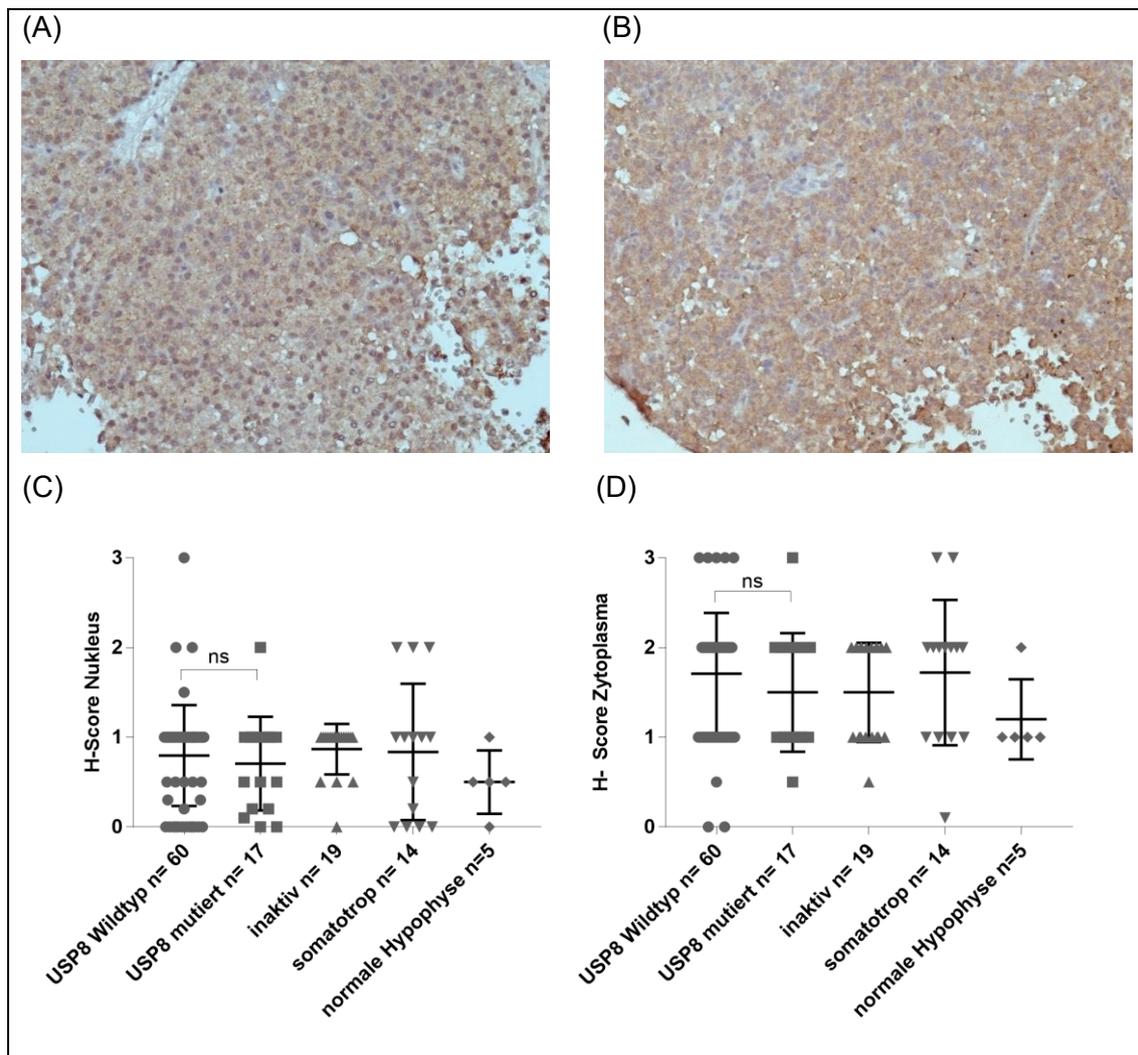


Abb. 13: Immunhistochemische Färbung Cyclin E: (A) WT (B) mutiert (C) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression im Nukleus (D) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression im Zytoplasma

3.2.5 Corticotropin Releasing Hormone-Rezeptor 1

In unserer Untersuchung zeigte sich der H-Score für die Expression des membranösen Rezeptors CRHR1 unabhängig vom Mutationsstatus.

Es ergaben sich in der Membran ähnliche Expressionsmuster in USP8 mutierten und WT Tumoren (WT $1,4 \pm 0,6$ vs. Mut $1,3 \pm 0,7$; $p = 0,950$; Abb. 14). Im Nukleus zeigte sich ebenfalls keine signifikant unterschiedliche Expression (WT $0,5 \pm 0,6$ vs. Mut $0,6 \pm 0,7$; $p = 0,535$). In den inaktiven Tumoren zeigte sich eine signifikante Verminderung in der Membran im Vergleich zum WT.

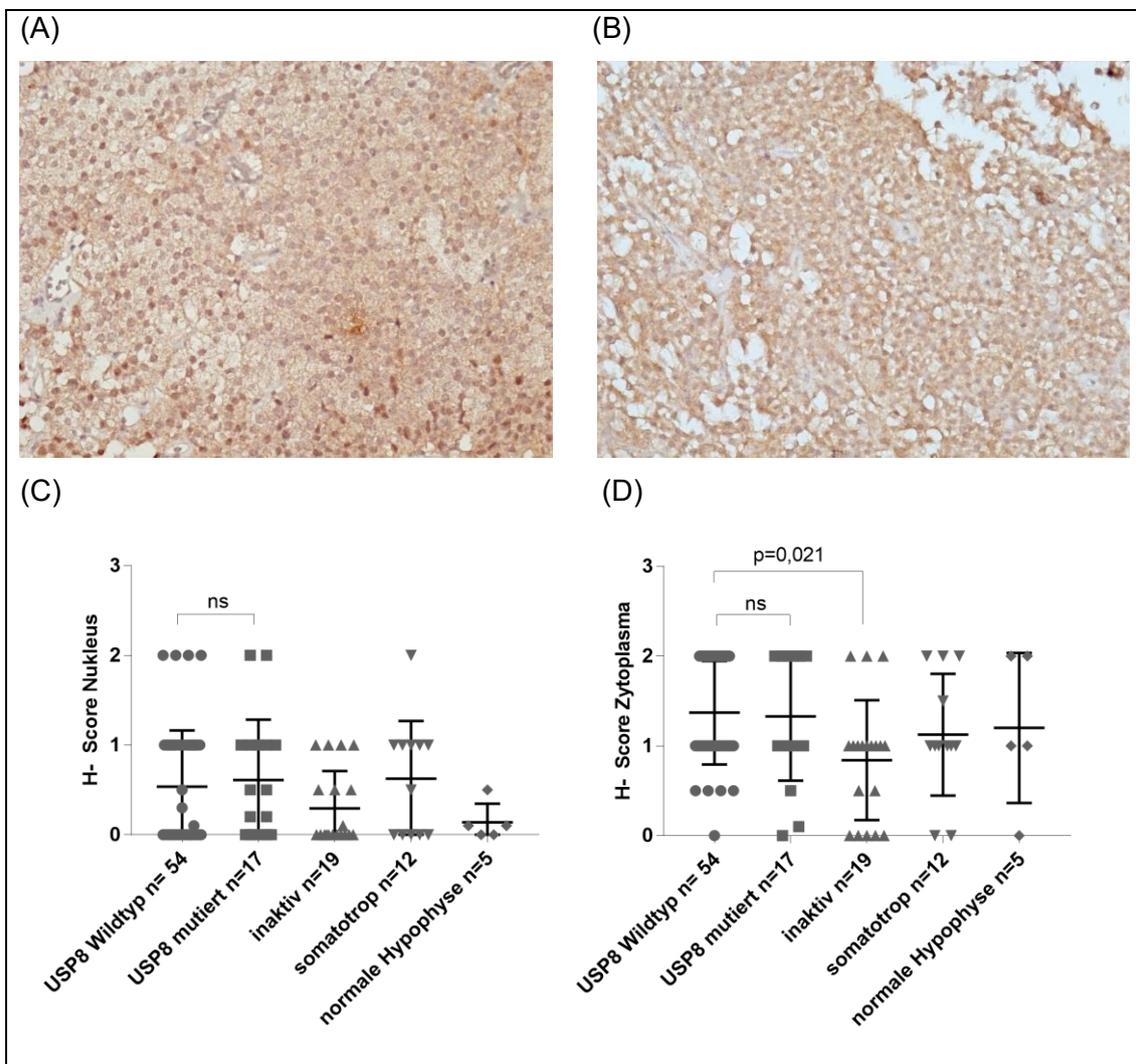


Abb. 14: Immunhistochemische Färbung CRHR1: (A) WT (B) mutiert (C) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression im Nukleus (D) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression in der Membran

3.2.6 Arginin Vasopressin -Rezeptor 1b

Unsere Immunhistochemie zeigte, dass die AVPR1b Proteinexpression insgesamt sehr niedrig und dies weitestgehend unabhängig vom Mutationsstatus in corticotropen Tumoren ist. Im Nukleus fehlte die Expression vollständig, während sie in der Membran ähnliche H-Scores für USP8 mutierte Tumore und WT Tumore ergab (Membran: WT $0,1 \pm 0,2$ vs. $0,1 \pm 0,1$; $p=0,166$; Abb. 15).

Die 5 normalen Hypophysen (NH) zeigten im Gegensatz höhere Proteinexpressionen von AVPR1b im Vergleich zu den corticotropen Tumoren in der Membran (NH $1,8 \pm 0,4$ vs. corticotrope Tumore $0,1 \pm 0,2$; $p < 0,001$). Auch die somatotropen Tumoren zeigten eine höhere Expression als die corticotropen Tumore. Die inaktiven Tumore ergaben insgesamt eine stärkere Expression in der Membran als die mutierten Tumore.

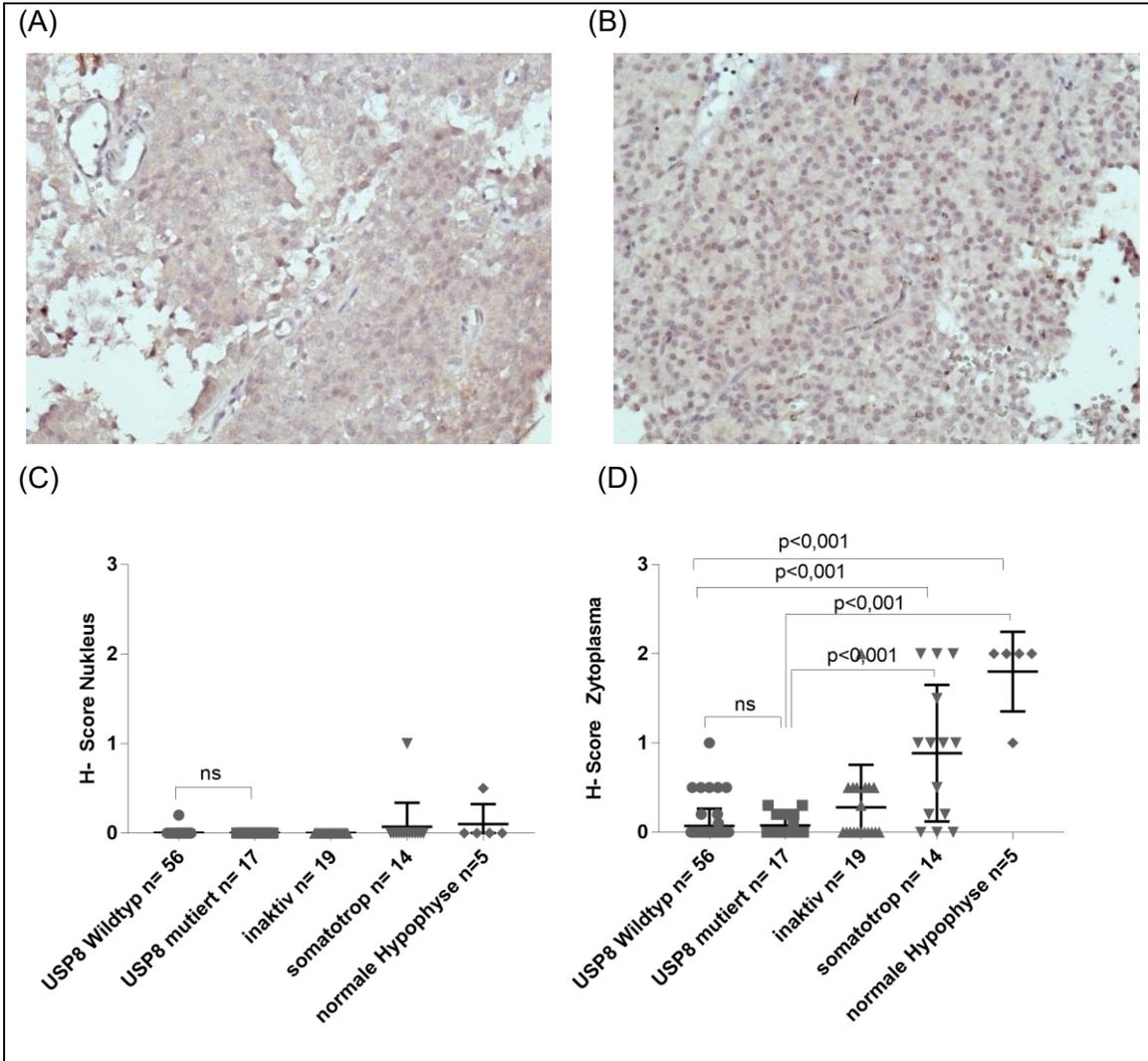


Abb. 15: Immunhistochemische Färbung AVPR1b: (A) WT (B) mutiert (C) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression im Nukleus (D) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression in der Membran

3.2.7 Testicular-Orphan-Rezeptor 4

In unserer Kohorte zeigte sich bei der Beurteilung des Transkriptionsfaktors TR4 kein signifikanter Unterschied zwischen USP8 mutierten und USP8 WT Tumoren im Zytoplasma (WT $0,8 \pm 0,7$ vs. Mut $0,6 \pm 0,6$; $p = 0,215$) und im Nukleus (WT $2,1 \pm 0,8$ vs. Mut $2,1 \pm 1,0$; $p = 0,471$). Auch der Vergleich zu anderen Hypophysentumoren ergab keinen Unterschied (Abb. 16).

