

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. Ludwig Gortner

**Einfluss von Einzelnukleotid-Polymorphismen auf die
Ansprechbarkeit einer rekombinanten Wachstumshormon-Therapie
bei Kindern mit einem Wachstumshormonmangel**

***Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2016***

vorgelegt von
Anna-Maria Jung
geboren am 30. April 1989
in Saarbrücken

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS 2

1 ZUSAMMENFASSUNGEN..... 5

1.1 Deutsche Zusammenfassung 5

1.2 Englische Zusammenfassung: Genetic polymorphisms as predictive markers of response to growth hormone therapy in paediatric growth hormone deficiency 6

2 EINLEITUNG 7

2.1 Wachstumshormonmangel..... 7

 2.1.1 Ursachen des Wachstumshormonmangels 7

 2.1.2 Diagnostik des Wachstumshormonmangels..... 8

 2.1.3 Therapie des Wachstumshormonmangels 15

2.2 Physiologisches Wachstum und endokrinologische Regulation 18

 2.2.1 Wachstumshormonachse 18

 2.2.2 Wachstumsfuge 22

 2.2.3 Zellzyklus 25

 2.2.4 Einflüsse genetischer Variationen 27

2.3 Fragestellung 30

3 MATERIAL UND METHODEN 32

3.1 Material 32

 3.1.1 Substanzen..... 32

 3.1.2 Geräte 34

 3.1.3 Programme 35

 3.1.4 Primer 36

 3.1.5 Patientenblut..... 37

3.2 Methoden	39
3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
3.2.2 Gelelektrophorese	40
3.2.3 DNA Extraktion	41
3.2.4 SNP - Projekt	43
3.2.4.1 High Resolution Melting	44
3.2.4.2 DNA-Sequenzierung	55
3.2.5 GHR Exon 3 Deletion - Projekt	63
3.2.5.1 Primertestung - PCR	63
3.2.5.2 PCR der DNA Proben	65
3.2.6 Statistik	66
4 ERGEBNISSE	70
4.1 SNP - Projekt	70
4.1.1 SNP rs2888586 im SOS1 Gen	70
4.1.2 SNP rs2069502 im CDK4 Gen	74
4.1.3 Einfluss von weiteren 11 SNPs auf die Ansprechrate einer rhGH Therapie.....	78
4.2 GHR Exon 3 Deletion - Projekt	82
5 DISKUSSION	88
5.1 Index of Responsiveness	88
5.2 SNP - Projekt	91
5.2.1 Wachstumshormonachse	92
5.2.2 Wachstumsfuge	99
5.2.3 Zellzyklus	100
5.3 GHR Exon 3 Deletion - Projekt	102
6 ANHANG	107
6.1 Abkürzungen	107

6.2 HRM - Abbildungen.....	110
6.2.1 Wachstumshormonachse	110
6.2.2 Wachstumsfuge	126
6.2.3 Zellzyklus	131
6.3 Gelbilder GHR Exon 3 Deletion - Projekt.....	134
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	138
8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	154
9 TABELLENVERZEICHNIS.....	158
10 PUBLIKATIONEN.....	161
11 DANKSAGUNG	162

1 ZUSAMMENFASSUNGEN

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Der Wachstumshormonmangel (growth hormone deficiency, GHD) stellt die häufigste endokrinologische Ursache für pathologisches Wachstum dar und wird seit den 80er Jahren mit rekombinantem Wachstumshormon (recombinant human growth hormone, rhGH) behandelt. Ein vollständiges Aufholwachstum bzw. eine Endgröße im genetischen Zielbereich kann jedoch trotz standardisierter Therapierichtlinien nicht immer erreicht werden. Grund hierfür ist die große Variationsbreite in der Ansprechbarkeit auf rekombinantes Wachstumshormon, deren Ursache noch nicht vollständig geklärt werden konnte. Neben zahlreichen auxologischen und laborchemischen Parametern erscheinen auch genetische Faktoren von Bedeutung. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von 13 verschiedenen, in Genen der Wachstumshormonachse, der Wachstumsfuge und des Zellzyklus lokalisierten Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNP) und der Einfluss einer Deletion im Exon 3 des Wachstumshormon-Rezeptors (growth hormone receptor, GHR) auf die Ansprechbarkeit einer rekombinanten Wachstumshormon-Therapie untersucht. Bei zwei der 13 untersuchten SNPs rs2888586 und rs2069502 konnte eine Korrelation hinsichtlich des Vorliegens einer homozygoten Mutante und eines schlechteren individuellen Ansprechens auf die Therapie mit rekombinantem Wachstumshormon festgestellt werden. Außerdem konnte die bereits in zahlreichen Studien aufgestellte Hypothese, dass eine Deletion im Exon 3 des Wachstumshormon-Rezeptors zu einem durchschnittlich besseren Ansprechverhalten führe, bestätigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass genetische Untersuchungen ein Ansatzpunkt für eine individuelle Therapie des Wachstumshormonmangels sind.

1.2 Englische Zusammenfassung: Genetic polymorphisms as predictive markers of response to growth hormone therapy in paediatric growth hormone deficiency

Growth hormone deficiency (GHD) is the most common endocrine cause of pathological growth, and treatment with recombinant human growth hormone (rhGH) has been available since the 1980s. Complete catch-up growth or final height within the genetic target height range cannot always be achieved despite standardized treatment guidelines. This is due to the great variability in responsiveness to recombinant growth hormone, the cause of which has not yet been completely elucidated. Besides numerous auxological and chemical parameters, genetic factors also appear to play an important role. This study analyzed the influence of 13 different single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in genes of the growth hormone axis, the growth plate, and the cell cycle, as well as the influence of a deletion in exon 3 of the growth hormone receptor (GHR) on the responsiveness to recombinant growth hormone therapy. In two of the 13 SNPs analyzed, rs2888586 und rs2069502, there was a correlation between a homozygous mutant and decreased individual responsiveness to treatment with recombinant growth hormone. Furthermore, the hypothesis postulated in many studies, was confirmed that a deletion in exon 3 of the growth hormone receptor causes an increase in responsiveness. The results of the present study show that genetic analyses are a starting point for the individualized treatment of growth hormone deficiency.

2 EINLEITUNG

2.1 Wachstumshormonmangel

2.1.1 Ursachen des Wachstumshormonmangels

Kleinwuchs ist definiert als Körperhöhe unterhalb der 3. Altersperzentile. Wird bei einem Kind ein Kleinwuchs diagnostiziert muss eine Vielzahl an Differentialdiagnosen in Betracht gezogen werden. Dazu gehören auch Normvarianten, wie der idiopathische Kleinwuchs und die konstitutionelle Verzögerung von Wachstum und Pubertät (KEV). Eine Möglichkeit der Einteilung pathologischer Ursachen für Kleinwuchs ist die Unterscheidung von dysproportioniertem und proportioniertem Kleinwuchs (s. Abb. 1), wobei der Wachstumshormonmangel zum „proportionierten Kleinwuchs“ zählt.

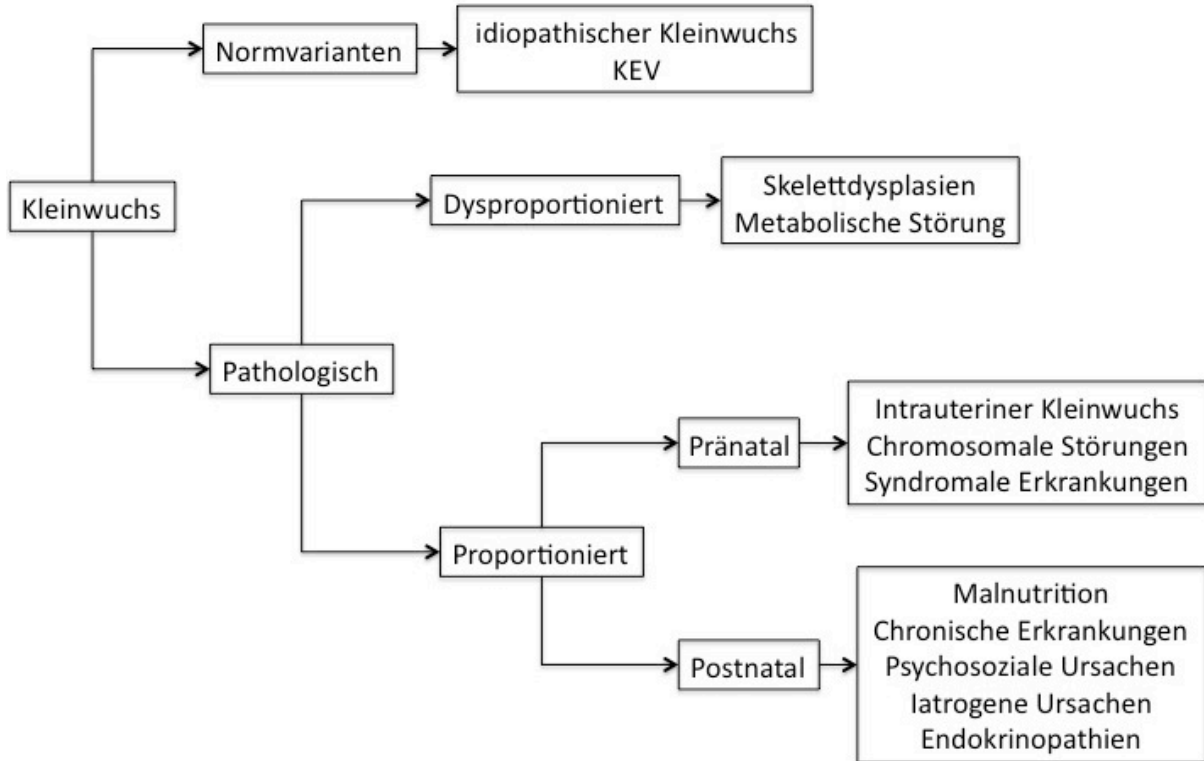


Abb. 1: Differentialdiagnosen des Kleinwuchses

Der Wachstumshormonmangel ist mit einer Prävalenz von 1:4.000 bis 1:30.000 (10) die häufigste endokrinologische Ursache für pathologisches Wachstum. Die Genese des Wachstumshormonmangels ist meist idiopathisch, also primären Ursprungs. Andere primäre Ursachen können in selteneren Fällen auch monogenische Defekte sein. Hierzu zählen Mutationen von Transkriptionsfaktoren der Hypothalamus-Hypophysen-Organogenese wie z.B. LHX4 (1q25) oder PROP1 (5q) (96) oder morphologische Fehlbildungen von Hypothalamus und/oder Hypophyse wie z.B. die septooptische Dysplasie. Sekundäre Ursachen eines Wachstumshormonmangels bezeichnen die Schädigung der Hypophyse bzw. des Hypothalamus durch Infektionen, Traumata, Tumorerkrankungen und chirurgische oder strahlentherapeutische Eingriffe.

2.1.2 Diagnostik des Wachstumshormonmangels

Der folgende Abschnitt ist an die AWMF- Leitlinie (Reg.- Nr. 174-002)

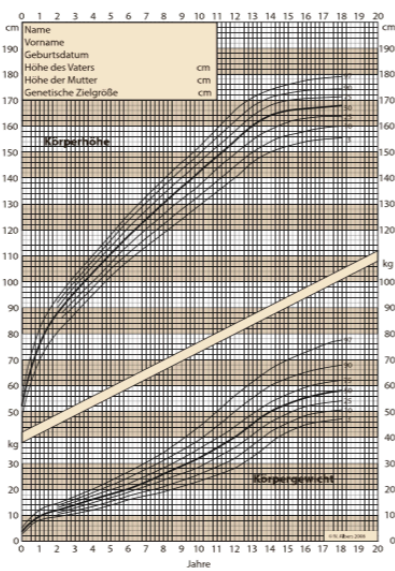
„Wachstumshormonmangel im Kindes- und Jugendalter, Diagnostik“ der Deutschen Gesellschaft für Kinderendokrinologie und -diabetologie (DGKED), der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE) und der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (DGKJ) angelehnt (10).

Besteht der Verdacht auf einen Wachstumshormonmangel müssen zunächst auxologische und klinische Parameter erhoben sowie anschließend laborchemische und radiologische Parameter bestimmt werden. Zeigen sich hier pathologische Befunde sollte eine Wachstumshormonstimulationstestung erfolgen.

Auxologische und Klinische Parameter

Das pathologische Wachstum stellt den Grundbaustein für die Diagnostik des Wachstumshormonmangels dar. Zur Beurteilung des Wachstums werden Perzentilenkurven für die Körperlänge bzw. -höhe und für die Wachstumsgeschwindigkeit genutzt (s. Abb. 2 und 3).