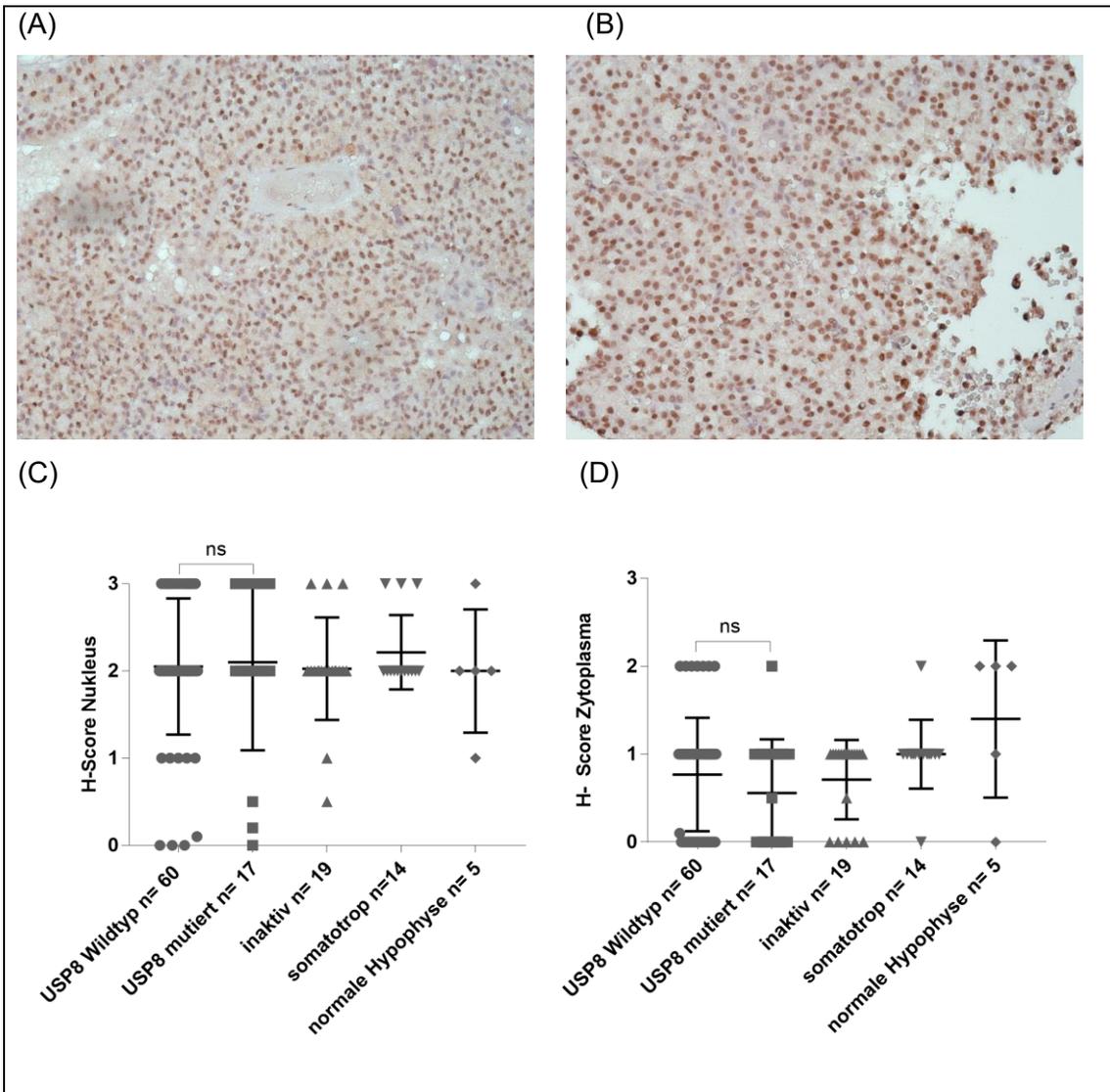


Abb. 16: Immunhistochemische Färbung TR4: (A) WT (B) mutiert (C) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression im Nukleus (D) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression im Zytoplasma

3.2.8 Hitzeschockprotein 90

Während es im Zytoplasma für HSP90 keinen signifikanten Unterschied zwischen mutierten und WT Tumoren gab (WT $1,9 \pm 0,9$ vs. Mut $1,7 \pm 1,1$; $p=0,449$), zeigte sich im Nukleus eine signifikant höhere Expression in USP8 mutierten Tumoren als im WT (WT $0,2 \pm 0,4$ vs. Mut. $0,5 \pm 0,5$; $p=0,029$; Abb. 17).

Die Expression von HSP90 zeigte sich in corticotropen WT Tumoren in den Zellkernen signifikant niedriger als in den inaktiven und somatotropen Hypophysentumoren.

In der normalen Hypophyse zeigte sich zudem im Nucleus eine deutlich geringere Expression im Vergleich zu allen Tumorentitäten mit signifikantem Unterschied zu den somatotropen Tumoren.

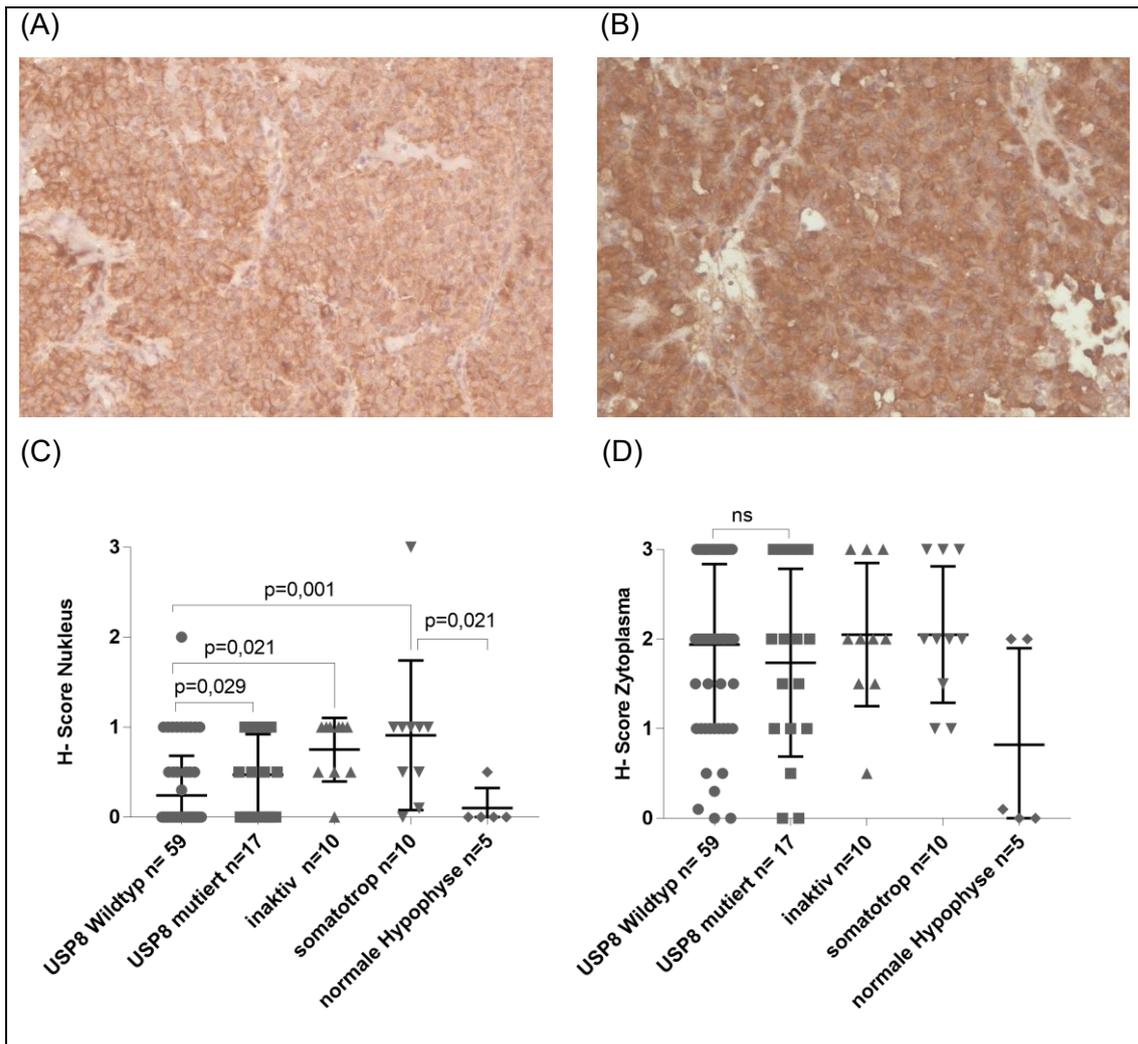


Abb. 17: Immunhistochemische Färbung HSP90: (A) WT (B) mutiert (C) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression im Nucleus (D) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression im Zytoplasma

3.2.9 cAMP Response Element Binding Protein

Im Nucleus zeigte sich die Expression von CREB in den corticotropen Tumoren im Vergleich zu den normalen Hypophysen signifikant erhöht (WT $2,0 \pm 1,0$ vs. NH $0,6 \pm 0,8$; $p=0,019$ und Mut $2,1 \pm 0,9$ vs. NH $0,6 \pm 0,8$; $p=0,014$). Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression von CREB im Nucleus sowie im Zytoplasma zwischen den WT Tumoren und mutierten Tumoren festgestellt werden. (Nuclei WT $2,0 \pm 1,0$ vs. Mut $2,1 \pm 0,9$; $p=0,646$, Zytoplasma WT $0,6 \pm 0,6$ vs. Mut $0,5 \pm 0,6$; $p=0,232$; Abb. 18).

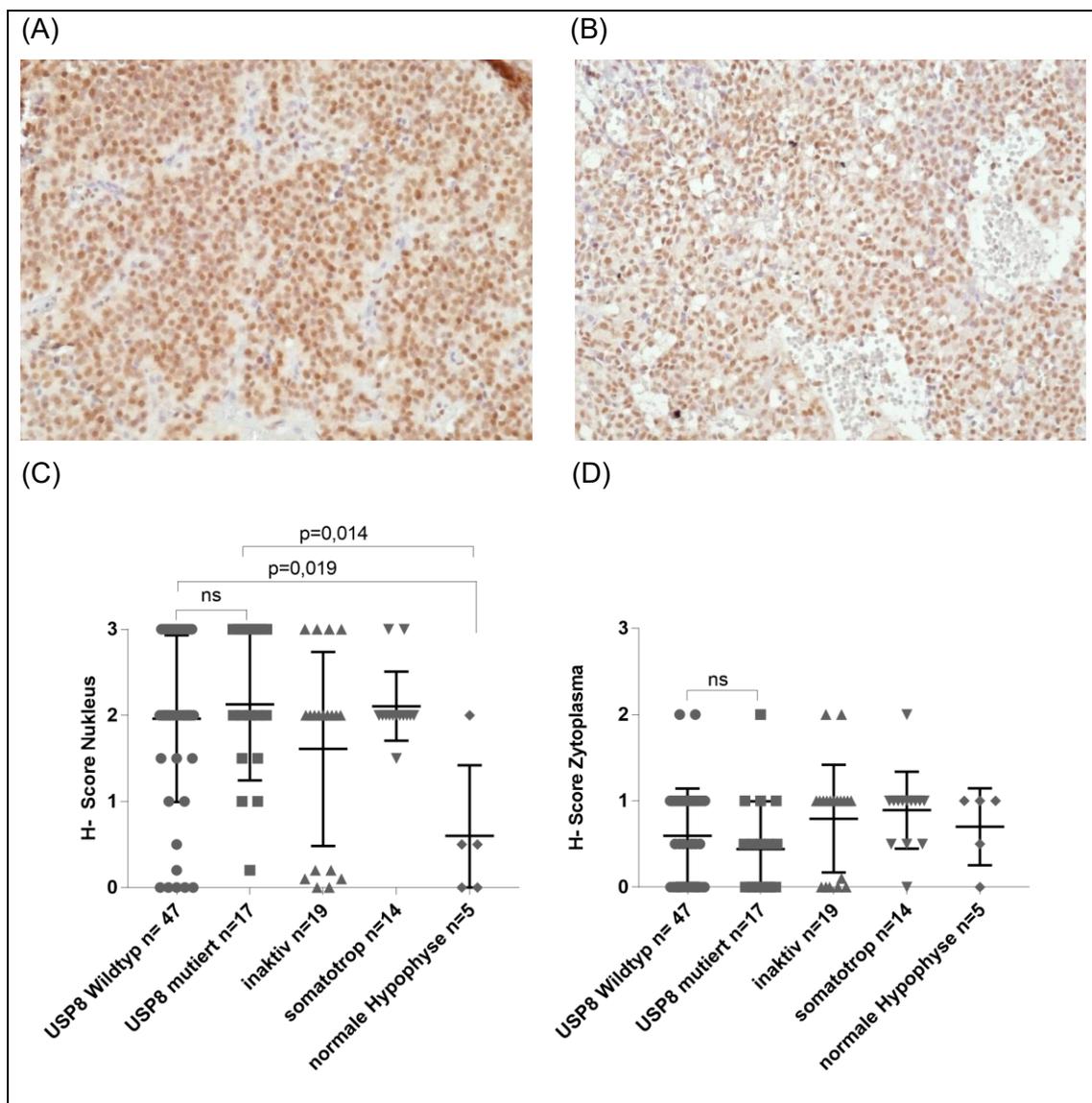


Abb. 18: Immunhistochemische Färbung CREB: (A) WT (B) mutiert (C) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression im Nucleus (D) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression im Zytoplasma

3.2.10 Phosphoryliertes CREB

Die Expression von pCREB zeigte sich in mutierten Tumoren im Nucleus signifikant erhöht im Vergleich zu WT Tumoren (WT $0,7 \pm 0,7$ vs. Mut $1,3 \pm 0,9$; $p=0,014$; Abb. 19). Auch inaktive und somatotrope Tumoren zeigten eine signifikant höhere Expression von pCREB in den Kernen im Vergleich zum WT.