Wachstums- und Gewichtskurven, 0-18 Jahre, Mädchen



Wachstums- und Gewichtskurven, 0-18 Jahre, Jungen

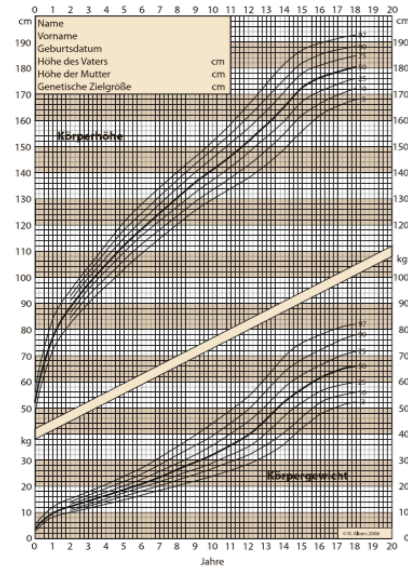
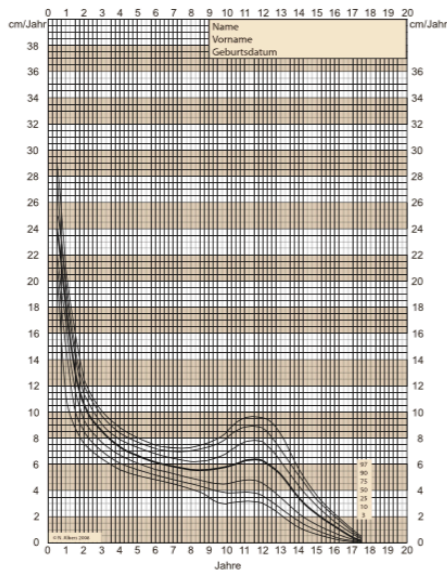


Abb. 2: Perzentilenkurven für Körperhöhe und -gewicht für Mädchen und Jungen im Alter von 0-18 Jahren nach Brandt 1986 (57)

Wachstumsgeschwindigkeit, 0-18 Jahre, Mädchen



Wachstumsgeschwindigkeit, 0-18 Jahre, Jungen

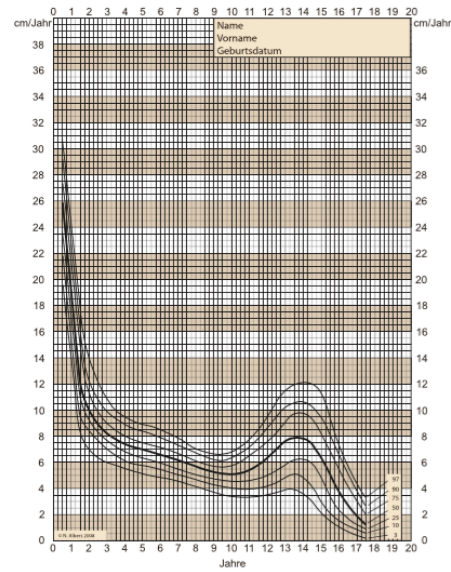


Abb. 3: Perzentilenkurven für die Wachstumsgeschwindigkeit für Mädchen und Jungen im Alter von 0-18 Jahren nach Brandt 1986 (57)

Zeigt sich bei einem Kind entweder ein Wachstum unterhalb des Perzentilenbereichs der genetischen Zielgröße (mittlere Elterngröße (MEG) + 6,5 cm bei Jungen; MEG – 6,5 cm bei Mädchen), nach zunächst normalem Wachstum ein Abfallen unter die 3.

Altersperzentile (sog. Perzentilenknick) oder eine Wachstumsgeschwindigkeit unterhalb der 25. Perzentile in einem Beobachtungszeitraum von mindestens 6 Monaten, sollten weiterführende Untersuchungen erfolgen. Zunächst müssen Normvarianten des Wachstums sowie alternative Diagnosen ausgeschlossen werden. Hierfür ist eine ausführliche Anamnese, eine pädiatrisch-internistische körperliche Untersuchung, die Bestimmung des Knochenalters anhand eines Röntgenbildes der linken Hand, sowie eventuell eine laborchemische Untersuchung notwendig (s. Abb. 1 Differenzialdiagnosen des Kleinwuchses).

Laborchemische Parameter

Da das Wachstumshormon-Releasing-Hormon (GHRH) pulsatil sezerniert wird und die Frequenz sowie Amplitude der GHRH Ausschüttung nachts am höchsten sind (s. 2.2.1), ist die einmalige laborchemische Bestimmung von Wachstumshormon nicht sinnvoll. Durch die Wachstumshormon-Stimulation (growth hormone, GH) werden von der Leber die Wachstumsfaktoren IGF1 und IGFBP3 gebildet, deren Konzentrationen aufgrund der relativ langen Halbwertszeit stabil im Serum oder Plasma messbar sind. Niedrige IGF1- oder IGFBP3-Werte sind also wegweisend für eine mangelhafte Wachstumshormonsekretion. Dabei muss berücksichtigt werden, dass auch andere Erkrankungen und Normvarianten des Wachstums mit geringeren IGF1- und IGFBP3-Plasmaspiegeln einhergehen können (10), die wie folgt lauten:

- Wachstumshormonmangel
- Hypothyreose
- Mangel an Sexualhormonen bei Hypogonadismus
- Konstitutionelle Verzögerung von Wachstum und Pubertät
- Akute oder chronische Mangelernährung
- Chronische organische Erkrankung
- Schwere Leberfunktionsstörungen
- Adipositas
- Schlecht eingestellter DM
- Sek. Wachstumshormon-Resistenz im Rahmen anderer Erkrankungen

Die Ermittlung der Konzentrationen von IGF1 und IGFBP3 sollte mit einer Methode erfolgen, für die „alters-, geschlechts-, und Pubertätsstadien-bezogene Referenzwerte“ vorliegen (10). IGF1- bzw. IGFBP3-Werte $< -1,0$ SDS (standard deviation score) werden als pathologisch betrachtet, IGF1- bzw. IGFBP3-Werte $> -1,0$ SDS sprechen eher gegen einen Wachstumshormonmangel.

Radiologische Parameter

Das chronologische Alter und das Knochenalter stimmen üblicherweise ± 1 Jahr überein. Eine Retardierung des Knochenalters hingegen spricht für eine Wachstumsstörung. Die Bestimmung des Skeletalters erfolgt demnach mit dem Ziel eine Reifungsverzögerung gegenüber dem chronologischen Alter ausfindig zu machen. Zu diesem Zweck wird ein Röntgenbild der linken Hand angefertigt. Nach der Methode nach Greulich und Pyle (51) oder nach Tanner und Whitehouse (144) wird das Knochenalter bestimmt bzw. die prospektive Endgröße nach Bayley und Pinneau (51) oder nach Tanner und Whitehouse (TW2) ermittelt (144). Eine Knochenalterretardierung > 1 SD wird als pathologisch angesehen und entspricht einer Reifungsverzögerung von einem dreiviertel Jahr im Alter zwischen 4 und 7 Jahren bzw. von über einem Jahr im Alter von mehr als 7 Jahren (57).

Erfüllt ein Kind sowohl die klinischen und auxologischen als auch die laborchemischen und radiologischen Kriterien ist eine Testung auf Wachstumshormonmangel indiziert (10).

Aufgrund der Sensitivität der Wachstumshormonstimulationsstests sollten immer zwei Testungen erfolgen. Die Testung erfolgt nach „mindestens sechs Stunden nächtlichen Fastens morgens am nüchternen und ruhenden Kind unter standardisierten Bedingungen und sorgfältiger Überwachung“ (10). Als Testsubstanzen können Arginin, Glukagon, Insulin (Stimulation durch Auslösen einer Hypoglykämie) oder Clonidin (Stimulation durch Aktivierung von α_2 -Rezeptoren mit konsekutiver Hypotonie) genutzt werden. Nach Gabe einer dieser Testsubstanzen erfolgen regelmäßige Messungen der GH-Konzentration aus einem liegenden venösen Zugang. Beim Einsatz der Test-

Substanzen Glukagon und Insulin sowie bei der Testung von Kindern unter 4 Jahren kann es zu gefährlichen Hypoglykämien kommen (9, 79, 131). Aufgrund der geringeren Nebenwirkungen finden die Test-Substanzen Arginin und Clonidin eine häufigere Anwendung (10). Alternativ kann auch durch häufige nächtliche Messungen (alle 20 min) die nächtliche Spontansekretion des Wachstumshormons gemessen werden. Bei präpubertären Jungen im Alter ≥ 10 Jahren sowie bei präpubertären Mädchen ≥ 8 Jahren muss vor Beginn des Wachstumshormonstimulationstests ein Priming mit Sexualsteroiden erfolgen. Bei Jungen werden hierfür z.B. „einmalig 50 mg Testosteron-Enantat i.m. sieben Tage vor der Testung verabreicht, bei Mädchen z.B. 1 mg Estradiolvalerat p.o. in den letzten drei Tagen vor Testung“ (10, 94, 101).

Unterschreitet die höchste gemessene Wachstumshormonkonzentration den cut-off Wert von 8 $\mu\text{g/l}$, so wird der Wachstumshormonstimulationstest als krankhaft gewertet (10). Dieser cut-off Wert gilt offiziell seit Juli 2008, zuvor galt der Test bereits unterhalb einer gemessenen Konzentration von 10 $\mu\text{g/l}$ als pathologisch. Das Patientenkollektiv dieser Arbeit beinhaltet zahlreiche Patienten mit Wachstumshormonstimulationstestung vor Juli 2008 weshalb bei diesen Kindern der veraltete cut-off Wert von 10 $\mu\text{g/l}$ verwendet wurde (s. Tab. 7). Ein Wachstumshormonmangel als Diagnose kann aber nur dann gestellt werden, wenn zwei pathologische Wachstumshormonstimulationstests vorliegen und die oben genannten Kriterien erfüllt sind. Eine Ausnahme bilden die im folgenden aufgelisteten Umstände unter denen bereits ein einmalig durchgeführter pathologischer Wachstumshormonstimulationstest ausreichend ist:

- Aplasie der Adenohypophyse und /oder einer ektop lokalisierten Neurohypophyse
- Z. n. Resektion der Hypophyse
- Z. n. Durchtrennung des Hypophysenstiels
- Monogener Wachstumshormonmangel
- Eindeutiger Nachweis des Mangels an zwei anderen hypophysären Hormonen

Sobald ein normales Testergebnis vorliegt, kann die Diagnose des Wachstumshormonmangels nicht gestellt werden und eine Retestung erst nach 12 Monaten bei persistierender Wachstumsstörung ohne ausreichende Erklärung erfolgen.

Wird ein Wachstumshormonmangel diagnostiziert, sollte eine bildliche Darstellung der Hypothalamus-Hypophysen-Region mittels Kernspintomographie zum Ausschluss einer onkologischen Grunderkrankung bzw. Fehlanlage der Hypophyse durchgeführt werden.

Der Ablauf der Diagnostik des Wachstumshormonmangels im Kindes- und Jugendalter ist nochmals als Flussdiagramm in Abb. 4 dargestellt.

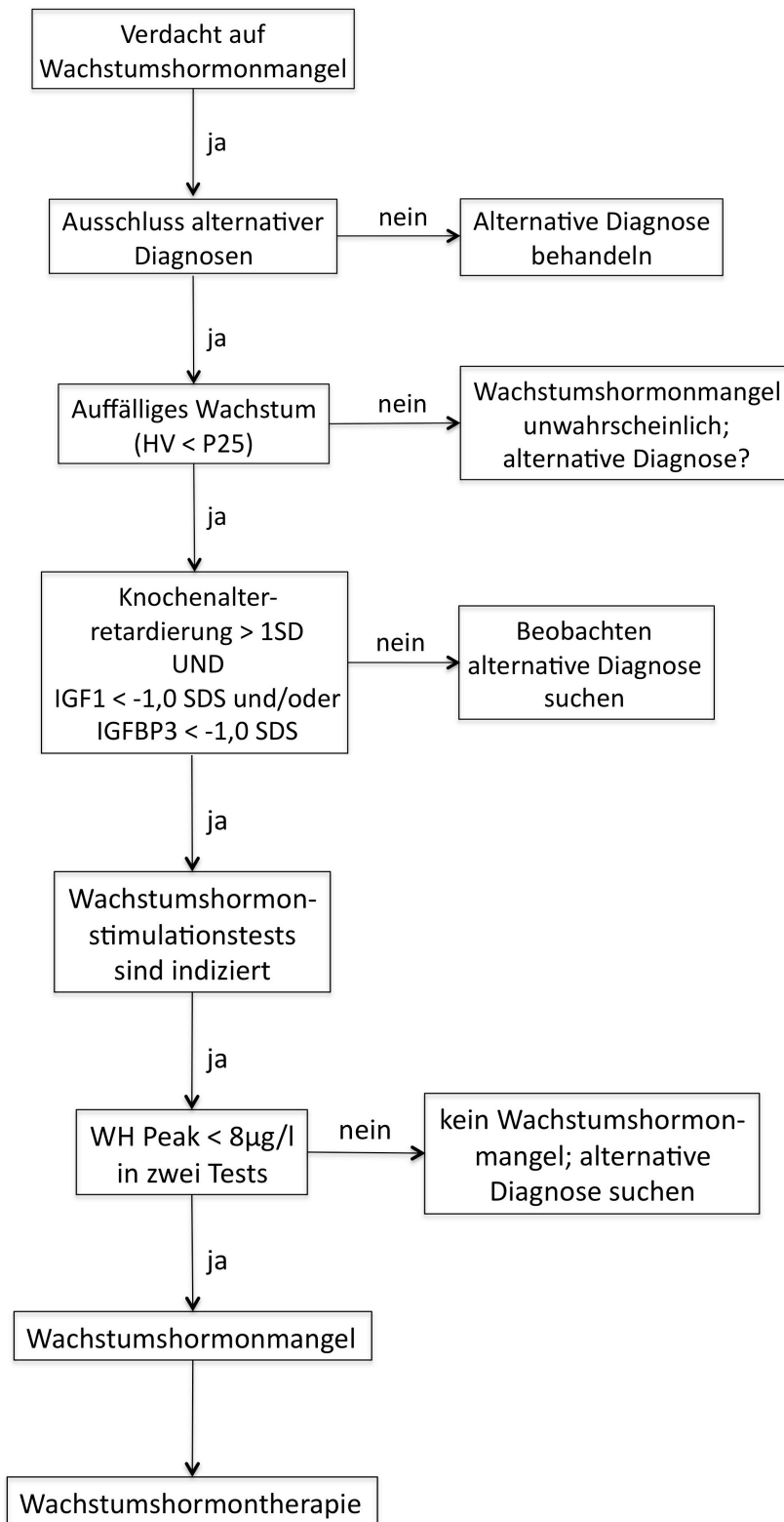


Abb. 4: Flussdiagramm zum Ablauf der Diagnostik des Wachstumshormonmangels im Kindes- und Jugendalter (10)

2.1.3 Therapie des Wachstumshormonmangels

Ist ein Wachstumshormonmangel nachgewiesen, liegt eine Indikation zur Behandlung mit rekombinantem humanem Wachstumshormon (rhGH) vor (10). Hierfür wird empfohlen täglich 25 bis 35 µg rhGH pro Kilogramm Körpergewicht subkutan zu applizieren. Eine Aufteilung der wöchentlichen rhGH Dosis in 7 Einzeldosen ist der Gabe von 2-3 wöchentlichen höheren rhGH Dosen in Bezug auf das Aufholwachstum überlegen (3, 71). Des Weiteren besteht kein Unterschied zwischen intramuskulärer und subkutaner Applikation, weshalb die nebenwirkungsärmere subkutane Applikation bevorzugt wird (2).

1958 beschrieb Raben erstmals die Wachstumszunahme eines an Wachstumshormonmangel leidenden Heranwachsenden unter Gabe von humanem GH (hGH) (112). Der Einsatz von GH als pharmakologische Therapie bei GHD war jedoch durch die geringe Menge an verfügbarem hGH eingeschränkt bis in den 1980ern schließlich rekombinantes humanes GH (rhGH) hergestellt werden konnte. In den folgenden Jahren wurde rhGH nicht nur bei GHD sondern auch bei zahlreichen anderen Erkrankungen die mit einem Kleinwuchs einhergehen, erfolgreich eingesetzt (z.B. das Ullrich-Turner-Syndrom, das Prader-Willi-Syndrom, die Niereninsuffizienz, der SHOX-Mangel-Kleinwuchs und der intrauterine Kleinwuchs) (121). Da in dieser Arbeit jedoch nur Kinder mit GHD untersucht wurden, wird im Folgenden lediglich auf diese Indikation eingegangen.

Das Ziel einer rhGH-Therapie besteht zunächst im Auslösen eines Aufholwachstums. Diese Phase des schnellen Wachstums dient dem Erreichen der altersentsprechenden Zielgröße (TH-SDS). Im Anschluss daran soll eine Phase der Aufrechterhaltung des „normalen Wachstums“ erfolgen, wobei der pubertäre Wachstumsschub zeitlich angepasst und adäquat beginnt (159). Letztendlich sollte die erreichte Größe möglichst nahe der genetischen Zielgröße liegen (s. Abb. 5).

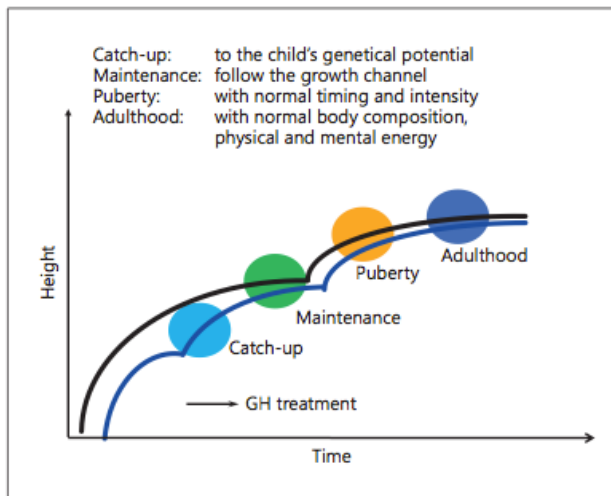


Abb. 5: Konzept der rhGH-Therapie nach Kriström und Wikland (77)

Obwohl die Therapie von GHD mit rhGH heutzutage zum Standard geworden ist, wird aufgrund folgender Punkte stets diskutiert, wie eine optimale rhGH-Therapie erfolgen sollte (157, 158):

- Ein vollständiges Aufholwachstum und eine Endgröße im genetischen Zielbereich kann nicht bei jedem Patienten erreicht werden (117)
- Eine Wachstumshormontherapie ist sehr kostenintensiv (86)
- Die Langzeitr Risiken sind noch nicht ausreichend erforscht, da die Therapie erst seit ca. 30 Jahren etabliert ist (21, 126)

Von den Langzeitr Risiken einer rhGH Therapie sind die äußerst selten auftretenden direkten Nebenwirkungen abzugrenzen, die bereits gut dokumentiert sind. Hierzu zählen vorübergehende Hautirritationen im Bereich der Injektionsstelle, lokale Überempfindlichkeitsreaktionen auf das Lösungsmittel, anfängliche Knöchelödeme, und Kopfschmerzen (57). Außerdem steigt die Inzidenz des idiopathischen Hirndrucks (sog. Pseudotumor cerebri) - die in der altersentsprechenden Normalpopulation mit 9:1.000.000 angegeben wird (50) – auf ungefähr 1:1.414 bei mit rhGH therapierten Kindern (36). Ähnliches gilt für die Häufigkeit der Epiphyseolysis capitis femoris. Diese wird im Alter vom 9. bis zum 16. LJ mit einer Inzidenz von 1:10.000 angegeben (88). Bei Kindern, die mit rhGH behandelt werden, steigt die Inzidenz auf 1:1.115 (36).

Sowohl der idiopathische Hirndruck als auch die Epiphyseolysis capitis femoris treten durch recht diffuse Symptome wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Sehstörungen, respektive Hüft-, Knie-, oder Oberschenkelschmerzen in Erscheinung, weshalb vor Therapiebeginn eine ausreichende Aufklärung der Eltern bzw. des Patienten erfolgen muss.

Die Langzeitrisiken einer rhGH Therapie werden derzeit umfangreich diskutiert (20, 21, 117, 126). Insbesondere das Auftreten einer Insulinresistenz, einer Leukämie, anderer Malignome oder Malignomrezidive werden diskutiert.

Zur Langzeitbeobachtung der Patienten mit rhGH Therapie werden seit 1987 alle Patientendaten und mögliche Nebenwirkungen und Langzeitrisiken in der Anwendungsbeobachtung KIGS (Fa. Pfizer) notiert. Auch andere Firmen, die rhGH vertreiben, haben in den letzten Jahren solche Datenbanken erstellt. Im KIGS konnte bei 23.333 Kindern eine Fallzahl von 18 neu diagnostizierten Diabetes mellitus (DM) Typ 2 und eine Fallzahl von 14 neu aufgetretenen Glukoseintoleranzen verzeichnet werden. Laut Cutfield et al. (32) entspricht das einer 6-fachen Risikoerhöhung für DM Typ 2. Das Risiko steigt mit der rhGH-Dosis. Sollte aufgrund der Grunderkrankung oder des Ansprechens eine Therapie mit mehr als 35 µg/kgKG/d erforderlich sein, sollte deshalb vor Beginn der ersten rhGH Gabe ein oraler Glukosetoleranztest erfolgen (57). Nach dem heutigen Kenntnisstand haben Kinder, die mit rhGH therapiert werden, kein erhöhtes Risiko an einem Malignom zu erkranken (156), auch die nicht, die bereits eine maligne Erkrankung in ihrer Krankheitsgeschichte vorweisen können (45). Hankison et al. konnten 1998 in einer epidemiologischen Studie zeigen, dass es in der Allgemeinbevölkerung einen Zusammenhang zwischen hohen IGF1-Serumkonzentrationen und dem Auftreten von Malignomen gibt (54). Leider konnte bis heute nicht herausgefunden werden, welche laborchemischen Parameter gemessen und beobachtet werden sollten, um Nebenwirkungen einer rhGH vermeiden zu können. Derzeit erfolgen Studien, ob z.B. eine IGF1-Serumbestimmung hilfreich sein könnte (25).

2.2 Physiologisches Wachstum und endokrinologische Regulation

Die Grundlage physiologischen Wachstums ist das Zusammenspiel von Zellvermehrung, Zellvergrößerung und kontrolliertem Zelltod, beeinflusst durch genetische Komponenten (s. 2.2.4.) und Umweltfaktoren wie die Ernährung. Wachstum erfolgt nicht kontinuierlich, sondern in Schüben, welche endogen ausgelöst werden. Karlberg veröffentlichte 1989 das sogenannte ICP-Modell (Infancy-Childhood-Puberty-Modell), welches zur Veranschaulichung kindlichen Wachstums, bestehend aus drei Hauptphasen, dient. Die erste Phase, genannt „Infancy-Komponente“, betrifft vorwiegend die ersten drei Lebensjahre und wird als Fortsetzung des fetalen Wachstums mit hoher Wachstumsgeschwindigkeit angesehen. In dieser Phase ist vor allem die Ernährung ausschlaggebend und weniger die GH-IGF1-Achse. Die zweite Phase, genannt „Childhood-Komponente“ zeichnet sich durch eine abnehmende Wachstumsgeschwindigkeit aus und erstreckt sich bis zum Beginn der Pubertät. Kontrolliert wird das Wachstum in dieser Zeitspanne hauptsächlich durch die GH-IGF1-Achse, weshalb der Wachstumshormonmangel meist zwischen dem 3. und 9. LJ diagnostiziert wird. Die dritte Phase, genannt „Puberty-Komponente“ setzt individuell zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein und wird durch Zusammenwirken von GH-IGF1-Achse und Sexualhormonen gesteuert. Mit Beendigung der „Puberty-Komponente“ wird das menschliche Wachstum abgeschlossen (57, 69).

2.2.1 Wachstumshormonachse

Für die Förderung und Koordination des postnatalen Wachstums ist das in der Adenohypophyse gebildete Wachstumshormon (GH) - auch genannt Somatotropin oder somatotropes Hormon - zuständig. Seine Wirkung wird hauptsächlich über die Bildung von insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (IGFs) vermittelt.

Diverse fördernde und hemmende Einflüsse wirken auf die Biosynthese und Sekretion des GH ein und ermöglichen so ein kontrolliertes Wachstum, das einen Rahmen nicht

über- oder unterschreitet. Zu den zwei stärksten Stimuli der GH Produktion und Sekretion zählen das Growth-Hormone-Releasing-Hormone (GHRH) und ein Peptid namens Ghrelin. Das GHRH wird im Hypothalamus hergestellt und bindet an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der sich auf den somatotropen Zellen der Adenohypophyse befindet, wodurch es zu einem Wachstumsimpuls der Zelle mit gesteigerter Produktion und Sekretion von GH kommt (29). Die zur geringen basalen Sekretion hinzukommende pulsatile Freisetzung von GHRH und die erhöhte nächtliche Frequenz und Amplitude der GHRH Ausschüttung ermöglichen eine Minimierung der insulinantagonistischen Wirkung. Zusätzlich ist eine Modulierung der Aktivität der GHRH-Neurone durch einige Neurotransmitter wie Acetylcholin und Noradrenalin möglich. Das appetitsteigernde Peptid Ghrelin wird in verschiedenen Gehirnregionen und im Magen gebildet und wirkt ebenfalls über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der sich sowohl auf den somatotropen Zellen der Adenohypophyse als auch im Hypothalamus selbst befindet, wo eine Aktivierung der GHRH-Ausschüttung initiiert wird (76). Synthese- und sekretionshemmend wirken vor allem das in D-Zellen des Pankreas, Magen, Darm und Hypothalamus gebildete Somatostatin und GH bzw. IGFs selbst im Sinne einer negativen Rückkopplung (s. Abb. 6). Dazu kommen weitere hemmende bzw. fördernde Einflüsse auf die Bildung von Somatostatin, GHRH und GH (s. Tab. 1).