Im Zytoplasma zeigte sich pCREB kaum exprimiert in mutierten und WT Tumoren (WT $0,02 \pm 0,1$ vs. Mut 0 ± 0 ; $p > 0,999$). Hier zeigte sich die Expression in den somatotropen Tumoren signifikant erhöht im Vergleich zu den corticotropen und inaktiven Adenomen sowie zu den normalen Hypophysen.

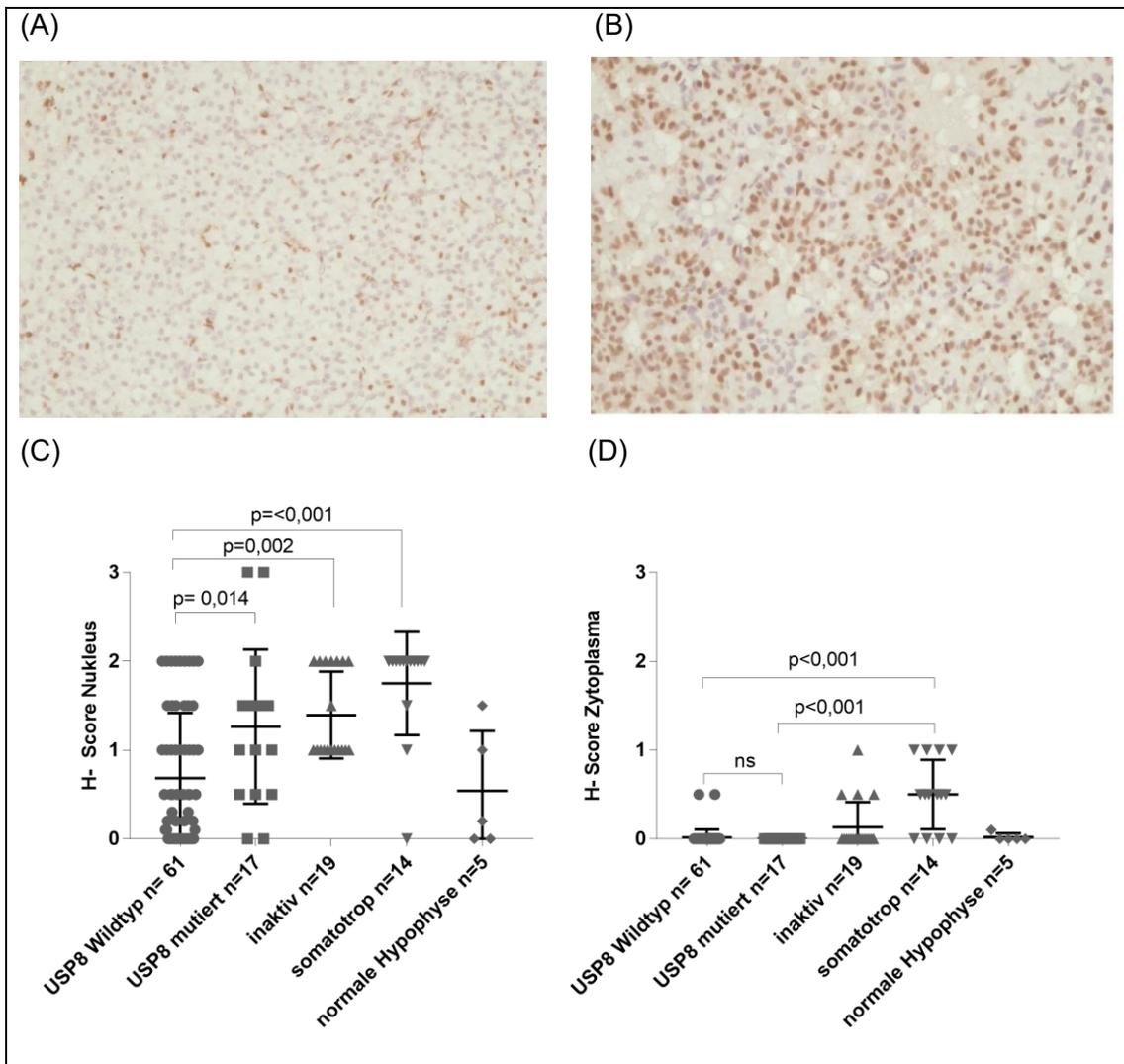


Abb. 19: Immunhistochemische Färbung pCREB: (A) WT (B) mutiert (C) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression im Nucleus (D) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression im Zytoplasma

3.2.11 Proteinkinase A (PKA)

Für die Färbung der katalytischen Untereinheit α der PKA waren lediglich Proben der mutierten und WT Tumoren der Universität Würzburg verfügbar.

Im Zytoplasma zeigten sich ähnliche Werte für mutierte und WT Tumore ohne statistische Signifikanz (WT $2,4 \pm 0,8$ vs. Mut $2,5 \pm 0,5$, $p=0,977$; Abb. 20).

Im Nukleus zeigten die mutierten Tumore tendenziell eine stärkere Expression von PKA (Mut $1,1 \pm 0,6$) als die WT Tumore (WT $0,7 \pm 0,8$), jedoch ohne statistische Signifikanz ($p=0,168$).

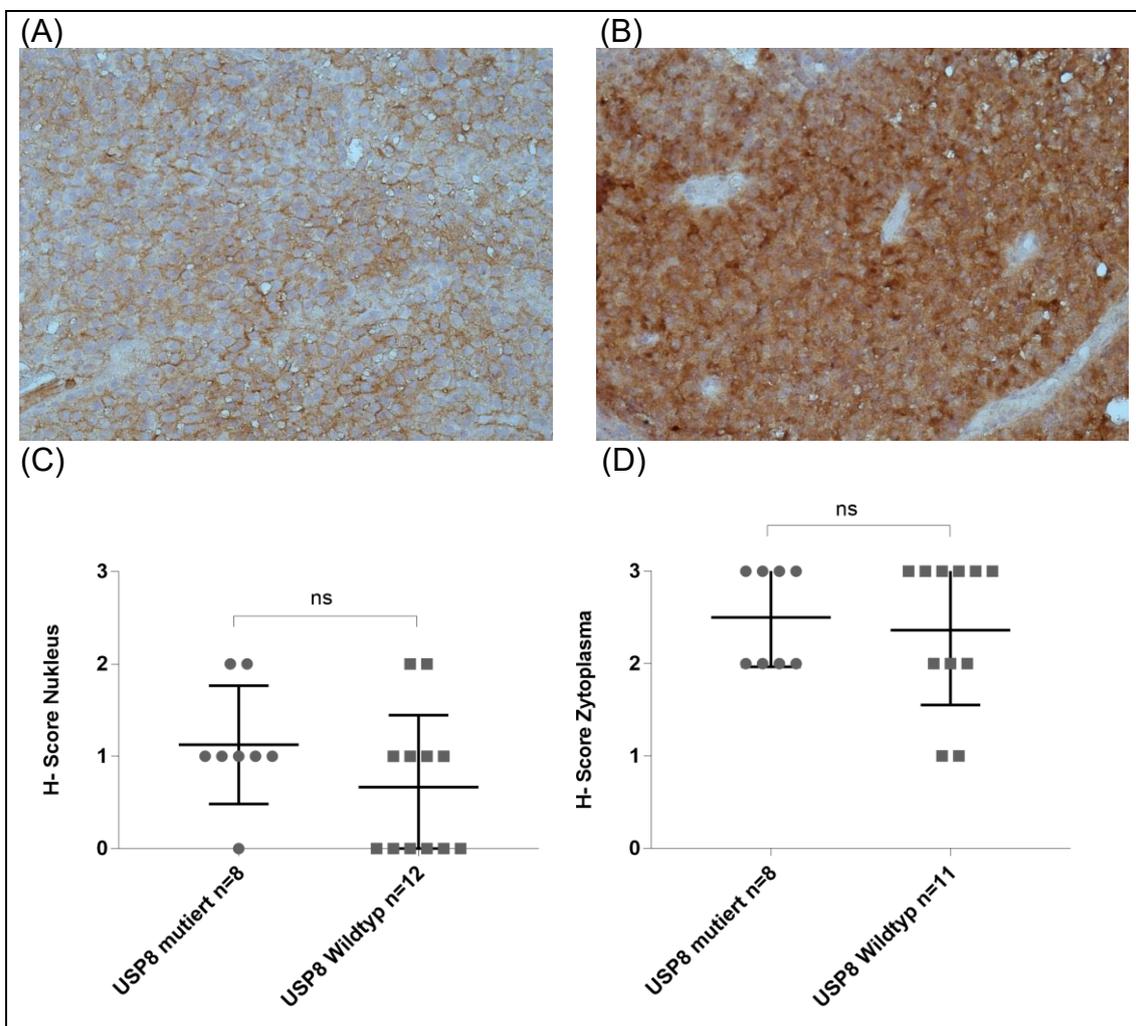


Abb. 20: Immunhistochemische Färbung PKA: (A) WT (B) mutiert (C) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression im Nukleus (D) H-Score mit Mittelwert und Standardabweichung der Expression im Zytoplasma

4. Diskussion

4.1 Klinische Zusammenhänge

Um mögliche Zusammenhänge zwischen dem USP8 Mutationsstatus und dem klinischen Phänotyp bei MC herauszufinden, wurden die klinischen Daten der Patienten mit bereits bekanntem Mutationsstatus analysiert.

Das Alter bei der ED des MC (WT 52 vs. Mut 41,5 Jahre) war in unserer Kohorte in den WT Tumoren signifikant höher als in den mutierten Tumoren. Die Patienten mit mutierten Hypophysentumoren waren im Schnitt 10 Jahre jünger als Patienten vom USP8 WT. Auch bei gesonderter Auswertung der Patienten mit Ersttumoren waren die Patienten mit USP8 mutierten Tumoren signifikant jünger.

Das bestätigt vorherige Studien, die ebenfalls zeigen konnten, dass Patienten mit USP8 Mutation zu einem früheren Zeitpunkt mit MC diagnostiziert worden sind und im Schnitt 4-10 Jahre jünger bei ED als Patienten vom WT waren.^{123,119,138}

Eine weitere Studie ergab ein Durchschnittsalter von USP8 mutierten MC Patienten von 43,9 Jahren, was den Daten aus unserer Studie sehr ähnelt.¹²⁴ Bei einer Studie mit Kindern fiel auf, dass die Patienten mit einer USP8 Mutation bei der Diagnose tendenziell älter und nicht jünger waren.¹⁴⁸ Zusammenfassend sind die Patienten mit mutierten Tumoren im Alter zwischen 36-43,9 Jahren bei ED und deutlich jünger als Patienten mit WT Tumoren.

Bei der Geschlechterverteilung ergab sich in unserer Studie in den corticotropen Tumoren insgesamt eine weibliche Dominanz. Die USP8 mutierten Tumore wiesen eine relative Häufigkeit des weiblichen Anteils der Patienten von 100% auf. Der USP8 WT ergab eine relative Häufigkeit von Frauen mit 62,37% und von Männern mit 37,63%. Der Anteil von Frauen war in mutierten Tumoren statistisch signifikant höher als in WT Tumoren. Insgesamt ergaben Studien eine höhere Prävalenz von Frauen in den USP8 mutierten Tumoren (35-60%)^{119,120,123}, was eine sekundäre Folge eines östrogenen Effekts auf die UPS8 mutierten Zellen sein könnte.¹²³

Der BMI zeigte in unserer Studie keinen signifikanten Unterschied zwischen mutierten und WT Tumoren. Bisher konnte nur in einer Studie mit Kindern eine

Korrelation zum BMI hergestellt werden; hier hatten die pädiatrischen Patienten einen niedrigeren BMI, die einen USP8 mutierten Tumor hatten.¹⁴⁸

Im präoperativen Hormonlabor (Mitternachts Cortisol, 1mg Dexamethason Hemmtest, 24 Stunden Urincortisol, CRH Test, ACTH) zeigten sich in unserer Kohorte in USP8 mutierten und WT Tumoren ähnliche Mittelwerte. Da mutierte Tumore jedoch tendenziell kleiner sind, könnte das auf eine höhere Sekretionskapazität pro Einheit des Tumolvolumens schließen lassen.¹¹⁹ Der präoperative basale Cortisolspiegel war sogar signifikant höher in den mutierten Tumoren. Auch Ma et al. konnten ähnliche Werte für den Plasma ACTH-Spiegel, das Mitternachts Serum Cortisol und das 24 Stunden Urincortisol in mutierten und WT nachweisen.¹¹⁹

Bei der Auswertung der Tumorgöße konnte in unserer Kohorte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den WT und mutierten USP8 Tumoren beobachtet werden. Der maximale Durchmesser betrug bei den WT Tumoren im Mittelwert 14,9 mm, während er bei den mutierten Tumoren nur 8,8 mm ergab und die mutierten Tumore somit deutlich kleiner waren. Zudem zeigte sich nach gesonderter Auswertung der Ersttumore nach Ausschluss der Rezidivtumore auch hier ein signifikanter Unterschied mit deutlich kleineren USP8 mutierten Tumoren.

Auch bei Ma et al. lag der größte Zusammenhang zum Mutationsstatus in der Tumorgöße, die sich dort ebenfalls signifikant kleiner in USP8 mutierten Tumoren zeigte.¹¹⁹ Auch Hayshi et al. beobachteten kleinere Adenome bei den mutierten Patienten mit einem maximalen Tumordiameter von 9,1 mm (Mittelwert). Bei den WT Tumoren lag er bei 16,3 mm.¹³⁸ Ballmann et al. gaben bei mutierten Tumoren eine Durchschnittsgröße von 11,4 mm.¹²⁴ Bei Rivas et al. ergab die maximale Adenomgröße jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen USP8 mutierten und WT Tumoren.¹²³

Die relative Häufigkeit der Invasivität der Hypophysentumore in umliegendes Gewebe war bei den beiden Patientengruppen in unserer Kohorte mit jeweils circa 39% nahezu identisch. Bei Ma et al. zeigten 41% der untersuchten WT

Tumore eine Invasion in den parasellären Raum und bei den mutierten Tumoren waren nur 13% invasiv wachsend.¹¹⁹ Hayashi et al. beschrieben bei WT Tumoren häufiger (64,1%) eine Invasion in den Sinus cavernosus als mutierte Tumore (42,9%), jedoch ohne statistische Signifikanz.¹³⁸ Hier lässt sich eine Korrelation zur Tumormgröße vermuten.

Bei unserer Patientenkohorte zeigte sich ein mutationsabhängiger Unterschied hinsichtlich der totalen Resektion des Tumors, der bei den mutierten Tumoren signifikant mit 90% (Mut) vs. 58% (WT) höher war, was möglicherweise auf die kleinere Tumormasse bei den mutierten Tumoren zurückzuführen sein könnte. Wir konnten zeigen, dass vollständig resezierte Tumore tendenziell eine kleinere Tumormgröße aufwiesen als solche, die subtotal reseziert wurden; bei den WT Tumoren mit einem signifikanten Unterschied. In anderen Studien wurden bisher keine Unterschiede zwischen mutierten und WT Tumoren hinsichtlich der Resektion gemacht.

Insgesamt traten bei 43,1% der Patienten mit WT Hypophysenadenomen und bei 32,3% der Patienten mit mutierten Adenomen eines oder mehrerer Rezidive auf. Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant. Zudem kann hier nur eine deutlich eingeschränkte Aussage über das Auftreten eines Rezidives gemacht werden, da es kein standardisiertes Follow-Up der Patienten gab.

Ma et al. konnten in einem Follow-Up von einem Monat bis 9 Jahren bei Patienten mit initialer Remission keine Relation hinsichtlich der Rezidivrate zum USP8 Mutationsstatus demonstrieren. Die postoperative Rezidivrate lag bei den WT Tumoren bei 25,8% und bei den mutierten Tumoren bei 20,7%.¹¹⁹ Bei Kindern traten interessanterweise Rezidive wesentlich häufiger bei USP8 mutierten Patienten auf.¹⁴⁸

Zusammenfassend liegt nach der transsphenoidalen Resektion insgesamt eine deutlich hohe Rezidivrate der corticotropen Adenome vor. Die höhere Rezidivrate in unserer Kohorte in WT Tumoren könnte durch die größeren Tumore in dieser Gruppe und die damit verbundenen häufiger verbliebenen Tumorrreste möglicherweise erklärbar sein. Eine Regression hinsichtlich möglicher

Prädiktoren für das Auftreten von Rezidiven konnte aufgrund vieler fehlender klinischer Parameter in der Datenerhebung nicht gerechnet werden.

4.2 Deregulierte Proteine und USP8

4.2.1 USP8

In den letzten Jahren wurde in mehreren Studien mit ACTH-produzierenden Adenomen die somatischen Hotspotmutationen im Deubiquitinase Gen USP8 in 35-62% der Tumore entdeckt. Das mutierte USP8 wurde hauptsächlich gehäuft nukleär beobachtet. In unserer Kohorte zeigte sich die Expression von USP8 wie erwartet im Nukleus signifikant erhöht in den mutierten Tumoren im Vergleich zum WT.

4.2.2 EGFR

Vorige Studien demonstrierten eine Überexpression des Wachstumsfaktors EGFR in corticotropen Adenomen.⁷⁹ Auch speziell in USP8 mutierten Zellen konnte bereits eine höhere Inzidenz der EGFR Expression beschrieben werden.¹¹⁹

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass das mutierte USP8 durch eine höhere DUB Aktivität zu einem gesteigerten Recycling von EGFR führt und zu einer Verstärkung des EGFR-induzierten MAPK Signalwegs ERK1/EKR2. Die Fähigkeit EGF zu binden ist erhöht und es ließ sich eine gesteigerte POMC mRNA Expression und folglich eine größere ACTH-Sekretion beobachten.^{119 120} Allerdings erwies eine nachfolgende Studie eine vom USP8 Mutationsstatus unabhängige EGFR Expression.¹³⁸ Eine weitere Studie ergab kürzlich einen niedrigeren Prozentsatz der EGFR positiven USP8 mutierten Tumore im Vergleich zu anderen publizierten Kohorten.¹²⁴

In meiner Kohorte zeigt die EGFR Expression in der Membran keinen signifikanten Unterschied in den mutierten Tumoren im Vergleich zum WT, was die Theorie, dass die USP8 Hyperaktivität direkt mit dem EGFR Recycling korreliert, nicht unterstützt. Nach nachfolgendem Einbezug der Proben aus

Hamburg durch I. Weigand wurde sogar eine signifikante Verminderung in den mutierten Tumoren im Vergleich zum WT demonstriert.¹⁴³ Das lässt vermuten, dass andere Faktoren in der erhöhten ACTH – Produktion involviert sein müssen.

Araki et al. konnten eine Überexpression des Transkriptionsfaktors E2F1 sowie von Cyclin E in Tumoren mit EGFR Expression beobachten. Da es dort keinen signifikanten Unterschied in der Expression von P27/Kip1 gab, wurde vermutet, dass die Signalkaskade einer EGFR-E2F1-Cyclin E Sequenz folgen könnte, ohne eine signifikante Rolle für P27/Kip1. Es wurde demonstriert, dass corticotropes EGFR Signaling die E2F1-vermittelte Induzierung von POMC und ACTH in MC hochreguliert und eine wichtige Rolle in der corticotropen Tumorgenese spielen könnte.¹⁴⁹ E2F1 könnte somit auch ein potenzielles Zielprotein von USP8 sein, das es zu untersuchen gilt.

4.2.3 P27/Kip1

Der CDKI P27/Kip1 wurde zuvor in einer Subgruppe von corticotropen Tumoren als vermindert exprimiert beschrieben.⁷¹ P27/Kip1 ist ein CDKI und ein Tumorsuppressor-Gen, welches an der Zelldifferenzierung beteiligt ist.¹⁵⁰ Die Ursache für die Herabregulation ist jedoch bisher unbekannt und Faktoren, die an der Translation beteiligt sind, zeigten sich alle unverändert.⁷⁶

In dieser Kohorte konnten wir eine reduzierte Expression von P27/Kip 1 im Nukleus sowie auch im Zytoplasma in den USP8 mutierten Tumoren im Vergleich zu den USP8 WT Tumoren feststellen. Auch im Vergleich zu den inaktiven und somatotropen Tumoren konnte eine Verminderung in den USP8 mutierten Adenomen im Nukleus beobachtet werden. Eine Herabregulation von P27/Kip1 könnte möglicherweise in einer erhöhten Zellzyklusprogression resultieren und somit zur Zellproliferation beitragen.

USP8 Mutationen scheinen zusammenfassend mit einem erniedrigten Spiegel von P27/Kip1 einherzugehen, jedoch ist die Ursache dafür ungeklärt, da es keine Hinweise darauf gibt, dass P27/Kip1 durch die Deubiquitinierung reguliert wird. Man könnte vermuten, dass ein anderes Protein von USP8 deubiquitiniert wird

und dieses Protein dann durch das verstärkte Recycling erhöht vorhanden wäre und für die Reduzierung von P27/Kip 1 verantwortlich sein könnte.

Interessanterweise zeigte sich in einer vorigen Studie eine höhere Frequenz der Herabregulation von P27/Kip in corticotropen Adenomen, die hohe EGFR Spiegel aufwiesen.⁷⁹ Da die Aktivierung der EGFR-MAPK Signalkaskade die Degradierung von P27/Kip1 induziert, wurde spekuliert, dass durch die USP8 Mutation durch eine Aktivierung des EGFR Signaling der Abbau von P27/Kip1 beschleunigt wird.^{119,137} Reduzierte Spiegel von P27/Kip1 in corticotropen Tumoren wurden zudem mit phosphoryliertem EGFR am Aminosäurerest Tyr992⁷⁹ in Verbindung gebracht, welches in der Lage ist Phospholipase C-γ (PLC) zu binden. PLC wiederum fördert den Export von P27/Kip1 vom Nukleus in das Zytoplasma, wo es dann abgebaut wird.¹⁵¹ Bisher wurde der Phosphorylierungs-Status von EGFR in corticotropen Tumoren jedoch nicht untersucht.^{119,120} PLC könnte somit ebenfalls ein potenzielles Zielprotein von USP8 sein und durch seine erhöhte Expression die P27/Kip1 Spiegel reduzieren. Auch der in corticotropen Tumoren neu entdeckte Tumorsuppressor CABLES1 reguliert durch die Inaktivierung von CDKs den Zellzyklus. Seine Immunreaktivität zeigte sich in über der Hälfte der MC Tumore erniedrigt und korrelierte mit der Abwesenheit von P27/Kip1. Da CABLES1 p27/Kip1 stabilisiert, könnte sein Verlust über eine Herabregulation von P27/Kip1 zur Entwicklung von corticotropen Tumoren beitragen.⁸¹

In einer auf dieser Arbeit aufbauenden Versuchsreihe konnte durch Weigand et al. in den USP8 mutierten Tumoren im Zytoplasma eine signifikante Verminderung von CABLES1 im Vergleich zum WT beobachten. Das lässt eine Korrelation von CABLES1 und P27/Kip1 in USP8 mutierten Tumoren vermuten.¹⁴³ Von Interesse wird zudem sein, ob der von Araki et al. demonstrierte EGFR-E2F1 Weg mit den Veränderungen von CABLES 1 korreliert.¹⁴⁹ Um zu testen, ob P27/Kip1 in unmittelbarer Nähe zu USP8 liegt, führten Weigand et al. zudem bei einer kleinen Gruppe von corticotropen Tumoren einen Proximity Ligation Assay durch. Hier zeigte sich, dass nur in den USP8 mutierten Tumoren,

USP8 und P27/Kip1 eng beieinanderliegen, höchstwahrscheinlich in demselben Komplex.¹⁴³

Insgesamt ist eine Korrelation zwischen den reduzierten p27/Kip1 Spiegeln und der USP8 Mutation sehr wahrscheinlich, der Grund dafür könnte in der Deubiquitinierung eines anderen, noch nicht identifizierten Proteins liegen.

4.2.4 Cyclin E

Cyclin E ist ebenfalls ein Zellzyklusregulator und wurde in corticotropen Adenomen in Studien als überexprimiert beschrieben.^{74,135}

Durch eine Bindung von p27/Kip1 an den Cyclin E-CDK2 Komplex wird dessen Aktivierung verhindert und der Zellzyklus bei G1 kontrolliert.^{72,135,152}

Es konnte eine Korrelation bei Mäusen zwischen einer Cyclin E Überexpression und gleichzeitigem Mangel an p27/Kip1 mit einer Erhöhung der Inzidenz von Hypophysenadenomen, ihrer Größe sowie ihrer Proliferationsindexe festgestellt werden.¹²² In einer weiteren Studie mit Zebrafischen und murinen corticotropen Tumoren mit MC, konnte mit dem CDKI Seliciclib eine Suppression der ACTH Sekretion demonstriert werden. Zudem zeigte sich eine Herabregulation von Cyclin E und eine Induktion der Zellzyklus-Terminierung durch die Hochregulation von p27, p21 und p57.¹⁵³

Cyclin E könnte somit eins der möglichen Proteine sein, die durch ihre Überexpression für die Herabregulation von p27/Kip1 in mutierten USP8 Tumoren verantwortlich sind. Cyclin E wurde jedoch kürzlich mit einer Überexpression des Transkriptionsaktivators E2F1 und EGFR in Verbindung gebracht, ohne eine Verringerung von p27/Kip1. Hier wurde vermutet, dass die Signalkaskade einer EGFR-E2F1-Cyclin E Sequenz folgen könnte, ohne eine signifikante Rolle für p27.¹⁴⁹

In unserer Kohorte zeigte der Zellzyklusregulator Cyclin E eine erhöhte Expression in allen untersuchten Hypophysenadenomen im Vergleich zur normalen Hypophyse. In corticotropen Tumoren zeigte sich die Expression jedoch mutationsunabhängig, was die Hypothese, dass Cyclin E für die niedrigen

p27/Kip1 Spiegel verantwortlich ist und ein Zielprotein von USP8 ist, in Frage stellt.

4.2.5 CRHR1

Die Expression des Oberflächenrezeptors CRHR1 wurde in corticotropen Tumoren in der Literatur als erhöht beschrieben, was bisher eher als Folge einer gestörten Rezeptorregulation und nicht als Pathogenese des MC gesehen wurde.^{154,92,93}

In unserer Untersuchung zeigte sich die Expression des membranösen Rezeptors jedoch unabhängig vom Mutationsstatus im Nukleus sowie im Zytoplasma. Das macht CRHR 1 als mögliches Zielsubstrat von USP8 eher unwahrscheinlich.