Fördernde Einflüsse	Hemmende Einflüsse
- Schilddrüsenhormone	- Adipositas
- Östrogene und Testosteron	- Freie Fettsäuren
- Aminosäuren z.B. Arginin	- Kälte
- Hypoglykämie	- Chronischer Stress
- Kurzfristig erhöhte Kortisolspiegel	- Längerfristig erhöhte Kortisolspiegel
- Akuter Stress z.B. körperliche Aktivität, Schmerz	

Tab. 1: Regulation der GH-Sekretion

Das in der Hypophyse gebildete GH vermittelt seine Wirkung direkt und indirekt durch Bindung an Tyrosinkinase assoziierte Rezeptoren über eine Induktion der IGF-Synthese. Die gebildeten IGFs bilden im Blut zu fast 100% Komplexe mit sog. IGF-Bindungsproteinen (IGFBP 1-6) (7) - deren Expression ebenfalls durch GH gesteuert wird (8). Für die Wirksamkeit entscheidend ist auch eine Bindung an eine Acid labile Subunit (ALS), die ihre Halbwertszeit verlängern (s. Tab. 2). Der IGF1-Rezeptor gehört zur Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen und entspricht strukturell dem Insulinrezeptor, weshalb hohe Insulinkonzentrationen ebenfalls zu einer Aktivierung führen können (8). Von diesem IGF1-Rezeptor ist der IGF2-Rezeptor abzugrenzen. Dieser ist im Aufbau nicht verwandt mit dem Insulinrezeptor. Nach der Bindung von IGF2 führt er zu Endozytose und Abbau von IGF2 (sog. Clearance-Rezeptor).

Die Wirkmechanismen der GH-IGF-Achse können grob in zwei Kategorien - die Förderung des postnatalen Wachstums und die Beeinflussung von Protein-, Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel - eingeteilt werden.

	Halbwertszeit	Häufigkeit
IGF1	10 min	< 1%
IGF1 + IGFBP3	30-90 min	10-15%
IGF1 + IGFBP3 + ALS	>12 h	> 85%

Tab. 2: Halbwertszeiten und Häufigkeiten von IGF1, IGF1-IGFBP3-Komplex und IGF1-IGFBP3-ALS-Komplex im Blut

Förderung des postnatalen Wachstums

Das postnatale Wachstum wird größtenteils GH abhängig (64) durch IGFs gefördert, die zu 75% in der Leber gebildet werden und ihre Wirkung auf endokrinem Weg entfalten, und zu 25% im Knochen selbst um dort lokal (parakrin) zu wirken. Sjogren et al. fanden 1999 mit Hilfe eines Knock-out-Modells jedoch heraus, dass die in der Leber gebildeten IGFs keine Grundvoraussetzung für das postnatale Wachstums darstellen (134). Neben der Wirkung auf die Wachstumsfuge (2.2.2.) kommt es zur Vergrößerung der Muskelmasse und zur Wachstumszunahme innerer Organe (161).

Metabolische Wirkung

Die Wachstumshormonkaskade (GH-IGF-Kaskade) steuert die Aufnahme von Aminosäuren in Muskel-, Knorpel-, und Bindegewebszellen und unterstützt so die Proteinbiosynthese (137). Hinsichtlich der Wirkung von GH auf Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel kann ein insulinantagonistischer Effekt beobachtet werden. In der Leber stimuliert GH auf direktem Weg die Freisetzung von Glukose bei gleichzeitiger Hemmung der peripheren Glukoseverwertung und führt somit zum Anstieg des Blutglukosespiegels (8). IGF1 wirkt hingegen zwar insulinähnlich und vermag den Blutglukosespiegel zu senken, jedoch hemmt GH diesen Mechanismus durch Verminderung der IGF1-Bioverfügbarkeit mittels Stimulation der IGFBP3 Produktion (s. oben) Diese Tatsache erklärt auch, warum der schwere GH-Mangel bei Neugeborenen oft zu Hypoglykämien führt. GH aktiviert zudem direkt die Lipolyse und Verwertung von Fettsäuren zur weiteren Glukoseeinsparung. Wie in 2.1.3. bereits beschrieben, kann bei zu hohen GH-Spiegeln (z.B. Akromegalie, falsch dosierte GH-Applikation) eine Insulinresistenz auftreten. Der genaue Mechanismus hierfür ist noch nicht bekannt (8). Physiologisch wird das Aufeinandertreffen von Insulin und GH durch Ausschüttung der Hormone zu verschiedenen Tageszeiten verhindert.

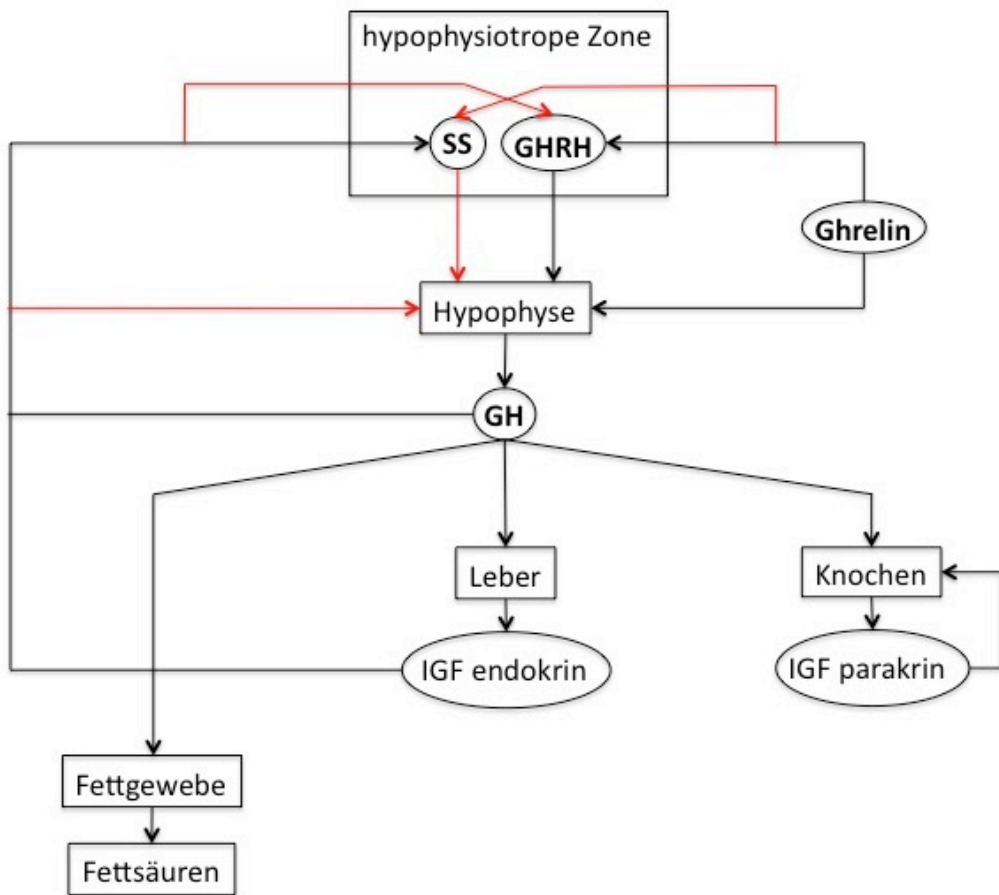


Abb. 6: Regulation der Wachstumshormonkaskade

Schwarze Pfeile = Stimulation; Rote Pfeile = Hemmung; SS = Somatostatin, GHRH = Growth-Hormone-Releasing-Hormone, GH = Growth-Hormone, IGF = Insulin-like growth factors

2.2.2 Wachstumsfuge

Im folgenden Abschnitt wird der Fokus auf die hormonellen Einflüsse von Östrogen und Vitamin D auf die Wachstumsfuge bzw. die Knochenbildung gerichtet.

Die Wachstumsfuge besteht aus hyalinem Knorpel, ist als Ort des Längenwachstums in Röhrenknochen zwischen Epiphyse und Diaphyse lokalisiert und kann in verschiedene horizontale Schichten gegliedert werden, die Chondrozyten in unterschiedlichen Differenzierungsstadien beinhalten.

In der ersten Schicht - auch als Reservezone bezeichnet - befindet sich an das Knochengewebe der Epiphyse angrenzender ruhender Knorpel, der einerseits für eine Verankerung der Wachstumsfuge (155) und andererseits für die Ausrichtung der weiter diaphysal liegenden Schichten (1) verantwortlich gemacht wird. In der darauffolgenden Schicht, der sogenannten Proliferationszone, kommt es zu zahlreichen Zellteilungen in longitudinaler Ausrichtung und zur Produktion extrazellulärer Matrixproteine (146). Das Zusammenspiel aus maximal erreichter Anzahl an Zellteilungen und Konfrontation mit lokalen Wachstumsfaktoren (99) führt schließlich zum Übergang in die nächste Schicht - der Transitionszone - in welcher die Chondrozyten ausdifferenzieren, hypertrophieren und zahlreich extrazelluläre Matrixproteine produzieren. Zudem kommt es zum intrazellulären Calciumanstieg und der Exozytose von Vesikeln (4), die Calciumphosphate, Hydroxylapatit und Matrixmetalloproteinasen beinhalten und deren Freisetzung den Mineralisierungsprozess in Gang setzt. In Folge dessen gehen die mineralisierten Chondrozyten in die Apoptose über und bilden so die Grundlage für die - durch Osteoblasten erfolgende - Verknöcherung (155).

Das Längenwachstum ist also Ergebnis von Chondrozytenproliferation und - differenzierung und wird bestimmt durch genetische Faktoren, Umwelt, Ernährung, Hormone und Wachstumsfaktoren (146). Auf den Chondrozyten befinden sich Rezeptoren für zahlreiche Hormone wie z.B. Vitamin D und Östrogene, die so direkt in die Prozesse an der Wachstumsfuge eingreifen können.

1978 konnten Garabedian et al. bereits das Vorhandensein membranständiger Vitamin D Rezeptoren (VDR) auf Chondrozyten der Wachstumsfuge nachweisen (48). 1,25-(OH)₂D₃ hemmt mitunter die Proliferation der Chondrozyten und wirkt auf die Synthese der Matrixproteine ein (129), führt zu Änderungen der Phospholipidzusammensetzung der Zellmembran mit erhöhten Ca²⁺-Strömen (83, 142) und forciert die Differenzierung der Chondrozyten durch Stimulation der Aktivität der alkalischen Phosphatase (15) und Matrix Metalloproteinasen (40).

Die Auswirkungen von Östrogenen auf das Längenwachstum werden einerseits indirekt über eine Beeinflussung der GH-IGF1-Achse (s. 2.2.1) vermittelt und andererseits direkt über - in Chondrozyten der Wachstumsfuge befindlichen - Östrogenrezeptoren (z.B. ESR1) (78, 148). Niedrige Konzentrationen an Östrogen, wie sie meist zu Beginn der Pubertät beobachtet werden, wirken fördernd auf das Längenwachstum in dem die Chondrozytenproliferation stimuliert und die klonale Expansion gefördert wird. In der späten Phase der Pubertät führen hohe Konzentrationen an Östrogenen hingegen durch Hemmung der klonalen Expansion, Einleitung der Apoptose der Chondrozyten und Stimulation der Osteoblasten (67) zum Epiphysenfugenschluss. Unterstützt wird diese Hypothese durch zahlreiche Fälle von Patienten deren Großwuchs auf Genmutationen z.B. im ESR1 (135) oder - der für die Umwandlung von Testosteron in Östradiol verantwortlichen - Aromatase (17, 102) zurückgeführt wird.

Hinzukommend wird die Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten lokal durch Wachstumsfaktoren wie IGF1, Indian hedgehog (138), VEGF (49) etc. reguliert.

Auch noch nach dem Schluss der Epiphysenfugen wirken Hormone wie Vitamin D und Östrogene auf die lebenslang andauernden Umbauprozesse am Knochen ein, die durch Knochenresorption und Entstehung neuen Knochens charakterisiert sind (12). Vermittelt wird die Wirkung der Hormone direkt über Osteoblasten und Osteoklasten (s. Abb. 7).