4.2.6 AVPR1b

Corticotrope Tumore wiesen in Studien ebenfalls eine erhöhte Expression der verschiedenen Arginin-Vasopressin-Rezeptoren (AVPR) auf, welche unter normalen Bedingungen durch Vasopressin aktiviert werden und die stimulierenden Effekte von CRH auf die ACTH Sekretion potenzieren.^{92,96,154}

AVPR1b nahm bisher die größte Rolle hinsichtlich der ACTH-Stimulation ein. Hohe Expressionen von AVPR1b könnten demnach eine Schlüsselrolle in der Überproduktion von ACTH spielen.^{94,97} Der Mechanismus ist jedoch bisher ungeklärt und es konnten keine Mutationen in dem für AVPR1b kodierenden Gen gefunden werden.⁹⁶

Unsere Immunhistochemie zeigt überraschend eine insgesamt sehr niedrige Proteinexpression von AVPR1b. Sie war auch weitestgehend unabhängig vom Mutationsstatus und zeigte in der Membran ähnliche H-Scores für USP8 mutierte Tumore und WT Tumore, was AVPR1b als direktes Substrat von USP8 in corticotropen Adenomen unwahrscheinlich macht. Die 5 normalen Hypophysen (NH) und die somatotropen Tumoren zeigten konträr zur Literatur höhere Proteinexpressionen von AVPR1b im Vergleich zu den corticotropen Tumoren in der Membran. Diese Diskrepanz könnte an der geringen Fallzahl der gesunden

Hypophysen liegen (n=5) oder an der Tatsache, dass in dieser Studie die Proteinspiegel analysiert worden sind, und nicht nur die mRNA Expression wie dies in einer anderen Publikationen der Fall war.^{96,154} Hohe mRNA Expressionen gehen nicht zwangsläufig mit einer erhöhten Proteinexpression einher, da es mehrere Wege gibt, um die Proteinstabilität posttranslational zu regulieren, zum Beispiel durch Ubiquitinierung.^{155–157}

Eine Herabregulation von Rezeptoren, eingeschlossen die Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren, wurde zuvor oft als ein Regulationsmechanismus der Zellen als Antwort auf eine lange und wiederholte Aktivierung dieser Rezeptoren, beschrieben.¹⁵⁵ Die verringerte Expression von AVPR1b könnte daher durch eine erhöhte Vasopressin Stimulation in corticotropen Adenomen im Vergleich zur normalen Hypophyse und somatotropen Tumoren bedingt sein. Das würde nicht mit der bisher beobachteten Ansprechbarkeit von corticotropen Adenomen auf Desmopressin, einem synthetischen AVP Analogon, das an alle 3 AVP Rezeptoren bindet, übereinstimmen.⁹⁴ Es würde allerdings mit der Beobachtung einhergehen, dass AVPR1b, trotz vorhandener Expression in primären corticotropen Zellkulturen, nicht auf Desmopressin anspricht.¹⁵⁸

4.2.7 TR4

Der Transkriptionsfaktor TR4 ist in gesunden corticotropen Zellen nahezu ausschließlich im Zytosol exprimiert. Er wurde in ACTH-produzierenden Zellen jedoch gehäuft im Nukleus beobachtet. *In vitro* konnte bei einer TR4 Überexpression eine erhöhte POMC Transkription und ACTH Sekretion gezeigt werden, sowie eine direkte Bindungsstelle für TR4 an dem POMC Promoter. Ebenso zeigte sich *in vivo* ein direkter Einfluss der TR4 Expression auf das Tumorwachstum.⁹⁹ TR4 interagiert zudem mit GR und spielt somit eine Rolle in der Glukokortikoid-induzierten POMC Suppression.¹⁰⁰ Es zeigte sich, dass die negative Regulation des GR auf die POMC Transkription und ACTH Sekretion durch das Interagieren mit TR4 überwunden werden konnte, was darauf hinweisen könnte, dass TR4 die Resistenz gegen das negative glukokortikoide Feedback fördert.¹⁰⁰ TR4 könnte daher als interessantes Angriffsziel für die pharmakologische Therapiekontrolle des MC dienen.

In unserer Kohorte zeigte sich bei der Beurteilung von TR4 jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen USP8 mutierten und USP8 WT Tumoren im Zytoplasma und im Nukleus. Auch der Vergleich zu anderen Hypophysentumoren ergab keine Veränderung. Wir konnten daher nicht die Ergebnisse von Du et al., die eine Überexpression in corticotropen Adenomen beschrieben, bestätigen. Das könnte jedoch auch an Unstimmigkeiten hinsichtlich des verwendeten Antikörpers liegen aufgrund der unzureichenden Beschreibung des TR4 Antikörpers in der Studie von Du et al.⁹⁹

4.2.8 HSP90

Das Chaperon HSP90 wurde kürzlich in corticotropen Adenomen als überexprimiert beschrieben. Durch die HSP90-GR Bindung resultiert eine erhöhte Inhibierung der GR Aktivität.¹¹¹ Dadurch ist der GR nicht mehr fähig, die POMC Promoter Aktivität und die ACTH Sekretion effizient zu hemmen, was zu einer reduzierten negativen Feedback Regulation der POMC Transkription führt.¹¹⁰

In unserer Kohorte war die Expression von HSP90 im Zytoplasma unabhängig vom USP8 Mutationsstatus. Im Nukleus zeigte sich allerdings eine signifikant höhere Proteinexpression in den USP8 mutierten Adenomen. Da das mutierte USP8 ebenfalls seine Lokalisation im Nukleus hat, könnte man vermuten, dass HSP90 ein nukleäres Zielprotein von USP8 ist, da HSP90 an GR bindet und ebenfalls im Nukleus lokalisiert ist.¹⁵⁹

Es ist daher möglich, dass USP8 HSP90 im Nukleus deubiquitiniert und die erhöhte Expression von HSP90 die negative Regulation der POMC Transkription auf die Aktivität des GR inhibiert. Schlussfolgernd könnte in dem Kontext der USP8 Mutationen die Inhibierung des GR durch erhöhte HSP90 Protein Spiegel von therapeutischer Relevanz sein. Riebold et al. zeigten, dass die Inhibierung von HSP90 mit Silibinin die ACTH Sekretion von At-T20 Zellen *in vivo* und *in vitro* reduzierte.¹¹¹ Silibinin könnte demnach für Patienten, die Träger der USP8 Mutation sind, von besonderem Interesse in Zukunft sein.

4.2.9 CREB, pCREB und PKA

In Hinsicht auf die Lokalisation im Nukleus von USP8, könnte der Transkriptionsfaktor CREB ein möglicher Kandidat für die USP8 Regulation sein. Er ist ebenfalls im Kern lokalisiert, wird durch PKA phosphoryliert und ist an der POMC Promoter Aktivierung beteiligt. CREB wurde daher in seinem inaktiven unphosphorylierten und in seinem aktiven phosphorylierten Zustand untersucht. In unserer Studie zeigte sich im Nukleus eine signifikant höhere Proteinexpression von pCREB in den USP8 mutierten Tumoren im Vergleich zum WT. Nur pCREB ist in der Lage an cAMP Response Elements (CREs) zu binden und die POMC Promoter Aktivierung zu induzieren. Da die Expression des unphosphorylierten CREB jedoch mutationsunabhängig war, könnte vermutet werden, dass PKA möglicherweise dereguliert ist. Weigand et al. konnten durch eine Einbringung der P720R USP8 Mutation in eine At-T20 corticotrope Zelle, erhöhte Spiegel von phospho-CREB feststellen.¹⁴³

Das lässt suggerieren, dass entweder pCREB oder PKA ein direktes Zielprotein von USP8 ist. Das erhöhte pCREB könnte folglich durch die Aktivierung der Transkription des POMC Promoters, zu einer verstärkten ACTH-Sekretion führen.

PKA zeigte in unserer Kohorte eine Tendenz zu einer höheren Expression in den mutierten Tumoren im Nukleus, jedoch ohne statistische Signifikanz. Aufgrund der niedrigen Fallzahl ist diese Untersuchung jedoch nur eingeschränkt aussagekräftig.

4.3 Limitationen und Stärken der Studie

Diese Studie birgt wie jede wissenschaftliche Arbeit mögliche Limitationen und Fehlerquellen.

Kleine Tumore sind in dieser Serie mit hoher Wahrscheinlichkeit unterrepräsentiert, da von diesen Tumoren zu wenig Tumormaterial nach der pathologischen Aufbereitung zur Verfügung steht. Diese Fehlerquelle kann leider

nicht korrigiert werden und muss bei der Interpretation berücksichtigt werden. Auch durch menschlichen oder technischen Einfluss entstandene Artefakte könnten die Auswertung der Ergebnisse beeinträchtigen. Teilweise können beispielsweise Gewebedenaturierungen vor der immunhistochemischen Färbung zu verfälschten Ergebnissen führen. Menschliche Fehler könnten zudem bei der Auswertung der immunhistochemischen Proben auftreten, wie zum Beispiel durch Fehler beim Einschätzen des betroffenen Prozentsatzes oder bei der Einordnung der Zellen in die verschiedenen Färbeintensitäten. Hier kann ebenso die Einschätzung der Abgrenzung zum normalen gesunden Gewebe limitierend sein. Diesem Aspekt wurden aber dadurch Rechnung getragen, dass die Auswertungen unabhängig von 2 Untersuchern (neben mir Frau Dr. rer. nat. Isabel Weigand) durchgeführt wurde und die Proben bei Unstimmigkeiten erneut beurteilt wurden.

Eine Limitierung dieser multizentrischen Studie ist zudem die unvollständige Aufzeichnung der hormonellen Laborergebnisse sowie das Fehlen von einheitlichen diagnostischen Protokollen. Die retrospektive Erhebung der klinischen Daten war in unserer Studie durch viele nicht vorhandene Parameter nicht mit der gewünschten Fallzahl auswertbar. Das klinische Follow-Up und das postoperative Management der Patienten waren nicht standardisiert und Daten zu Rezidiven und zur Remission waren nur eingeschränkt verfügbar. Das Anlegen eines Registers für weitere Studien wäre hier sinnvoll.

Aufgrund der Rarität dieser Tumorentität, wurden die Proben multizentrisch über die letzten Jahrzehnte gesammelt. Insgesamt lag uns eine eher geringe Fallzahl vor. Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung stellt diese Serie aber eine sehr große dar. Nach unserem Wissen ist das die bisher weltweit größte Studie mit 78 corticotropen Tumoren mit bekannter USP8 Mutation (davon 17 USP8 mutiert), in der 11 verschiedene corticotrop-relevante Proteine untersucht worden sind.

In dieser Studie wurde mit dem ersten Tissue Micro Array weltweit, der eine so große Fallzahl von ACTH-produzierenden Tumoren umfasst, gearbeitet. Im Vergleich zu gewöhnlichen ganzen Objektträgern, erlaubt der TMA eine

immunohistochemische Färbung einer großen Anzahl von Tumoren gleichzeitig, was den Prozess verkürzt und die Färbekonditionen vereinheitlicht.

Hinsichtlich der klinischen Daten ist es ebenfalls die bisher größte Studie, die 125 Patienten mit corticotropen Hypophysenadenomen und bekanntem USP8 Mutationsstatus (davon 34 USP8 mutierte) eingeschlossen und die klinischen Daten in Korrelation zum Mutationsstatus gesetzt hat.

4.4 Ausblick

Unsere Ergebnisse könnten zusammen mit den vorigen Studien wichtigen klinischen Einfluss haben.

USP8 mutierte Tumore sind häufig Mikroadenome, was es schwierig macht, sie mittels MRT Verfahren sowie intraoperativ zu detektieren. Man könnte mutmaßen, dass Patienten mit kleinen Tumoren, die schwierig oder gar nicht im MRT zu erkennen sind, wahrscheinlich Träger der USP8 Mutation sind. Besonders Frauen (Prävalenz 43-68%) zwischen 36-43,9 Jahren könnten hier betroffen sein. Solche Patienten könnten von einer Inhibierung der USP8 Aktivität oder der Inhibierung von Zielproteinen von USP8 profitieren.

Wir sind auf einem guten Weg die molekulare Pathogenese des Morbus Cushing zu ergründen. Obwohl die Mehrheit der Fälle durch eine transsphenoidale Resektion geheilt werden kann, ist die Rezidivrate signifikant. Es gilt daher, die präzisen molekularen Veränderungen zu verstehen und für die bekannten Mutationen spezielle Behandlungsmöglichkeiten zu etablieren. Ein besseres Verständnis ist essenziell, um die bestmögliche Therapie zu gewährleisten und diese Studie fügt einen weiteren Teil zur Ergründung der Pathogenese des MC hinzu.

Unsere Ergebnisse demonstrieren eine mögliche Rolle der USP8 Mutationen in der Degradierung von p27/Kip1 und der Überexpression von HSP90, welche schon in vorigen Studien mit einer erhöhten ACTH Sekretion in MC in Verbindung gebracht werden konnten.¹¹¹ Diese Entdeckung könnte klinische Relevanz haben, da bereits existierende Inhibitoren, insbesondere der HSP90

Inhibitor Silibinin, eine mögliche Therapie für Patienten mit USP8 Mutationen darstellen könnte. Silibinin wird in der Klinik bereits genutzt und ist mit einer hohen Sicherheit assoziiert.¹¹¹ Weiterhin konnte eine Korrelation zwischen den USP8 Mutationen und erhöhten Expressionen des phosphorylierten CREB demonstriert werden, was ebenfalls zu einer erhöhten ACTH Produktion der Tumore beitragen könnte.

5. Zusammenfassung

MC ist eine seltene, lebensbedrohliche Erkrankung mit einer bisher unvollständig verstandenen Pathogenese. Die zugrundeliegenden ACTH-produzierenden Adenome beherbergen in 35-62% somatische Mutationen im USP8 Gen. Die aktivierenden Mutationen machen USP8 hyperaktiv und verhindern damit den Abbau von Zielproteinen und könnten somit für die erhöhte ACTH-Produktion sowie die Tumorgenese verantwortlich sein.

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von USP8-Mutationen auf Proteine, die in MC dereguliert sind, zu identifizieren. Zudem wird untersucht, ob es Zusammenhänge der klinischen Daten bei Patienten mit bekanntem Mutationsstatus gibt.