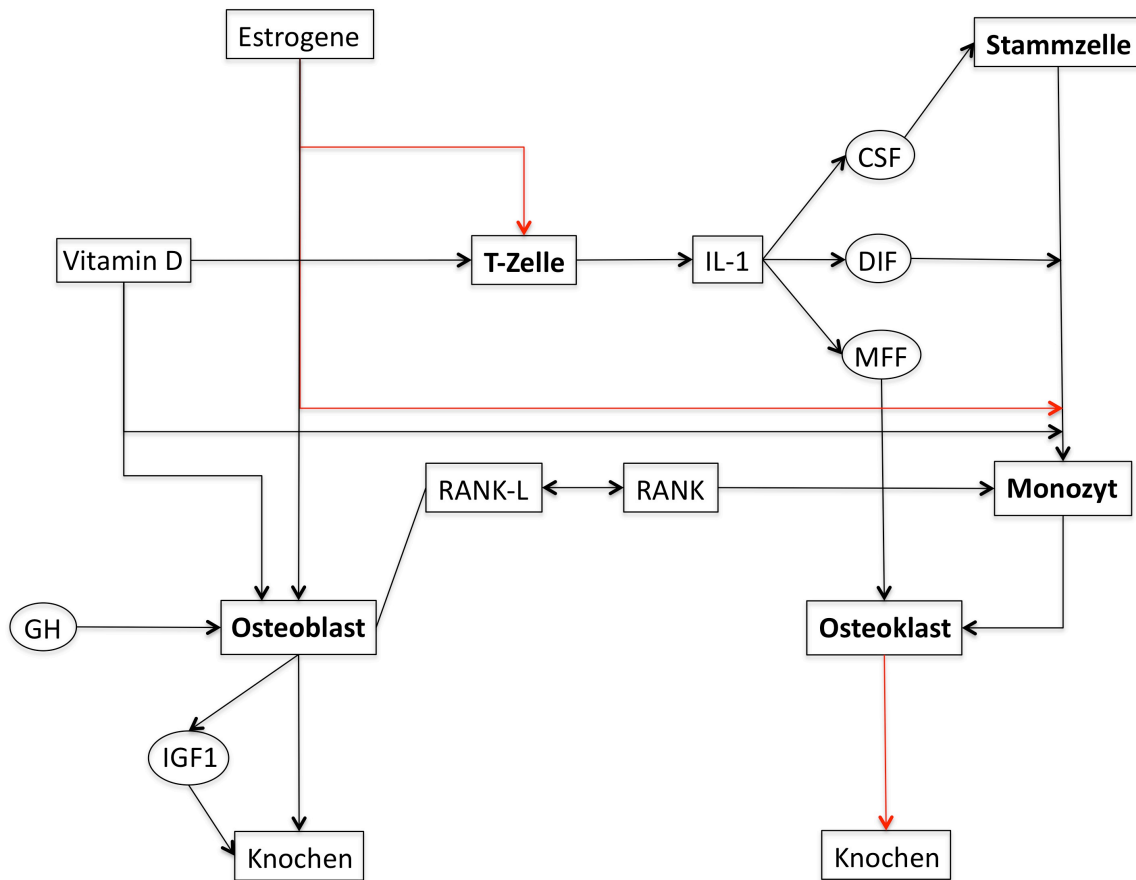


Abb. 7: Beeinflussung der Osteoblasten-Osteoklasten-Arbeitseinheit durch die Hormone Vitamin D und Östrogene (12)

Schwarze Pfeile = Stimulation; Rote Pfeile = Hemmung; CSF = colony stimulating factor; DIF = differentiation inducing factor; MFF = macrophage/monocyte fusion factor; IGF = Insulin-like growth factors; IL1 = Interleukin 1; GH = Wachstumshormon; RANK = Rezeptoraktivator für NFκB aus Präosteoblast/Osteoklast; RANK-L = Ligand für RANK auf Osteoblast

2.2.3 Zellzyklus

Per Definition besteht der Zellzyklus eukaryoter Zellen aus einer festgelegten Abfolge von Ereignissen, deren Absicht es ist, die genetische Information der Zelle zu verdoppeln und gleichermaßen auf zwei Tochterzellen zu verteilen. Diese Abfolge besteht aus vier Phasen - G1-, S-, G2-, und M-Phase - deren Übergang ineinander durch drei Restriktionspunkte - späte G1-Phase, Übergang G2 zu M-Phase, M-Phase - und zwei DNA-Schadens-Kontrollpunkte kontrolliert wird, um lebensbedrohliche

Krankheiten wie Krebs zu verhindern. Restriktionspunkte sind Kontrollpunkte, an denen entschieden wird, ob die Voraussetzungen für den Übergang in die nächste Phase erfüllt sind und die gegebenenfalls in der Lage sind den Zellzyklus anzuhalten. Wichtigste Komponente des Zellzyklus-Kontrollsystems sind Zyklin-abhängige Kinasen (CDKs), deren Aktivität durch Bindung von Zyklinen, Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung und CDK-Inhibitorproteine (CKI) geregelt wird. Ausschließlich durch Bildung eines Heterodimers mit einem Zyklin ist es CDKs möglich, andere Enzyme und Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren, um den Übergang in die nächste Zellzyklus-Phase freizugeben. An den Restriktionspunkten liegen unterschiedliche Kombinationen von CDKs und Zyklinen vor, die auf die jeweiligen Übergänge spezialisiert sind (s. Abb. 8) (118).

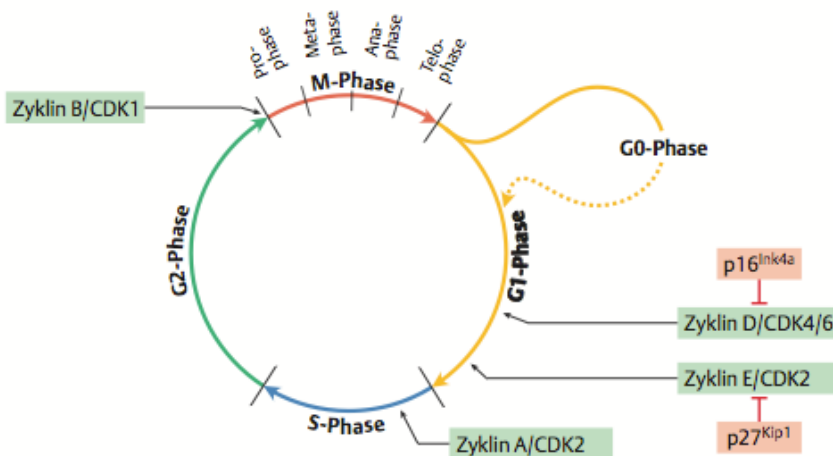


Abb. 8: Funktion der CDK-Zyclin-Dimere bzw. CDK-Inhibitorproteine (CKIs) im Zellzyklus (118)

Zum Beispiel unterliegt die Steuerung des G1-S-Übergangs einem heterodimeren Komplex, bestehend aus CDK4 oder CDK6 und zellspezifischem Zyklin D1, D2, oder D3, der mit Hilfe der Zyklin zugehörigen Kernlokalisierungssequenz (NLS) in den Zellkern gelangt, um dort von einer CDK-activating Kinase (CAK) phosphoryliert zu werden. Nun ist das Heterodimer aus CDK4/6 und Zyklin D dazu fähig das Retinoblastoma-Protein (Rb) zu phosphorylieren, welches im nichtphosphorylierten Zustand den Transkriptionsfaktor E2F und die Histon-Deacetylase (HDAC) bindet und somit die Transkription einiger Gene verhindert (118). Die HDAC löst sich aus der Bindung zu Rb

und es kommt zur Chromatinumstrukturierung mit der Folge einer intensivierten Expression von Zyklin E. Zyklin E seinerseits bildet ein Heterodimer mit CDK2, das zur weiteren Phosphorylierung von Rb führt mit der Absicht E2F aus der Bindung zu lösen und eine Stimulation der Transkription unterschiedlicher für die S-Phase notwendiger Gene auszulösen (s. Abb. 9) (91).

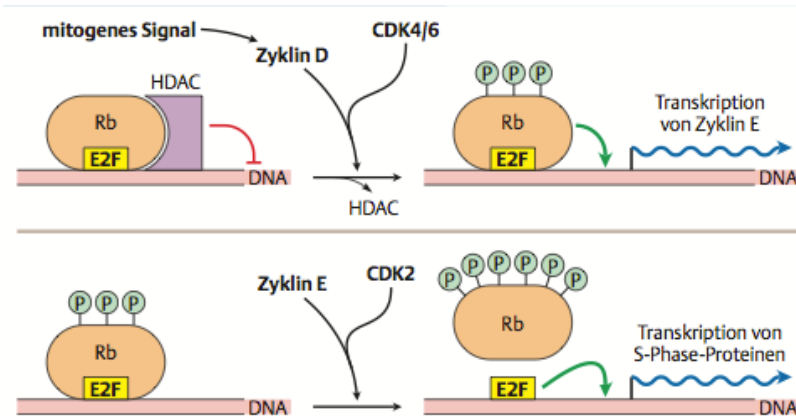


Abb. 9: Steuerung des G1-S-Übergangs (118)

2.2.4 Einflüsse genetischer Variationen

In lediglich 0,1% des menschlichen Genoms kommt es zu Variationen der Basenabfolge (59). Ungefähr 90% dieser genetischen Variationen beruhen auf Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) die durch Austausch einzelner Basenpaare in einem DNA-Strang entstehen. Man vermutet einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten verschiedener Polymorphismen und der individuellen Variabilität von Krankheitsrisiken und Wirksamkeit von Medikamenten (151). Aufgrund dessen wird versucht, mit Hilfe von epidemiologischen Untersuchungen des menschlichen Genoms, sogenannten genomweiten Assoziationsstudien (GWA), bestimmte Phänotypen – meist handelt es sich hierbei um definierte Krankheitsbilder – mit bestimmten Haplotypen zu verknüpfen (59).

Voraussetzung für solche Studien war zunächst die Komplettierung der menschlichen Genomsequenz (80, 147), die Optimierung der Techniken zur Genotypisierung (132) und das Zusammentragen von zahlreichen SNPs (125) bzw. deren Auflistung in frei verfügbaren Datenbanken - wie der dbSNP Datenbank (103).

Einige der GWA waren bereits erfolgreich bei der Identifizierung genetischer Variationen häufiger Erkrankungen (154) bzw genetischer Variationen, welche mit quantitativen Merkmalen wie Lipidlevel (127) und Body Mass Index (47) (130) einhergehen.

Lettre et al. untersuchten 2008 den Einfluss von 2,2 Millionen SNPs auf die Körperendgröße bei 15,821 Menschen. Letztendlich konnten in deren Arbeit zehn SNPs – lokalisiert in Signalkaskaden, die den Wachstumsprozess regulieren – herausgefiltert werden, welche nachweislich im Zusammenhang mit der Ausprägung der Körperendgröße stehen (89).

Wie bereits angedeutet, wird vermutet, dass Variationen des menschlichen Genoms nicht nur Krankheitsrisiken verändern, sondern auch die Wirksamkeit von Medikamenten beeinflussen (151). Obwohl für eine Therapie mit rhGH klare Therapierichtlinien hinsichtlich der Dosierung vorliegen (52), kommt es zu interindividuell unterschiedlichen Ansprechraten (s Abb. 10).

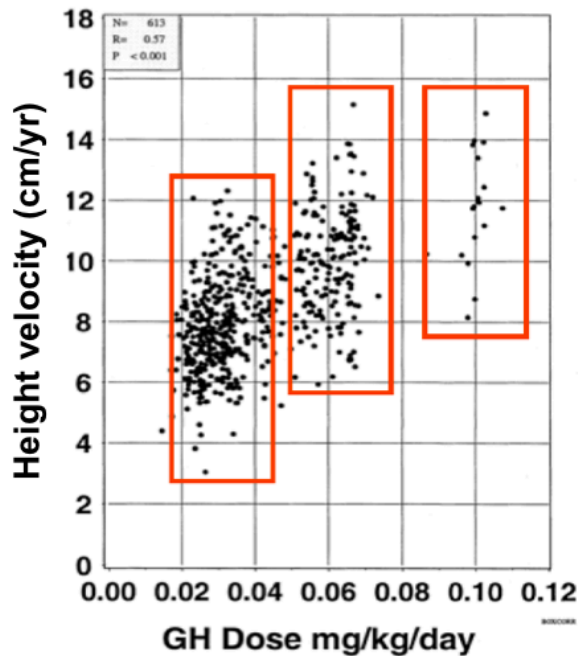


Abb. 10: Wachstumsgeschwindigkeit (cm/Jahr) in Abhängigkeit von der Wachstumshormondosis (mg/kgKG/Tag) (114)

Costalonga et al. schätzen den Einfluss klinischer Faktoren, wie den maximal erreichten GH-Peak in Wachstumshormonstimulationstests, das Alter bzw. die Height-SDS zu Beginn der Therapie, Dauer der Therapie und die genetische Zielgröße (11, 19, 38, 113, 119) auf maximal 40-61% (30). Andere – die Ansprechraten auf eine rhGH Therapie untersuchende - Studien fanden eine positive Korrelation zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit und der rhGH Dosierung und eine negative Korrelation zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit und dem Alter bei Therapiebeginn (46, 110, 143).

Neben diesen klinischen Faktoren werden genetische Einflussfaktoren vermutet, die bis heute größtenteils unbekannt bleiben. Lediglich zur GHR-Exon3-Deletion liegt eine umfassende Datenlage vor, welche - trotz ihrer Heterogenität der Ergebnisse - die Idee hervorgebracht hat, Polymorphismen z.B. in der GH-IGF1-Achse könnten einen Einfluss auf die Ansprechraten einer rhGH Therapie haben (14, 43, 66).

2.3 Fragestellung

Trotz der Einhaltung einer empfohlenen Wachstumshormon-Dosierung von 25-30 µg/kgKG/Tag, unterscheiden sich die Ansprechraten auf eine Therapie mit rekombinantem Wachstumshormon erfahrungsgemäß teils erheblich. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund der Therapiekosten und -risiken sowie dem Therapieaufwand zu beachten. Es stellt sich die Frage, warum die Ansprechraten divergieren, welche Faktoren das Ansprechen auf eine Wachstumshormon-Therapie beeinflussen und wie sich diese nutzen lassen, um ein optimales individuelles Therapieergebnis zu erzielen. Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung genetischer Einflüsse auf die Wirksamkeit einer Wachstumshormon-Therapie bei Kindern mit einem Wachstumshormonmangel. Untersucht wurden die Auswirkungen dreizehn verschiedener SNPs, lokalisiert in Genen, die im Bereich der Wachstumshormonachse, der Wachstumsfuge und dem Zellzyklus ihre Funktion entfalten (s. Tab. 3), und der Einfluss einer Deletion im Exon 3 des Wachstumshormon-Rezeptors.