Für die Analyse der klinischen Daten wurden Patienten eingeschlossen, die sich zwischen 1997 und 2016 einer transsphenoidalen Operation in der Uniklinik Hamburg, Würzburg oder Erlangen unterzogen haben. Einschlusskriterien umfassten eine histopathologische Bestätigung eines ACTH-immunreaktiven Hypophysenadenoms sowie Gewissheit über den USP8 Mutationsstatus. Die Daten wurden von 125 unterschiedlichen Patienten mit 127 corticotropen Tumoren ausgewertet (34 USP8 mutiert, 93 USP8 WT). Von dem oben genannten Patientenkollektiv der ACTH-produzierenden Tumore für die Auswertung der klinischen Daten, lagen uns insgesamt Proben von 78 dieser Tumore zur immunhistochemischen Färbung vor. Zudem wurde weitere Proben von Hypophysenadenomen und normalen Hypophysen als Vergleichsgruppe gefärbt und untersucht. Insgesamt wurden 111 Hypophysenadenome, von denen 78 corticotrop (61 USP8-WT und 17 USP8 mutiert), 14 somatotrop und 19 inaktiv waren, sowie 5 normale Hypophysen untersucht. Die bereits mit MC assoziierten deregulierten Proteine (USP8, EGFR, P27/Kip1, Cyclin E, CRHR1, AVPR1b, TR4, HSP90, CREB, pCREB, PKA) wurden immunhistochemisch untersucht.

Während bei den USP8 mutierten Tumoren die Patienten zu 100% weiblich waren, ergab die relative Häufigkeit der Frauen bei den WT Tumoren nur 62%. Die Patienten mit USP8 Mutation waren bei der ED des MC im Schnitt 10 Jahre jünger als die vom WT (WT $51,7 \pm 1,7$ Jahre vs. Mut $41,5 \pm 2,8$ Jahre; $p=0,002$). Der basale präoperative Cortisolspiegel zeigte sich signifikant höher in mutierten

Tumoren (WT $201,9 \pm 24,6$ vs. Mut $219,9 \pm 16,2$ $\mu\text{g/l}$; $p=0,048$) und die ACTH-Spiegel ergaben ähnliche Werte bei WT und mutierten Hypophysenadenomen. Die Tumorgöße war signifikant kleiner in den USP8 mutierten Adenomen (WT $14,9 \pm 1,1$ vs. Mut $8,8 \pm 1,0$ mm; $p=0,001$). Während die Invasivitätsrate der Tumore sich ähnlich zeigte, lag bei den WT Adenomen signifikant häufiger eine subtotale Resektion des Tumors vor als bei den mutierten Tumoren vor (WT 41,8% vs. Mut 9,4%; $p=0,001$). Die Rezidivrate ergab keinen signifikanten Unterschied (WT 43,1% vs. Mut 32,3%).

Während die meisten der mittels Immunhistochemie untersuchten Proteine keinen Unterschied in der Expression zwischen USP8 mutierten und WT Tumoren zeigten, war der Zellzyklusinhibitor p27/Kip1 signifikant reduziert in mutierten Tumoren (H-Score WT $2,0 \pm 1,0$ vs. Mut $1,1 \pm 1,1$; $p=0,004$). Im Gegensatz dazu, zeigte sich das Chaperon HSP90 im Nukleus stärker exprimiert (H-Score WT $0,2 \pm 0,4$ vs. Mut. $0,5 \pm 0,5$; $p=0,029$) und die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktor CREB war erhöht in mutierten Tumoren im Vergleich zum WT (H-Score WT $0,7 \pm 0,7$ vs. Mut $1,3 \pm 0,9$; $p=0,014$). Das lässt vermuten, dass p27/Kip1, HSP90 und pCREB direkte oder indirekte Zielproteine von USP8 sind und daher potenzielle Ziele für therapeutische Ansätze bei Patienten mit MC sein könnten. Konträr zu vorigen Studien, zeigte sich EGFR in den USP8 mutierten Tumoren nicht überexprimiert.

Diese Studie ist ein weiterer Schritt zur Ergründung der molekularen Pathogenese des MC. Die genauen Veränderungen müssen weiter untersucht werden, damit präzisere und für die bekannten Mutationen spezifische Therapien in Zukunft etabliert werden können.

6. Literaturverzeichnis

1. Raff, H. & Carroll, T. Cushing's syndrome: from physiological principles to diagnosis and clinical care. *The Journal of Physiology* **593**, 493–506; 10.1113/jphysiol.2014.282871 (2015).
2. Aguilera, G., Nikodemova, M., Wynn, P. C. & Catt, K. J. Corticotropin releasing hormone receptors: two decades later. *Peptides* **25**, 319–329; 10.1016/j.peptides.2004.02.002 (2004).
3. Chen, R., Lewis, K. A., Perrin, M. H. & Vale, W. W. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 8967–8971 (1993).
4. Margioris, A. N. & Tsatsanis, C. *ACTH Action on the Adrenals* (MDText.com, Inc, 2016).
5. Gjerstad, J. K., Lightman, S. L. & Spiga, F. Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* **21**, 403–416; 10.1080/10253890.2018.1470238 (2018).
6. Newell-Price, J., Bertagna, X., Grossman, A. B. & Nieman, L. K. Cushing's syndrome. *Lancet (London, England)* **367**, 1605–1617; 10.1016/S0140-6736(06)68699-6 (2006).
7. Oyola, M. G. & Handa, R. J. Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* **20**, 476–494; 10.1080/10253890.2017.1369523 (2017).
8. Chaudhry, H. S. & Singh, G. *Cushing Syndrome* (StatPearls Publishing, 2019).
9. Sharma, S. T., Nieman, L. K. & Feelders, R. A. Cushing's syndrome: epidemiology and developments in disease management. *Clinical Epidemiology* **7**, 281–293; 10.2147/CLEP.S44336 (2015).

10. Cieszynski, L., Berendt-Obolonczyk, M., Szulc, M. & Sworczak, K. Cushing's syndrome due to ectopic ACTH secretion. *Endokrynologia Polska* **67**, 458–471; 10.5603/EP.a2016.0055 (2016).
11. Shahani, S., Nudelman, R. J., Nalini, R., Kim, H.-S. & Samson, S. L. Ectopic corticotropin-releasing hormone (CRH) syndrome from metastatic small cell carcinoma: a case report and review of the literature. *Diagnostic pathology* **5**, 56; 10.1186/1746-1596-5-56 (2010).
12. Streuli, R. *et al.* A rare case of an ACTH/CRH co-secreting midgut neuroendocrine tumor mimicking Cushing's disease. *Endocrinology, Diabetes & Metabolism Case Reports* **2017**; 10.1530/EDM-17-0058 (2017).
13. Bertagna, X., Guignat, L., Groussin, L. & Bertherat, J. Cushing's disease. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **23**, 607–623; 10.1016/j.beem.2009.06.001 (2009).
14. Stratakis, C. A. Cushing syndrome caused by adrenocortical tumors and hyperplasias (corticotrophin-independent Cushing syndrome). *Endocrine development* **13**, 117–132; 10.1159/000134829 (2008).
15. Abdullahi, M., Atiku, M. & Ibrahim, I. M. Cushing syndrome secondary to late onset adrenal hyperplasia: presentation and challenges of management. *Pyramid J Med* **1**; 10.4081/pjm.2018.8 (2018).
16. Mantero, F. *et al.* A survey on adrenal incidentaloma in Italy. Study Group on Adrenal Tumors of the Italian Society of Endocrinology. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **85**, 637–644; 10.1210/jcem.85.2.6372 (2000).
17. Louiset, E. *et al.* Intraadrenal corticotropin in bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *The New England journal of medicine* **369**, 2115–2125; 10.1056/NEJMoa1215245 (2013).
18. Buliman, A., Tataranu, L. G., Paun, D. L., Mirica, A. & Dumitrache, C. Cushing's disease: a multidisciplinary overview of the clinical features, diagnosis, and treatment. *Journal of Medicine and Life* **9**, 12–18 (2016).

19. Del Maestro, R. Harvey Cushing: A Life in Surgery. *Canadian Journal of Surgery* **50**, 70–71 (2007).
20. Gicquel, C., Le Bouc, Y., Luton, J. P., Girard, F. & Bertagna, X. Monoclonality of corticotroph macroadenomas in Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* **75**, 472–475; 10.1210/jcem.75.2.1322426 (1992).
21. Biller, B. M. *et al.* Clonal origins of adrenocorticotropin-secreting pituitary tissue in Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* **75**, 1303–1309; 10.1210/jcem.75.5.1358909 (1992).
22. Sbiera, S. *et al.* The New Molecular Landscape of Cushing's Disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **26**, 573–583; 10.1016/j.tem.2015.08.003 (2015).
23. Scheithauer, B. W., Kovacs, K. T., Laws, E. R. & Randall, R. V. Pathology of invasive pituitary tumors with special reference to functional classification. *Journal of neurosurgery* **65**, 733–744; 10.3171/jns.1986.65.6.0733 (1986).
24. Patel, J., Eloy, J. A. & Liu, J. K. Nelson's syndrome: a review of the clinical manifestations, pathophysiology, and treatment strategies. *Neurosurgical focus* **38**, E14; 10.3171/2014.10.FOCUS14681 (2015).
25. Steffensen, C., Bak, A. M., Rubeck, K. Z. & Jørgensen, J. O. L. Epidemiology of Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology* **92 Suppl 1**, 1–5; 10.1159/000314297 (2010).
26. Etxabe, J. & Vazquez, J. A. Morbidity and mortality in Cushing's disease: an epidemiological approach. *Clinical endocrinology* **40**, 479–484 (1994).
27. Lindholm, J. *et al.* Incidence and late prognosis of Cushing's syndrome: a population-based study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **86**, 117–123; 10.1210/jcem.86.1.7093 (2001).
28. Leibowitz, G. *et al.* Pre-clinical Cushing's syndrome: an unexpected frequent cause of poor glycaemic control in obese diabetic patients. *Clinical endocrinology* **44**, 717–722 (1996).

29. Catargi, B. *et al.* Occult Cushing's syndrome in type-2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **88**, 5808–5813; 10.1210/jc.2003-030254 (2003).
30. Omura, M., Saito, J., Yamaguchi, K., Kakuta, Y. & Nishikawa, T. Prospective study on the prevalence of secondary hypertension among hypertensive patients visiting a general outpatient clinic in Japan. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* **27**, 193–202 (2004).
31. Kairys, N. & Schwell, A. *Cushing Disease* (StatPearls Publishing, 2019).
32. Greenberg, M. S. ed. *Handbook of neurosurgery* (Thieme, New York, NY, 2010).
33. Sharif-Alhoseini, M. & Rahimi-Movaghar, V. Pituitary adenomas: a review. *Journal of Injury and Violence Research* **4** (2012).
34. Arnaldi, G. *et al.* Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 5593–5602; 10.1210/jc.2003-030871 (2003).
35. Haouat, E. *et al.* (2012).
36. Lado-Abeal, J. *et al.* Menstrual abnormalities in women with Cushing's disease are correlated with hypercortisolemia rather than raised circulating androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 3083–3088; 10.1210/jcem.83.9.5084 (1998).
37. Santos, A. *et al.* Quality of life in Cushing's syndrome. *Pituitary* **18**, 195–200; 10.1007/s11102-015-0640-y (2015).
38. Dekkers, O. M. *et al.* Multisystem morbidity and mortality in Cushing's syndrome: a cohort study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **98**, 2277–2284; 10.1210/jc.2012-3582 (2013).
39. Clayton, R. N. Mortality in Cushing's disease. *Neuroendocrinology* **92 Suppl 1**, 71–76; 10.1159/000315813 (2010).

40. Clayton, R. N., Raskauskiene, D., Reulen, R. C. & Jones, P. W. Mortality and morbidity in Cushing's disease over 50 years in Stoke-on-Trent, UK: audit and meta-analysis of literature. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **96**, 632–642; 10.1210/jc.2010-1942 (2011).
41. Ntali, G., Grossman, A. & Karavitaki, N. Clinical and biochemical manifestations of Cushing's. *Pituitary* **18**, 181–187; 10.1007/s11102-014-0631-4 (2015).
42. Nieman, L. K. *et al.* The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 1526–1540; 10.1210/jc.2008-0125 (2008).
43. Pappachan, J. M., Hariman, C., Edavalath, M., Waldron, J. & Hanna, F. W. Cushing's syndrome: a practical approach to diagnosis and differential diagnoses. *Journal of Clinical Pathology* **70**, 350–359; 10.1136/jclinpath-2016-203933 (2017).
44. Dichek, H. L. *et al.* A comparison of the standard high dose dexamethasone suppression test and the overnight 8-mg dexamethasone suppression test for the differential diagnosis of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **78**, 418–422; 10.1210/jcem.78.2.8106630 (1994).
45. Saeger, W. *et al.* Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. *European Journal of Endocrinology* **156**, 203–216; 10.1530/eje.1.02326 (2007).
46. Masopust, V. *et al.* Magnetic resonance imaging and histology correlation in Cushing's disease. *Neurologia i neurochirurgia polska* **51**, 45–52; 10.1016/j.pjnns.2016.10.005 (2017).
47. Law, M. *et al.* Value of pituitary gland MRI at 7 T in Cushing's disease and relationship to inferior petrosal sinus sampling: case report. *Journal of neurosurgery*, 1–5; 10.3171/2017.9.JNS171969 (2018).

48. Bonelli, F. S. *et al.* Adrenocorticotrophic hormone-dependent Cushing's syndrome: sensitivity and specificity of inferior petrosal sinus sampling. *AJNR. American journal of neuroradiology* **21**, 690–696 (2000).
49. Lad, S. P., Patil, C. G., Laws, E. R. & Katznelson, L. The role of inferior petrosal sinus sampling in the diagnostic localization of Cushing's disease. *Neurosurgical focus* **23**, E2; 10.3171/foc.2007.23.3.3 (2007).
50. Oldfield, E. H. *et al.* Petrosal sinus sampling with and without corticotropin-releasing hormone for the differential diagnosis of Cushing's syndrome. *The New England journal of medicine* **325**, 897–905; 10.1056/NEJM199109263251301 (1991).
51. Molitch, M. E. Diagnosis and Treatment of Pituitary Adenomas: A Review. *JAMA* **317**, 516–524; 10.1001/jama.2016.19699 (2017).
52. Nieman, L. K. *et al.* Treatment of Cushing's Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **100**, 2807–2831; 10.1210/jc.2015-1818 (2015).
53. Dimopoulou, C. *et al.* Long-term remission and recurrence rates after first and second transsphenoidal surgery for Cushing's disease: care reality in the Munich Metropolitan Region. *European Journal of Endocrinology* **170**, 283–292; 10.1530/EJE-13-0634 (2014).
54. Patil, C. G. *et al.* Late Recurrences of Cushing's Disease after Initial Successful Transsphenoidal Surgery. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 358–362; 10.1210/jc.2007-2013 (2008).
55. Petersenn, S. *et al.* Therapy of endocrine disease: outcomes in patients with Cushing's disease undergoing transsphenoidal surgery: systematic review assessing criteria used to define remission and recurrence. *European Journal of Endocrinology* **172**, R227-39; 10.1530/EJE-14-0883 (2015).
56. Zada, G., Kelly, D. F., Cohan, P., Wang, C. & Swerdloff, R. Endonasal transsphenoidal approach for pituitary adenomas and other sellar lesions: an

- assessment of efficacy, safety, and patient impressions. *Journal of neurosurgery* **98**, 350–358; 10.3171/jns.2003.98.2.0350 (2003).
57. Kelly, D. F. Transsphenoidal surgery for Cushing's disease: a review of success rates, remission predictors, management of failed surgery, and Nelson's Syndrome. *Neurosurgical focus* **23**, E5; 10.3171/foc.2007.23.3.7 (2007).
58. Aghi, M. K. Management of recurrent and refractory Cushing disease. *Nature clinical practice. Endocrinology & metabolism* **4**, 560–568; 10.1038/ncpendmet0947 (2008).
59. Laws, E. R., Reitmeyer, M., Thapar, K. & Vance, M. L. Cushing's disease resulting from pituitary corticotrophic microadenoma. Treatment results from transsphenoidal microsurgery and gamma knife radiosurgery. *Neuro-Chirurgie* **48**, 294–299 (2002).
60. Woo, Y. S. *et al.* Clinical and biochemical characteristics of adrenocorticotropin-secreting macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 4963–4969; 10.1210/jc.2005-0070 (2005).
61. Ayala, A. & Manzano, A. J. Detection of recurrent Cushing's disease: proposal for standardized patient monitoring following transsphenoidal surgery. *Journal of Neuro-Oncology* **119**, 235–242; 10.1007/s11060-014-1508-0 (2014).
62. Estrada, J. *et al.* The long-term outcome of pituitary irradiation after unsuccessful transsphenoidal surgery in Cushing's disease. *The New England journal of medicine* **336**, 172–177; 10.1056/NEJM199701163360303 (1997).
63. Tritos, N. A. & Biller, B. M. K. Update on radiation therapy in patients with Cushing's disease. *Pituitary* **18**, 263–268; 10.1007/s11102-014-0615-4 (2015).
64. Cuevas-Ramos, D., Lim, D. S. T. & Fleseriu, M. Update on medical treatment for Cushing's disease. *Clin Diabetes Endocrinol* **2**, eCollection 10.1186/s40842-016-0033-9 (2016).

65. Feelders, R. A. & Hofland, L. J. Medical treatment of Cushing's disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **98**, 425–438; 10.1210/jc.2012-3126 (2013).
66. Störmann, S. & Schopohl, J. New and emerging drug therapies for Cushing's disease. *Expert opinion on pharmacotherapy* **19**, 1187–1200; 10.1080/14656566.2018.1504021 (2018).
67. Theodoropoulou, M. & Reincke, M. Tumor-Directed Therapeutic Targets in Cushing Disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **104**, 925–933; 10.1210/jc.2018-02080 (2019).
68. Lacroix, A., Feelders, R. A., Stratakis, C. A. & Nieman, L. K. Cushing's syndrome. *The Lancet* **386**, 913–927; 10.1016/S0140-6736(14)61375-1 (2015).
69. Ritzel, K. *et al.* Clinical review: Outcome of bilateral adrenalectomy in Cushing's syndrome: a systematic review. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **98**, 3939–3948; 10.1210/jc.2013-1470 (2013).
70. Zhang, X. *et al.* Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 761–767; 10.1210/jcem.84.2.5432 (1999).
71. Bamberger, C. M. *et al.* Reduced expression levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 in human pituitary adenomas. *European Journal of Endocrinology* **140**, 250–255 (1999).
72. Lidhar, K. *et al.* Low expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal corticotroph cells, corticotroph tumors, and malignant pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 3823–3830; 10.1210/jcem.84.10.6066 (1999).
73. Lloyd, R. v., Jin, L., Qian, X. & Kulig, E. Aberrant p27kip1 expression in endocrine and other tumors. *The American Journal of Pathology* **150**, 401–407 (1997).

74. Jordan, S., Lidhar, K., Korbonits, M., Lowe, D. G. & Grossman, A. B. Cyclin D and cyclin E expression in normal and adenomatous pituitary. *European Journal of Endocrinology* **143**, R1-6 (2000).
75. Turner, H. E., Nagy, Z., Sullivan, N., Esiri, M. M. & Wass, J. A. Expression analysis of cyclins in pituitary adenomas and the normal pituitary gland. *Clin Endocrinol (Oxf)* **53**, 337–344; 10.1046/j.1365-2265.2000.01088.x (2000).
76. Dahia, P. L. & Grossman, A. B. The molecular pathogenesis of corticotroph tumors. *Endocrine reviews* **20**, 136–155; 10.1210/edrv.20.2.0358 (1999).
77. Polk, D. H. *et al.* Epidermal growth factor acts as a corticotropin-releasing factor in chronically catheterized fetal lambs. *The Journal of clinical investigation* **79**, 984–988; 10.1172/JCI112910 (1987).
78. Luger, A. *et al.* Interaction of epidermal growth factor with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: potential physiologic relevance. *J Clin Endocrinol Metab* **66**, 334–337; 10.1210/jcem-66-2-334 (1988).
79. Theodoropoulou, M. *et al.* Expression of epidermal growth factor receptor in neoplastic pituitary cells: evidence for a role in corticotropinoma cells. *The Journal of endocrinology* **183**, 385–394; 10.1677/joe.1.05616 (2004).
80. Fukuoka, H. *et al.* EGFR as a therapeutic target for human, canine, and mouse ACTH-secreting pituitary adenomas. *The Journal of clinical investigation* **121**, 4712–4721; 10.1172/JCI60417 (2011).
81. Roussel-Gervais, A. *et al.* The Cables1 Gene in Glucocorticoid Regulation of Pituitary Corticotrope Growth and Cushing Disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **101**, 513–522; 10.1210/jc.2015-3324 (2016).
82. Hernández-Ramírez, L. C. *et al.* Loss-of-function mutations in the CABLES1 gene are a novel cause of Cushing's disease. *Endocrine-related cancer* **24**, 379–392; 10.1530/ERC-17-0131 (2017).

- 83.Zhang, D., Bergsneider, M., Wang, M. B. & Heaney, A. P. Targeting the ERK pathway for the treatment of Cushing's disease. *Oncotarget* **7**, 69149–69158; 10.18632/oncotarget.12381 (2016).
- 84.Paez-Pereda, M. *et al.* Involvement of bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) in pituitary prolactinoma pathogenesis through a Smad/estrogen receptor crosstalk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 1034–1039; 10.1073/pnas.0237312100 (2003).
- 85.Giacomini, D. *et al.* Bone morphogenetic protein-4 inhibits corticotroph tumor cells: involvement in the retinoic acid inhibitory action. *Endocrinology* **147**, 247–256; 10.1210/en.2005-0958 (2006).
- 86.Bottoni, A. *et al.* Identification of differentially expressed microRNAs by microarray: a possible role for microRNA genes in pituitary adenomas. *Journal of cellular physiology* **210**, 370–377; 10.1002/jcp.20832 (2007).
- 87.Arzt, E. *et al.* Pathophysiological role of the cytokine network in the anterior pituitary gland. *Frontiers in neuroendocrinology* **20**, 71–95; 10.1006/frne.1998.0176 (1999).
- 88.Pereda, M. P. *et al.* Interleukin-6 is inhibited by glucocorticoids and stimulates ACTH secretion and POMC expression in human corticotroph pituitary adenomas. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* **108**, 202–207 (2000).
- 89.Ray, D. W., Ren, S. G. & Melmed, S. Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates proopiomelanocortin (POMC) expression in a corticotroph cell line. Role of STAT pathway. *J Clin Invest* **97**, 1852–1859; 10.1172/JCI118615 (1996).
- 90.Yano, H., Readhead, C., Nakashima, M., Ren, S. G. & Melmed, S. Pituitary-directed leukemia inhibitory factor transgene causes Cushing's syndrome: neuro-immune-endocrine modulation of pituitary development. *Molecular*

- endocrinology (Baltimore, Md.)* **12**, 1708–1720; 10.1210/mend.12.11.0200 (1998).
91. Stevens, A. & White, A. ACTH: cellular peptide hormone synthesis and secretory pathways. *Results and problems in cell differentiation* **50**, 63–84; 10.1007/400_2009_30 (2010).
92. Tateno, T. *et al.* Differential gene expression in ACTH -secreting and non-functioning pituitary tumors. *European Journal of Endocrinology* **157**, 717–724; 10.1530/EJE-07-0428 (2007).
93. Dieterich, K. D., Gundelfinger, E. D., Lüdecke, D. K. & Lehnert, H. Mutation and expression analysis of corticotropin-releasing factor 1 receptor in adrenocorticotropin-secreting pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 3327–3331; 10.1210/jcem.83.9.5114 (1998).
94. Luque, R. M. *et al.* A cellular and molecular basis for the selective desmopressin-induced ACTH release in Cushing disease patients: key role of AVPR1b receptor and potential therapeutic implications. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **98**, 4160–4169; 10.1210/jc.2013-1992 (2013).
95. Griebel, G., Beeské, S. & Stahl, S. M. The vasopressin V(1b) receptor antagonist SSR149415 in the treatment of major depressive and generalized anxiety disorders: results from 4 randomized, double-blind, placebo-controlled studies. *The Journal of clinical psychiatry* **73**, 1403–1411; 10.4088/JCP.12m07804 (2012).
96. Dahia, P. L. *et al.* Vasopressin receptor expression and mutation analysis in corticotropin-secreting tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 1768–1771; 10.1210/jcem.81.5.8626831 (1996).
97. Keyzer, Y. de *et al.* The pituitary V3 vasopressin receptor and the corticotroph phenotype in ectopic ACTH syndrome. *J Clin Invest* **97**, 1311–1318; 10.1172/JCI118547 (1996).

98. Morris, D. G. *et al.* Identification of adrenocorticotropin receptor messenger ribonucleic acid in the human pituitary and its loss of expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 6080–6087; 10.1210/jc.2002-022048 (2003).
99. Du, L. *et al.* Evidence for orphan nuclear receptor TR4 in the etiology of Cushing disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 8555–8560; 10.1073/pnas.1306182110 (2013).
100. Zhang, D., Du, L. & Heaney, A. P. Testicular Receptor-4: Novel Regulator of Glucocorticoid Resistance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **101**, 3123–3133; 10.1210/jc.2016-1379 (2016).
101. Antonini, S. R. R. *et al.* Glucocorticoid receptor gene polymorphisms in ACTH-secreting pituitary tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)* **57**, 657–662 (2002).
102. Dahia, P. L. *et al.* Expression of glucocorticoid receptor gene isoforms in corticotropin-secreting tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **82**, 1088–1093; 10.1210/jcem.82.4.3861 (1997).
103. Korbonits, M. *et al.* Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoenzymes in the human pituitary: induction of the type 2 enzyme in corticotropinomas and other pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 2728–2733; 10.1210/jcem.86.6.7563 (2001).
104. Rabbitt, E. H. *et al.* Abnormal expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pituitary adenomas: a prereceptor determinant of pituitary cell proliferation. *Oncogene* **22**, 1663; 10.1038/sj.onc.1206293 (2003).
105. Bilodeau, S. *et al.* Role of Brg1 and HDAC2 in GR trans-repression of the pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease. *Genes & development* **20**, 2871–2886; 10.1101/gad.1444606 (2006).
106. Drouin, J., Bilodeau, S. & Vallette, S. Of old and new diseases: genetics of pituitary ACTH excess (Cushing) and deficiency. *Clinical genetics* **72**, 175–182; 10.1111/j.1399-0004.2007.00877.x (2007).

107. Pratt, W. B. & Toft, D. O. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine reviews* **18**, 306–360; 10.1210/edrv.18.3.0303 (1997).
108. Picard, D. *et al.* Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature* **348**, 166–168; 10.1038/348166a0 (1990).
109. Freeman, B. C. & Yamamoto, K. R. Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones. *Science (New York, N.Y.)* **296**, 2232–2235; 10.1126/science.1073051 (2002).
110. Kang, K. I. *et al.* The molecular chaperone Hsp90 can negatively regulate the activity of a glucocorticosteroid-dependent promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 1439–1444 (1999).
111. Riebold, M. *et al.* A C-terminal HSP90 inhibitor restores glucocorticoid sensitivity and relieves a mouse allograft model of Cushing disease. *Nature medicine* **21**, 276–280; 10.1038/nm.3776 (2015).
112. Xiong, Q. & Ge, W. Gene mutations in Cushing's disease. *Biomedical reports* **5**, 277–282; 10.3892/br.2016.729 (2016).
113. Daniel, E. & Newell-Price, J. Recent advances in understanding Cushing disease: resistance to glucocorticoid negative feedback and somatic USP8 mutations. *F1000Research* **6**, 613; 10.12688/f1000research.10968.1 (2017).
114. Dworakowska, D. & Grossman, A. B. The molecular pathogenesis of corticotroph tumours. *European journal of clinical investigation* **42**, 665–676; 10.1111/j.1365-2362.2011.02621.x (2012).
115. Kawashima, S. - T. *et al.* P53 gene mutation in an atypical corticotroph adenoma with Cushing's disease. *Clinical endocrinology* **70**, 656–657; 10.1111/j.1365-2265.2008.03404.x (2009).
116. Tanizaki, Y. *et al.* P53 Gene Mutations in Pituitary Carcinomas. *Endocrine Pathology* **18**, 217–222; 10.1007/s12022-007-9006-y (2007).