SNP	Gen	RefSNPAllele	Major Allel	Ort
rs2888586	SOS1	A/G	A	GH-IGF1-Achse
rs2871865	IGF1R	C/G	C	GH-IGF1-Achse
rs300919	GAB1	C/T	T	GH-IGF1-Achse
rs3845395	LHX4	C/G	G	GH-IGF1-Achse
rs3110697	IGFBP3	C/T	T	GH-IGF1-Achse
rs933360	Grb10	A/G	G	GH-IGF1-Achse
rs2854744	IGFBP3	A/C	C	GH-IGF1-Achse
rs2267723	GHRHR	A/G	A	GH-IGF1-Achse
rs572169	GHSR	A/G	G	GH-IGF1-Achse
rs2228570	VDR	A/G/C/T	T	Wachstumsfuge
rs2347867	ESR1	A/G	G	Wachstumsfuge
rs2069502	CDK4	A/G	G	Zellzyklus
rs2270777	CDK4	A/G	G	Zellzyklus

Tab. 3: Auflistung der 13 untersuchten SNPs mit zugehörigem Gen, RefSNP Allel, Major Allel und Wirkungsort

Die Informationen der Tabelle 3 wurden der dbSNP Datenbank entnommen; das in der dbSNP Datenbank angegebene Major Allel wird in dieser Arbeit als homozygoter Wildtyp bezeichnet; SOS1 = son of sevenless homolog 1; CDK4: Cyclin-dependent kinase 4; LHX4 = LIM homebox 4; ESR1 = Estrogen Receptor 1; IGFBP3 = Insulin-like growth factor binding protein 3; VDR = Vitamin D receptor; IGF1R = Insulin-like growth factor 1 receptor; GAB1 = GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2)-associated binding protein 1; GHRHR = Growth-hormone-releasing hormone receptor; GHSR = Growth hormone secretagogue receptor; Grb10 = growth factor receptor-bound protein 10

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Substanzen

Substanzen	Hersteller	Firmensitz
100%iger EtOH	Zentralapotheke	Otto – von – Guericke Universität Magdeburg
3:1 Agarose NuSieve	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
96 Multiply PCR Platte natur	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
96 Well Retainer & Base Set 3500Dx/3500xL Genetic Analyzers	Life Technologies – Applied Biosystems	Carlsbad, CA, USA
96 Well Septa for 3500Dx/3500xL Dx Genetic Analyzers	Life Technologies – Applied Biosystems	Carlsbad, CA, USA
Agencourt CleanSeq Reagent	Beckman Coulter	Brea, CA, USA
Agentcourrt AMPure Reagent	Beckman Coulter	Brea, CA, USA
AMP Liseal Transparente Microplatten Abdeckfolie 141, 3/79, 4MM	Greiner Bio One	Kremsmünster, Österreich
Betaine 5M PCR Reagent	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Big Dye	Life Technologies	Carlsbad, CA, USA
Biomek Ap96 Tips, P250 Nonsterile Volume	Beckman Coulter	Brea, CA, USA
Cellstar Tubes 50ml	Greiner Bio One	Kremsmünster, Österreich
Combitips plus 0,2ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Diamond Eco Pack of 1000 Tips, 10µl Tip Volume, Range 0,1-10µl	Gilson	Middleton, WI, USA
Dimethylsulfoxid 5%	Life Technologies – Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
dNTP	Bioline	London, Großbritannien

Substanzen	Hersteller	Firmensitz
Erlenmeyerkolben Enghals 250 bzw. 500 ml mit Bördelrand	chemoLine	Hennef, Deutschland
Ethidiumbromid 1mg/ml	Roche Diagnostics GmbH	Basel, Schweiz
Gene Ruler 1kb DNA Ladder 250 to 10,000bp	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Labmate Soft Einkanal-Pipetten	Abimed	Langenfeld, Deutschland
Light Cycler 480 High Resolution Melting Master Version 05	Roche Diagnostics GmbH	Basel, Schweiz
Light Cycler 480 Multiwell Plate 96	Roche Diagnostics GmbH	Basel, Schweiz
Light Cycler 480 Sealing Foil	Roche Diagnostics GmbH	Basel, Schweiz
Loading Dye	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
MaiMed Nitril Stretch Handschuhe	MaiMedMedical	Neuenkirchen, Deutschland
Mehrkanalpipette PreCision, 0,5-10µl	Biohit	Helsinki, Finnland
MgCl ₂ 25mM	Roche Diagnostics GmbH	Basel, Schweiz
MgCl ₂ 50mmol	Life Technologies - Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
Micro Amp Fast 96 well	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
MicroAmp Optical 96 Well Reaction Plate	Life Technologies – Applied Biosystems	Carlsbad, CA, USA
Multipette Stream	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging	Chicago, IL, USA
PCR 4er Gefäße 0,2ml mit Deckel	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
PCR 8er Gefäße 0,2ml mit Deckel	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
PCR Rxn Buffer	Life Technologies - Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
PCR Soft Tubes gelb, 0,2ml	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipetman 0,2-2µl	Gilson	Middleton, WI, USA
Pipetman 0,5-2µ	Gilson	Middleton, WI, USA
Pipetman 100-1000µl	Gilson	Middleton, WI, USA

Substanzen	Hersteller	Firmensitz
Pipetman 2-20µl	Gilson	Middleton, WI, USA
Pipetman 20-200µl	Glison	Middleton, WI, USA
Pipetman 50-200µl	Gilson	Middleton, WI, USA
Pipettenspitzen blau, 100-1000µl	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen gelb, 2-200µl	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen weiß, 0,1-20µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
PP Microplate 96 well VShape	Greiner Bio One	Kremsmünster, Österreich
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen	Venlo, Niederlande
Quantitas DNA Marker 25-500bp	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Safe Seal Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
SafeSeal Zips PreCision, 100µl steril	Biohit	Helsinki, Finnland
Taq DNA Polymerase Rekombinant	Life Technologies - Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
Test-DNA	Institut für Humangenetik	Otto – von – Guericke Universität Magdeburg
TRIS-Borat-EDTA Puffer	Zentralapotheke	Otto – von – Guericke Universität Magdeburg
UltraPure Agarose	Life Technologies - Invitrogen	Carlsbad, CA, USA

3.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller	Firmensitz
3500xL Genetic Analyzer	Life Technologies - Applied Biosystems	Carlsbad, CA, USA
Biomek NxP Laboratory Automation Workstation	Beckman Coulter	Brea, CA, USA
Consort Mini Electrophoresis Power Supply E143	SIGMA	Kawasaki, Japan

Gerät	Hersteller	Firmensitz
DeVision DBOX	Decon Science Tec GmbH	Hohengandern, Deutschland
Digital Monochrome Printer P93D	Mitsubishi	Tokyo, Japan
Heraeus Labofuge 400 Zentrifuge	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Horizontal Gel Electrophoresis System 11-14/20-25	Life Technologies	Carlsbad, CA, USA
Light Cycler 480 Real Time PCR System	Roche Diagnostics GmbH	Basel, Schweiz
Mikrowelle R-939-IN-A 900W 40l	SHARP	Osaka, Japan
Milli-Q Reference Ultrapure Water Purification System	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
miniSpin	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Nano Drop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
PCR Thermal Cyclers Duo Cyclers	VWR International	Radnor, PA, USA
RCT basic IKAMAG® safety control	IKA	Staufen, Deutschland
Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler	Life Technologies - Applied Biosystems	Carlsbad, CA, USA
Vortex Genie	Scientific Industries	New York City, NY, USA

3.1.3 Programme

Programm	Hersteller	Firmensitz
PCR Primer Design	Primer3	
Sequence Pilot	JSI Medical Systems	Kippenheim, Deutschland
Biomek Software AGCT AMPure 96	Beckman Coulter	Brea, CA, USA
DeVision G 2.0		

3.1.4 Primer

SOS1 rs2888586

>F : 5' - CACTTTGTAGACAAATCCCAAGG - 3'

>R: 5' - TTGACTCATATAAGGTGATTGTTTTCA - 3'

IGF1R rs2871865

>F: 5' - GCAGGAGTCGGGCATTTTA - 3'

>R: 5' - ATGATACCAAAGCTTCCCCC - 3'

Gab1 rs300919

>F: 5' - ATGCCTGGCTCAGAGTAGGA - 3'

>R: 5' - TGTGAAGACAAGCTGTCAGTCA - 3'

LHX4 rs3845395

>F: 5' - GCGAAGGCTCAGTTTCCTC - 3'

>R: 5' - CTCATAACAGGCTTCTGATGCC - 3'

IGFBP3 Promotor (202 A Allel) rs3110697

>F: 5' - GGCACTATTTCAATTGGCTTTC - 3'

>R: 5' - CCTAAGCTTTCCTCCATTGC - 3'

GRB10 rs933360

>F: 5' - TTTAATGATCCACAACATATGGAC - 3'

>R: 5' - TTTCATTTCATTAAAGATCAGTGATG - 3'

IGFBP3 rs2854744

>F: 5' - GAGTTGGCCAGGAGTACTG - 3'

>R: 5' - CTCAGGGCGAAGCACG - 3'

GHRHR rs2267723

>F: 5' - CTCTACATATTCCTGCTTCCATCC - 3'

>R: 5' - TAGCACAAGATCTGGGAGGC - 3'

GHSR rs572169

>F: 5' - GAGCGTCGAGCGCTACTTC - 3'

>R: 5' - CTGGACTGCTCACGGTCAT - 3'

VDR rs10735810 (rs2228570)

>F: 5' -GTGGGTGGCACCAAGGAT - 3'

>R: 5' - CAGCACTTCCCTGCCTGAC - 3'

ESR1 rs2347867

>F: 5' - TGGTGTGCATTCCCTAAAAA - 3'

>R: 5' - TGAAACAAAAACTTGTGCC - 3'

CDK4 rs2270777

>F: 5' - GAGGCCATGTTGGGTAAAG - 3'

>R: 5' - AAACGATCAAGGTGAGTGGG - 3'

CDK4 rs2069502

>F: 5' - CCTGGCCAGAATCTACAGCTA - 3'

>R: 5' - TGTTTCATGGTAACCCATGG - 3'

Growth Hormone Receptor: Exon 3 Deletion

>G1F: 5' - TGTGCTGGTCTGTTGGTCTG - 3'

>G2R: 5' - AGTCGTTCCCTGGGACAGAGA - 3'

>G3R: 5' - CCTGGATTAACACTTTCAGACTC - 3'

3.1.5 Patientenblut

Das Blut für die Untersuchungen wurde 156 Patienten mit GHD entnommen, die in der kinderendokrिनologischen Sprechstunde der Universitätsklinik Homburg mit rhGH behandelt werden. Zuvor erfolgte eine Aufklärung der Erziehungsberechtigten über das Projekt durch Herr Prof. Dr. med. Tilman Rohrer. Ein positives Votum der saarländischen Ethikkommission der Ärztekammer lag bereits vor. Eine Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie wurde unterschrieben. Die

Blutentnahme erfolgte im Rahmen von Routineblutentnahmen zur Therapieüberwachung. Insgesamt mussten im Verlauf der Untersuchungen 55 Patienten wegen fehlender Hintergrundinformationen zur Berechnung des Index of Responsiveness (s. 5.1) ausgeschlossen werden.

Für das SNP - Projekt wurden 101 Patienten aus dem Patientenkollektiv für die Studie eingeschlossen. Um den Stichprobenumfang zu erhöhen wurden, auch 20 Patienten mit bereits erfolgtem Pubertätsbeginn (maximal Tanner Stadium 2) untersucht. Das ist möglich, weil nach Preece et al. der Wachstumsschub im Tanner Stadium 2 noch nicht begonnen hat (111). In den Tabellen 4 und 5 sind Informationen zur Geschlechterverteilung, zum durchschnittlichen Alter bei Therapiebeginn, zur rhGH Dosierung und der maximal erreichten GH-Konzentration in den Stimulationstests zu finden.

Geschlecht	Häufigkeit	Prozent
Weiblich	39	38,6
Männlich	62	61,4
Gesamt	101	100,0

Tab. 4: Anzahl an weiblichen und männlichen Patienten für das SNP-Projekt

	Anzahl	M	SE	SD	Min	Max
Alter_0	101	9,0	0,4	3,6	0,2	15,2
GH (µg/kg/d)	101	23,0	0,5	4,5	20,0	40,0
GH max	101	5,8	0,2	2,4	0,1	9,9

Tab. 5: Angaben zum durchschnittlichen Alter bei Therapiebeginn, rhGh Dosierung (µg/kg/d) und maximal erreichter GH-Konzentration (ng/ml) in den Stimulationstests für das SNP-Projekt

Alter_0 = Alter bei Therapiebeginn; M = Mittelwert; SE = Standardfehler; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum

Für das GHR Exon 3 Deletion - Projekt wurden 81 präpubertäre Patienten aus dem Patientenkollektiv in die Studie eingeschlossen. Ausgeschlossen wurden hierbei Patienten mit GHD nach onkologischen Grunderkrankungen. In den Tabellen 6 und 7 sind Informationen zur Geschlechterverteilung, zum durchschnittlichen Alter bei Therapiebeginn, zur rhGH Dosierung und zur maximal erreichten GH-Konzentration in den Stimulationstests aufgeführt.

Geschlecht	Häufigkeit	Prozent
Weiblich	34	42,0
Männlich	47	58,0
Gesamt	81	100,0

Tab. 6: Anzahl an weiblichen und männlichen Patienten für das GHRd3 Projekt

	Anzahl	M	SE	SD	Min	Max
Alter_0	81	8,0	0,4	3,2	0,2	13,3
GH (µg/kg/d)	81	23,0	0,5	4,8	20,0	40,0
GH max	81	5,7	0,3	2,6	0,1	9,9

Tab. 7: Angaben zum durchschnittlichen Alter bei Therapiebeginn, rhGh Dosierung (µg/kg/d) und maximal erreichter GH-Konzentration (ng/ml) in den Stimulationstests für das GHRd3 Projekt

Alter_0 = Alter bei Therapiebeginn; M = Mittelwert; SE = Standardfehler; SD = Standardabweichung; Min = Minimum; Max = Maximum

3.2 Methoden

3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist die Methode der Wahl zur Vervielfältigung von DNA. Sie besteht aus mehreren Zyklen und jeder einzelne Zyklus besteht aus drei Schritten. Der erste Schritt ist die Erhöhung der Temperatur auf 94-96 °C – auch genannt

Denaturierung - um die Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA aufzubrechen. Im nächsten Schritt wird für etwa 30 sec die Temperatur auf 55-65 °C (sog. Annealing-Temperatur) abgekühlt, um eine Anlagerung der Primer an die Einzelstränge zu ermöglichen. Die optimale Temperatur hängt von der Länge und der Nukleotidsequenz der Primer ab und liegt zumeist 3-5 °C unterhalb des Schmelzpunktes der Primersequenz. Die Annealing-Temperatur zur Primerhybridisierung wird 30 sec aufrecht erhalten. Im letzten Schritt wird für die Elongation die Temperatur nochmals für 30 sec auf 68-72 °C erhöht. Am 3'-Ende des angelagerten Primers werden nun durch die Taq-Polymerase Nukleotide angehängt. Das Ergebnis ist ein neu entstandener Doppelstrang.

Der für eine Polymerasekettenreaktion benötigte Ansatz besteht aus mehreren Komponenten:

- Ausgangs- DNA (Template)
- Forward- und Reverse- Oligonukleotidprimer
- Thermostabile DNA- Polymerase (z.B. Taq- Polymerase)
- Desoxyribonukleosidtriphosphate
- Mg²⁺-Ionen (Polymerase benötigt für ihre Aktivität freies Magnesium)
- Puffer (Taq- Polymerase erreicht ihr Aktivitätsmaximum bei pH-Werten > 8)

3.2.2 Gelelektrophorese

Zur Darstellung von DNA-Fragmenten werden Agarosegele mit unterschiedlichen Agarosekonzentrationen verwendet (s. Tab. 8). Für diese Arbeit wurden ausschließlich 1%ige und 2%ige Gele benötigt.

DNA-Fragmentlänge	Agarosekonzentration	Agarosemenge	TBE-Puffer Volumen
0,5 bis 7 kb	1 %	1 g	100 ml
0,1 bis 2 kb	2 %	2 g	100 ml

Tab. 8: Erforderliche Agarosekonzentration bzw. Menge an TBE-Puffer zur Darstellung von unterschiedlich langen DNA-Fragmenten

Zunächst wird in einem Erlenmeyerkolben Agarose zu Elektrophoresepuffer (TBE-Puffer) gegeben und in einer Mikrowelle aufgeköcht. Sobald die Agarose vollständig aufgelöst ist hält man den Erlenmeyerkolben zur Abkühlung der Lösung unter fließend kaltes Wasser. Um die DNA im Agarosegel später sichtbar machen zu können, werden 10 µl Ethidiumbromid hinzupipettiert. Anschließend wird die geschmolzene Agarose in einen Gelschlitten mit eingesetztem Kamm gegossen und solange gewartet bis das Gel komplett erstarrt ist.

Im Anschluss daran erfolgt die Beladung der Geltaschen mit den DNA-Lösungen. In die jeweils erste Geltasche jeder neu begonnenen Geltaschen-Reihe kommen 3 µl Loading Dye und 5 µl eines Größenstandards (1 kb DNA Ladder), die zuvor auf Parafilm miteinander vermischt wurden. In die darauf folgenden Geltaschen werden 3 µl Loading Dye und 5 µl DNA-Lösung pipettiert, die ebenfalls zuvor auf Parafilm miteinander vermengt wurden. Danach kann das beladene Gel in eine Elektrophoresekammer eingesetzt werden, wobei das Gel vor Anlegen der Spannung (80-100 mV) vollständig mit TBE-Puffer bedeckt werden muss. Sobald die DNA ausreichend weit gelaufen ist, nimmt man das Gel aus der Elektrophoresekammer und betrachtet es unter UV-Licht.

3.2.3 DNA Extraktion

Das Patientenblut wurde in EDTA-Röhrchen entnommen. Die DNA wurde mit der QuiAMP DNA Blood Mini Kit nach den Anweisungen des Herstellers isoliert. Es handelt sich hierbei um eine DNA-Extraktion mittels Anionenaustauschersäulen.

Anionenaustauschersäulen bestehen aus einem Gitter, welches positiv geladene Gruppen beinhaltet. Im Gegensatz hierzu besitzen Nukleinsäuren bei einem pH-Wert >

2 negativ geladene Phosphatgruppen. Somit ist die Möglichkeit einer Bindung der Nukleinsäuren an Anionenaustauscher gegeben. Zunächst wird die DNA-Präparation auf eine bestimmte Salzkonzentration gebracht und dann auf die Austauschersäulen pipettiert. Proteine, die eine geringere Ladung aufweisen, durchlaufen das Säulenmaterial. Puffer höherer Ionenstärke dienen im Anschluss daran dazu, RNA von der Säule zu waschen. Um die DNA von den Austauschersäulen eluieren zu können, wird ein Puffer noch höherer Ionenstärke hinzugegeben. Durch Fällen der DNA mit Ethanol oder Isopropanol, wird die DNA vom Salz befreit.

Die DNA Proben unterscheiden sich in ihrer Konzentration, die spektrophotometrisch gemessen wird. Um eine optimale Grundlage für die High-Resolution-Melting-Methode (HRM) bzw. die Sequenzierungsanalysen zu schaffen, werden zwei DNA Platten vorbereitet in denen alle Proben mit einer DNA-Konzentration von 5 ng/µl vorliegen. Dazu wird für jede DNA-Probe das individuelle DNA-Volumen bestimmt und entsprechend destilliertes Wasser hinzugefügt, um in jedem Well 100 µl DNA in einer Konzentration von 5 ng/µl zu erreichen (s. Abb. 11).

$$\begin{aligned}c_1 * V_1 &= c_2 * V_2 \\ \Leftrightarrow V_1 &= (c_2 * V_2) / c_1 \\ \Leftrightarrow V_1 &= (5 \text{ ng}/\mu\text{l} * 100 \mu\text{l}) / c[\text{DNA}_x] \\ \Leftrightarrow V_1 &= \text{gesuchtes Volumen der vorzulegenden DNA}\end{aligned}$$

Abb. 11: Formel zur Berechnung des gesuchten DNA-Volumens

c_1 = gemessene Konzentration der DNA-Probe; $c_2 = 5 \text{ ng}/\mu\text{l}$; V_1 = gesuchtes Volumen der vorzulegenden DNA; $V_2 = 100 \mu\text{l}$

Nun werden die ausgerechnete Menge DNA Volumen und anschließend die errechnete Menge destilliertes Wasser in die Wells der zwei DNA Platten pipettiert. Die 156 DNA-Proben verteilen sich auf zwei 96-Well-DNA-Platten mit jeweils 78 befüllten Wells. Die DNA-Platte A beinhaltet die DNA-Proben WS3 bis WS120 (s. Abb. 12) und die DNA-Platte B die DNA-Proben von WS121 bis WS227 (s. Abb. 13).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	WS3	WS13	WS22	WS36	WS46	WS58	WS73	WS84	WS99	WS113		
B	WS4	WS14	WS25	WS38	WS49	WS59	WS76	WS85	WS101b	WS115		
C	WS5	WS16	WS26	WS40	WS50	WS60	WS77	WS86	WS102b	WS116		
D	WS7	WS17	WS27	WS41	WS51	WS61	WS78	WS87	WS103a	WS118		
E	WS8	WS18	WS30	WS42	WS54	WS62	WS79	WS89	WS104a	WS119		
F	WS10	WS19	WS31	WS43	WS55	WS63	WS81	WS91	WS105b	WS120		
G	WS11	WS20	WS34	WS44	WS56	WS65	WS82	WS95	WS106b			
H	WS12	WS21	WS35	WS45	WS57	WS70	WS83	WS97	WS107			

Abb. 12: DNA Platte A mit Patienten DNA WS3 bis WS120

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	WS121	WS132	WS142	WS154a	WS166	WS184a	WS193a	WS201	WS209	WS219		
B	WS122	WS133	WS143	WS157	WS167	WS186a	WS194	WS202	WS210	WS220		
C	WS123	WS134	WS144	WS158	WS169	WS187a	WS195	WS203	WS212	WS222		
D	WS124	WS136	WS145	WS159	WS175	WS188a	WS196	WS204	WS213	WS223		
E	WS125	WS137	WS146	WS161	WS176	WS189a	WS197	WS205	WS214	WS224		
F	WS126	WS138	WS148b	WS162	WS178	WS190a	WS198	WS206	WS215a	WS227		
G	WS127	WS140	WS149	WS164	WS181	WS191a	WS199	WS207	WS216			
H	WS131	WS141	WS150	WS165	WS182	WS192a	WS200	WS208	WS218			

Abb. 13: DNA Platte B mit Patienten DNA WS121 bis WS227

3.2.4 SNP - Projekt

Der Goldstandard zur Aufschlüsselung der Basensequenz bzw. des Genotyps ist die Sequenzierung der DNA Fragmente. Sequenzierungsanalysen sind zeit- und kostenintensiv, sodass nach alternativen Methoden gesucht wird. Die High Resolution Melting (HRM) Methode stellt eine dieser neu entwickelten kostengünstigeren und zeitsparenden Alternativen dar. Jedoch sind nicht alle Basensequenzen für diese Methode geeignet – die Gründe hierfür sind wegen der erst kürzlich erfolgten Etablierung dieser Methode noch weitgehend unbekannt - sodass eine Sequenzierung in manchen Fällen immer noch notwendig ist.

3.2.4.1 High Resolution Melting

High Resolution Melting stellt eine Methode zur Detektion von Veränderungen des Genoms dar. Sie ermöglicht eine DNA Amplifikation per (a) Real-Time PCR und ein (b) HRM-Experiment in einem einzigen Arbeitsschritt. Zudem kann die Auswertung mit Hilfe der Light Cycler 480 Gene Scanning Software am selben Gerät direkt im Anschluss an das Experiment erfolgen.

(a) Real-Time PCR

Bevor eine HRM Analyse durchgeführt werden kann, muss die Zielsequenz in hoher Konzentration vorliegen. Um diese Voraussetzung zu schaffen, eignet sich eine Polymerasekettenreaktion (s. 3.2.1).

In dieser Arbeit sollen SNPs detektiert werden. Da Veränderung einer einzigen Base das Schmelzverhalten einer kurzen Basensequenz deutlich mehr beeinflussen als das Schmelzverhalten einer langen Basensequenz, besteht das PCR Amplifikat im Idealfall somit lediglich aus 100-250 Basenpaaren (bp). Außerdem beinhalten Zielsequenzen > 250 bp häufiger multiple Schmelz-Domänen, die zur Bildung komplizierter Schmelzkurven führen.

(b) HRM-Experiment

Sowohl die PCR als auch das Aufschmelzen der PCR Produkte geschieht unter Präsenz eines Fluoreszenzfarbstoffes, der ausschließlich an doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet und nicht an einzelsträngige DNA (ssDNA). Je mehr dsDNA vorliegt, desto stärker ist demnach auch das Fluoreszenzsignal.

Zu Beginn des HRM Experiments ist das Fluoreszenzsignal hoch, da nach Abschluss der Real-Time-PCR eine hohe Konzentration doppelsträngiger DNA vorliegt. Sobald die Temperatur ansteigt und die Doppelstränge in Einzelstränge dissoziieren, lässt das Fluoreszenzsignal nach und es kann ein charakteristisches Schmelzverhalten jeder einzelnen DNA Probe beobachtet werden (s. Abb. 14).

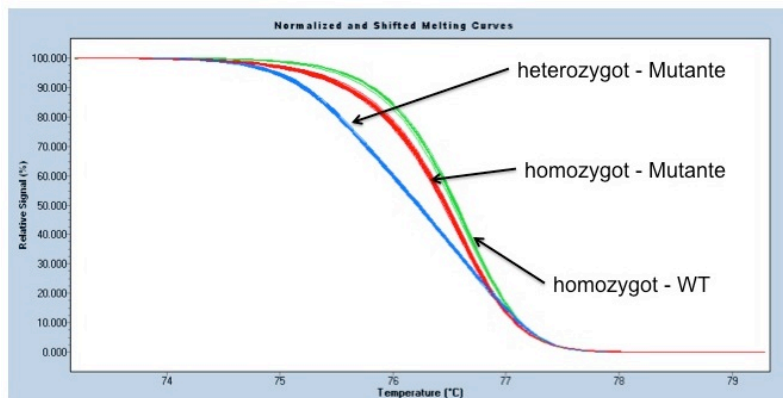


Abb. 14: Beispiel für die Detektion eines SNP mit Hilfe der HRM Methode

Bei steigender Temperatur (x-Achse) fällt das Fluoreszenzsignal (y-Achse) kontinuierlich ab. Die heterozygote Mutante zeigt einen schnelleren Abfall des Fluoreszenzsignals aufgrund der gebildeten thermostabilen Heteroduplexe.

Zur Detektion von Veränderungen der Basenabfolge im PCR Produkt (hier gesucht: SNP) wird die Schmelzkurve betrachtet. Heterozygote DNA erzeugt Heteroduplexe, welche schon bei geringeren Schmelztemperaturen zu Einzelsträngen dissoziieren und somit anders geformte Schmelzkurven erzeugen als homozygote DNA (s. Abb. 15).

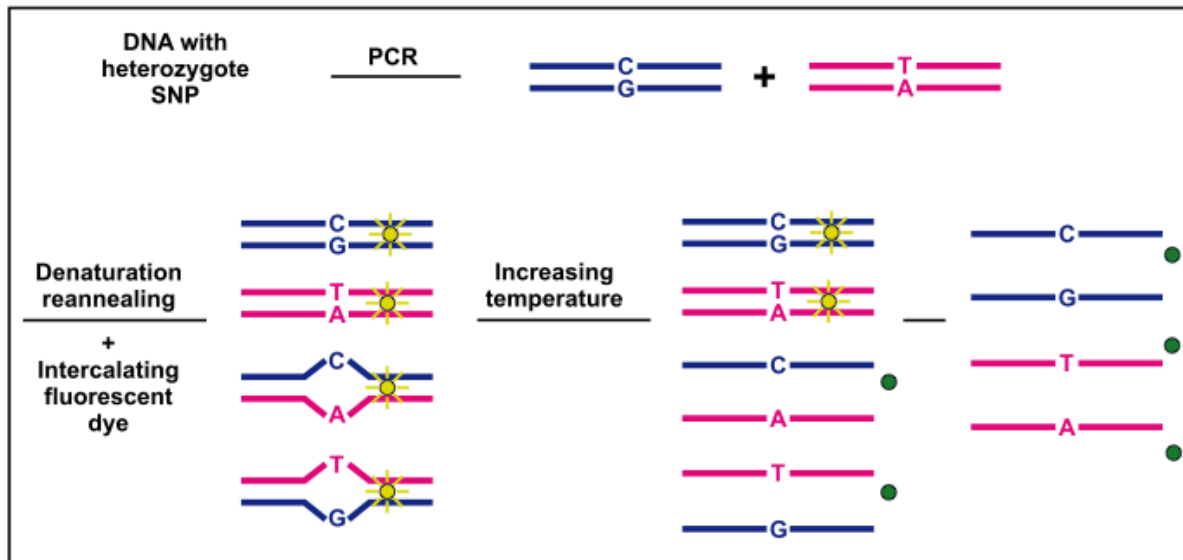


Abb. 15: Theorie der HRM Methode (entnommen aus: LightCycler 480 Gene Scanning Software Anleitung)

Im ersten Schritt der HRM Methode erfolgt eine Real-Time-PCR, bei der die in diesem Beispiel heterozygote DNA vervielfältigt wird. Im zweiten Schritt wird unter Beisein von an dsDNA bindendem Fluoreszenz dye die Temperatur kontinuierlich erhöht. Hierbei dissoziieren die Heteroduplices wegen fehlender Wasserstoffbrücken bei geringeren Temperaturen als die restliche dsDNA, es kommt also zum schnelleren Abfall des Fluoreszenzsignals

Abhängig von der jeweiligen Sequenz und der Anzahl der gebildeten

Wasserstoffbrückenbindungen (Cytosin und Guanin bilden drei, Adenin und Thymin zwei Wasserstoffbrücken) unterscheiden sich auch homozygote Wildtypen (WT) von der homozygoten Mutante (hom).

Abbildung 14 zeigt ein Beispiel in dem sowohl die beiden homozygoten als auch das heterozygote Allel durch Betrachtung der Schmelzkurven zugeordnet werden können. In einigen Fällen lassen sich die Genotypen jedoch nicht eindeutig durch die Beurteilung des Schmelzverhaltens zuordnen. Hier werden einzelne DNA Proben aus jeder Gruppe von DNA Proben, die das gleiche Schmelzverhalten zeigen, sequenziert (3.2.4.2), um den anderen DNA Proben eben dieser Gruppe einen Genotyp zuordnen zu können. Falls es nicht möglich ist, die homozygote Mutante von dem homozygoten Wildtyp zu unterscheiden oder die HRM Methode kein Ergebnis zeigt, muss jede einzelne DNA Probe sequenziert werden, um den Genotyp zuverlässig bestimmen zu können (3.2.4.2).

Die Datenanalyse erfolgt mit Hilfe der LightCycler 480 Gene Scanning Software in vier aufeinanderfolgenden Schritten (a) – (d):

(a) Detektion negativer DNA Proben: DNA Proben, die keine oder eine weniger starke Fluoreszenz als andere Proben aufweisen, werden von der Software erkannt und angezeigt (s. Abb. 16).

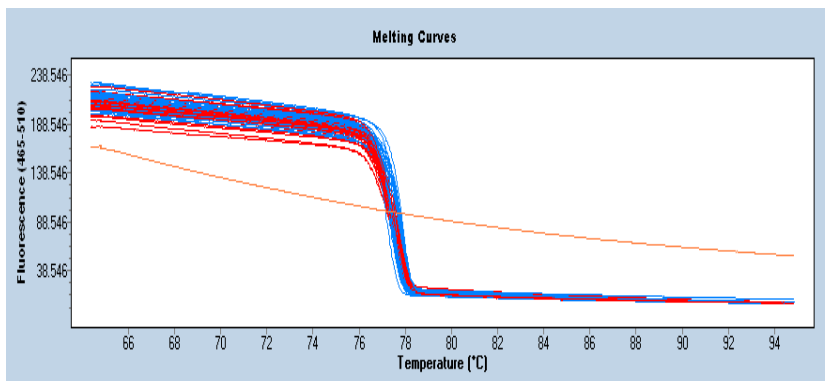


Abb. 16: Nicht-normalisierte Schmelzkurven und Detektion negativer DNA Proben

Negative DNA Probe = orangefarbene Kurve; die x-Achse beschreibt den Anstieg der Temperatur, die y-Achse die Stärke des Fluoreszenzsignals.

(b) Normalisierung der Schmelzkurven: Um die Rohdaten besser interpretieren und analysieren zu können, wird die Ausgangsfluoreszenz aller Schmelzkurven auf 100% gesetzt und die Endfluoreszenz auf 0% (s. Abb. 17).

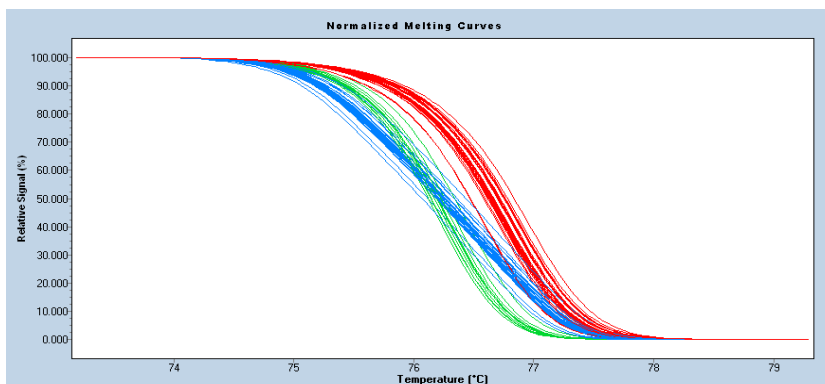


Abb. 17: Normalisierte Schmelzkurven

Die x-Achse beschreibt den Anstieg der Temperatur, die y-Achse die Stärke des Fluoreszenzsignals.

(c) Temperaturverlagerung: Im nächsten Schritt wird die x-Achse der zuvor normalisierten Schmelzkurven an den Punkt verlagert, an dem die gesamte dsDNA denaturiert ist. DNA Proben mit einheitlichem Schmelzverhalten, bzw. DNA mit Schmelzkurven gleichen Verlaufs bilden jetzt klar voneinander differenzierbare Gruppen (s. Abb. 18).

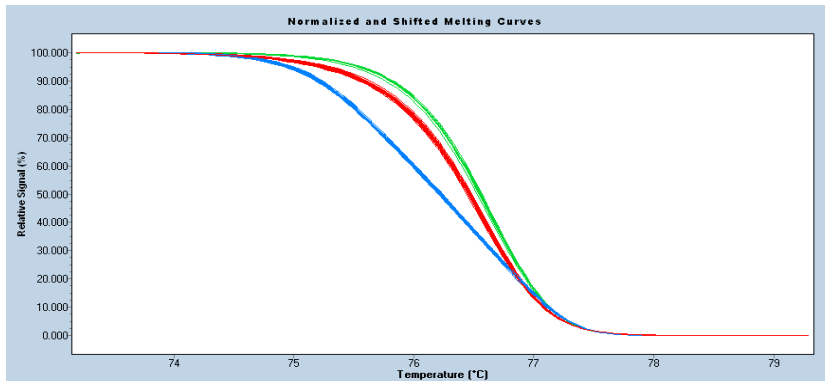


Abb. 18: Normalisierte Schmelzkurven nach Temperaturverlagerung

Die x-Achse beschreibt den Anstieg der Temperatur, die y-Achse die Stärke des Fluoreszenzsignals.

(d) Differenzplot: Um die Unterschiede in den Schmelzkurven weiter analysieren zu können, wird ein Differenzplot erzeugt, indem die Kurven von einer zufällig ausgewählten Referenzkurve abgezogen werden. Jede DNA Probe ist jetzt einer Gruppe zugeordnet, in der sich ausschließlich DNA Proben des gleichen Genotyps befinden (s. Abb. 19).

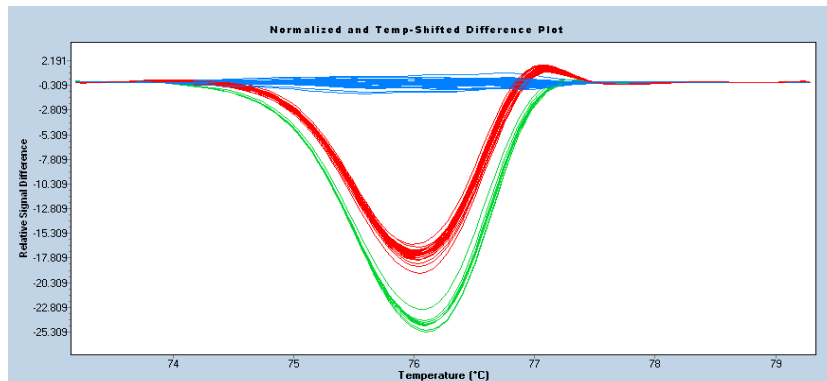


Abb. 19: Differenzplot

heterozygote Mutante (blaue Gruppe), homozygote Wildtypen (grüne Gruppe) und homozygote Mutante (rote Gruppe); als Referenzkurve dient hier eine heterozygote Mutante

Versuchsablauf der HRM Methode

Der Versuchsablauf besteht im ersten Schritt (a) aus der Überprüfung der Funktionalität der Primer in einer PCR und im zweiten Schritt (b) aus der Überprüfung der Funktionalität der Primer in der HRM Methode, um feststellen zu können, ob die Primer für die HRM Methode bzw. die Sequenzierungsanalysen einsetzbar sind. Hierfür wird Test-DNA der Universitätsklinik Magdeburg verwendet. Im letzten Schritt (c) erfolgt die HRM aller DNA Proben mit den zuvor getesteten Primern.

Alle unter 3.1.4 aufgelisteten Primer wurden bei www.thermoscientific.com bestellt und als Trockensubstanzen geliefert. Um eine Konzentration von 100 pmol/µl zu erhalten, wird die, auf dem Quality Certificate zu findende, angegebene Menge aufgereinigtes Wasser hinzu pipettiert. Die Lösung wird – um eine ausreichende Verteilung zu gewährleisten – gemischt und anschließend eine Stunde lang stehen gelassen. Man benötigt eine Konzentration von 2,5 pmol/µl, um die