117. Sbiera, S. *et al.* Driver mutations in USP8 wild type Cushing's disease. *Neuro-oncology*; **21**, 1273-1283; 10.1093/neuonc/noz109 (2019).
118. Sbiera, S. *et al.* The New Genetic Landscape of Cushing's Disease: Deubiquitinases in the Spotlight. *Cancers* **11**; 1761; 10.3390/cancers11111761 (2019).
119. Ma, Z.-Y. *et al.* Recurrent gain-of-function USP8 mutations in Cushing's disease. *Cell research* **25**, 306–317; 10.1038/cr.2015.20 (2015).
120. Reincke, M. *et al.* Mutations in the deubiquitinase gene USP8 cause Cushing's disease. *Nature genetics* **47**, 31–38; 10.1038/ng.3166 (2015).
121. Chen, J. *et al.* Identification of recurrent USP48 and BRAF mutations in Cushing's disease. *Nature communications* **9**, 3171; 10.1038/s41467-018-05275-5 (2018).
122. Roussel-Gervais, A. *et al.* Cooperation between cyclin E and p27(Kip1) in pituitary tumorigenesis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **24**, 1835–1845; 10.1210/me.2010-0091 (2010).
123. Perez-Rivas, L. G. *et al.* The Gene of the Ubiquitin-Specific Protease 8 Is Frequently Mutated in Adenomas Causing Cushing's Disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **100**, E997-1004; 10.1210/jc.2015-1453 (2015).
124. Ballmann, C. *et al.* USP8 Mutations in Pituitary Cushing Adenomas- Targeted Analysis by Next-Generation Sequencing. *Journal of the Endocrine Society* **2**, 266–278; 10.1210/js.2017-00364 (2018).
125. Pérez-Rivas, L. G. *et al.* Somatic USP8 mutations are frequent events in corticotroph tumor progression causing Nelson's tumor. *European Journal of Endocrinology* **178**, 57–63; 10.1530/EJE-17-0634 (2018).
126. Sbiera, S. *et al.* Lack of Ubiquitin Specific Protease 8 (USP8) Mutations in Canine Corticotroph Pituitary Adenomas. *PloS one* **11**, e0169009; 10.1371/journal.pone.0169009 (2016).

127. Stringer, D. K. & Piper, R. C. Terminating protein ubiquitination: Hasta la vista, ubiquitin. *Cell Cycle* **10**, 3067–3071; 10.4161/cc.10.18.17191 (2011).
128. Faesen, A. C., Luna-Vargas, M. P. A. & Sixma, T. K. The role of UBL domains in ubiquitin-specific proteases. *Biochemical Society transactions* **40**, 539–545; 10.1042/BST20120004 (2012).
129. Smith, G. A. *et al.* VEGFR2 Trafficking, Signaling and Proteolysis is Regulated by the Ubiquitin Isopeptidase USP8. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **17**, 53–65; 10.1111/tra.12341 (2016).
130. Jacomin, A.-C. *et al.* The Deubiquitinating Enzyme UBPY Is Required for Lysosomal Biogenesis and Productive Autophagy in *Drosophila*. *PLoS one* **10**, e0143078; 10.1371/journal.pone.0143078 (2015).
131. Mizuno, E. *et al.* Regulation of epidermal growth factor receptor down-regulation by UBPY-mediated deubiquitination at endosomes. *Molecular biology of the cell* **16**, 5163–5174; 10.1091/mbc.e05-06-0560 (2005).
132. Niendorf, S. *et al.* Essential role of ubiquitin-specific protease 8 for receptor tyrosine kinase stability and endocytic trafficking in vivo. *Molecular and cellular biology* **27**, 5029–5039; 10.1128/MCB.01566-06 (2007).
133. Gong, B., Radulovic, M., Figueiredo-Pereira, M. E. & Cardozo, C. The Ubiquitin-Proteasome System: Potential Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease and Spinal Cord Injury. *Frontiers in molecular neuroscience* **9**, 4; 10.3389/fnmol.2016.00004 (2016).
134. Centorrino, F., Ballone, A., Wolter, M. & Ottmann, C. Biophysical and structural insight into the USP8/14-3-3 interaction. *FEBS letters* **592**, 1211–1220; 10.1002/1873-3468.13017 (2018).
135. He, M. *et al.* The emerging role of deubiquitinating enzymes in genomic integrity, diseases, and therapeutics. *Cell & bioscience* **6**, 62; 10.1186/s13578-016-0127-1 (2016).

136. Lei, H., Shan, H. & Wu, Y. Targeting deubiquitinating enzymes in cancer stem cells. *Cancer cell international* **17**, 101; 10.1186/s12935-017-0472-0 (2017).
137. Perez-Rivas, L. G. & Reincke, M. Genetics of Cushing's disease: an update. *Journal of endocrinological investigation* **39**, 29–35; 10.1007/s40618-015-0353-0 (2016).
138. Hayashi, K. *et al.* The USP8 mutational status may predict drug susceptibility in corticotroph adenomas of Cushing's disease. *European Journal of Endocrinology* **174**, 213–226; 10.1530/EJE-15-0689 (2016).
139. Cooper, O., Vlotides, G., Fukuoka, H., Greene, M. I. & Melmed, S. Expression and function of ErbB receptors and ligands in the pituitary. *Endocrine-related cancer* **18**, R197-211; 10.1530/ERC-11-0066 (2011).
140. Jian, F.-F. *et al.* Inhibition of Ubiquitin-specific Peptidase 8 Suppresses Adrenocorticotrophic Hormone Production and Tumorous Corticotroph Cell Growth in AtT20 Cells. *Chinese medical journal* **129**, 2102–2108; 10.4103/0366-6999.189047 (2016).
141. Sesta, A., Cassarino, M. F., Cavagnini, F. & Pecori Giraldi, F. Role of the ubiquitin/proteasome system on ACTH turnover in rat corticotropes. *Endocrine* **61**, 511–517; 10.1007/s12020-018-1573-9 (2018).
142. Kageyama, K. *et al.* Differential regulation of CREB and ERK phosphorylation through corticotropin-releasing factor receptors type 1 and 2 in AtT-20 and A7r5 cells. *Molecular and cellular endocrinology* **263**, 90–102; 10.1016/j.mce.2006.08.011 (2007).
143. Weigand, I. *et al.* Impact of USP8 gene mutations on protein deregulation in Cushing's disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*; 10.1210/jc.2018-02564 (2019).
144. Kim, S.-W., Roh, J. & Park, C.-S. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *Journal of Pathology and Translational Medicine* **50**, 411–418; 10.4132/jptm.2016.08.08 (2016).

145. Al-Haddad, S. *et al.* Psoriasin (S100A7) expression and invasive breast cancer. *The American Journal of Pathology* **155**, 2057–2066; 10.1016/S0002-9440(10)65524-1 (1999).
146. Handra-Luca, A., Bilal, H., Bertrand, J.-C. & Fouret, P. Extra-Cellular Signal-Regulated ERK-1/ERK-2 Pathway Activation in Human Salivary Gland Mucoepidermoid Carcinoma : Association to Aggressive Tumor Behavior and Tumor Cell Proliferation. *The American Journal of Pathology* **163**, 957–967 (2003).
147. Olaussen, K. A. *et al.* DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *The New England journal of medicine* **355**, 983–991; 10.1056/NEJMoa060570 (2006).
148. Faucz, F. R. *et al.* Somatic USP8 Gene Mutations Are a Common Cause of Pediatric Cushing Disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **102**, 2836–2843; 10.1210/jc.2017-00161 (2017).
149. Araki, T. *et al.* EGFR Induces E2F1-Mediated Corticotroph Tumorigenesis. *Journal of the Endocrine Society* **1**, 127–143; 10.1210/js.2016-1053 (2017).
150. Lloyd, R. v. *et al.* p27kip1: A Multifunctional Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor with Prognostic Significance in Human Cancers. *The American Journal of Pathology* **154**, 313–323; 10.1016/S0002-9440(10)65277-7 (1999).
151. Lee, H. T., Kim, T. Y. & Kay, E. P. Cdk4 and p27Kip1 play a role in PLC-gamma1-mediated mitogenic signaling pathway of 18 kDa FGF-2 in corneal endothelial cells. *Molecular vision* **8**, 17–25 (2002).
152. Jin, L. *et al.* Transforming growth factor-beta, transforming growth factor-beta receptor II, and p27Kip1 expression in nontumorous and neoplastic human pituitaries. *The American Journal of Pathology* **151**, 509–519 (1997).
153. Liu, N.-A. *et al.* Targeting zebrafish and murine pituitary corticotroph tumors with a cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 8414–8419; 10.1073/pnas.1018091108 (2011).

154. Keyzer, Y. de, Rene, P., Beldjord, C., Lenne, F. & Bertagna, X. Overexpression of vasopressin (V3) and corticotrophin-releasing hormone receptor genes in corticotroph tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)* **49**, 475–482; 10.1046/j.1365-2265.1998.00560.x (1998).
155. Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R. & Aebersold, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and cellular biology* **19**, 1720–1730 (1999).
156. Maier, T., Güell, M. & Serrano, L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS letters* **583**, 3966–3973; 10.1016/j.febslet.2009.10.036 (2009).
157. Sousa Abreu, R. de, Penalva, L. O., Marcotte, E. M. & Vogel, C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Molecular bioSystems* **5**, 1512–1526; 10.1039/b908315d (2009).
158. Pecori Giraldi, F. *et al.* Corticotrophin-releasing activity of desmopressin in Cushing's disease: lack of correlation between in vivo and in vitro responsiveness. *The Journal of endocrinology* **177**, 373–379 (2003).
159. Sanchez, E. R. *et al.* Hormone-free mouse glucocorticoid receptors overexpressed in Chinese hamster ovary cells are localized to the nucleus and are associated with both hsp70 and hsp90. *The Journal of biological chemistry* **265**, 20123–20130 (1990).

7. Tabellen-und Abbildungsverzeichnis

7.1. Tabellen

Tabellennummer	Bezeichnung	Seitenzahl
Tabelle 1	Mögliche Zielproteine von USP8	21
Tabelle 2	Umrechnung der Tumorgrößen in mm	25
Tabelle 3	Übersicht über verwendete Substanzen und Materialien	27
Tabelle 4	Verwendete Antikörper	28
Tabelle 5	Stufen der Färbeintensität	30
Tabelle 6	Score Prozentsatz positiver Zellen	31
Tabelle 7	Vergleich klinischer Daten bei USP8 mutierten und WT Tumoren	36
Tabelle 8	Vergleich der prä-und postoperativen Hormonspiegel bei USP8 mutierten und WT Tumoren	38

7.2. Abbildungen

Abbildungsnummer	Bezeichnung	Seitenzahl
Abbildung 1	Regulation der Cortisol-Produktion in der Nebennierenrinde durch Hypothalamus und Hypophyse	2
Abbildung 2	Klassifikation des Cushing-Syndroms	3
Abbildung 3	Ubiquitinierung und Deubiquitinierung	16
Abbildung 4	14-3-3 Bindungsmotiv	17
Abbildung 5	Schematische Darstellung des postulierten Mechanismus durch den eine USP8 Mutation zu einer erhöhten ACTH Sekretion und Tumorgenese in	18

	corticotropen Tumoren führt / USP8 – EGFR Interaktion	
Abbildung 6	Normale Wege in einer corticotropen Zelle sowie Darstellung deregulierter Proteine als mögliche Angriffspunkte für USP8	20
Abbildung 7	gesamtes Patientenkollektiv für die Analyse der klinischen Daten	24
Abbildung 8	Gesamtes Probenkollektiv für die immunhistochemische Färbung	25
Abbildung 9	Polymerische Signalamplifikation mittels DAB, H2O2 und HRP	29
Abbildung 10	Immunhistochemische Färbung USP8	40
Abbildung 11	Immunhistochemische Färbung EGFR	41
Abbildung 12	Immunhistochemische Färbung P27/Kip1	42
Abbildung 13	Immunhistochemische Färbung Cyclin E	43
Abbildung 14	Immunhistochemische Färbung CRHR1	44
Abbildung 15	Immunhistochemische Färbung AVPR1b	46
Abbildung 16	Immunhistochemische Färbung TR4	47
Abbildung 17	Immunhistochemische Färbung HSP90	48
Abbildung 18	Immunhistochemische Färbung CREB	49
Abbildung 19	Immunhistochemische Färbung pCREB	50
Abbildung 20	Immunhistochemische Färbung PKA	51

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn. Prof. Dr. med. Martin Fassnacht für die Möglichkeit der Promotion in der Endokrinologie der Julius-Maximilian-Universität Würzburg bedanken. Vielen Dank für den fachlichen Rat und die zahlreichen, wertvollen und vor allem zeitnahen Verbesserungsvorschläge.

Des Weiteren möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Silviu Sbiera meinen Dank aussprechen. Ein herzliches Dankeschön für die Unterstützung und die gute Kommunikation.

Frau Dr. rer. nat. Isabel Weigand danke ich für die stetige Hilfe und die ausgesprochen unkomplizierte und spannende Zusammenarbeit. Vielen Dank, dass du mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standest.

Dankeschön an Frau Dr. med. Camelia-Maria Monoranu, die mir die Neuropathologie näherbringen konnte.

Ein Dank geht zudem an das Uniklinikum Hamburg Eppendorf; hier wurde mir die Datenrecherche durch große Hilfsbereitschaft um einiges leichter gemacht.

Zuletzt möchte ich mich natürlich bei meiner wundervollen Familie und meinem Freund bedanken, die mich jederzeit mit Spaß, Motivation und Liebe unterstützt haben. Ohne euch wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin.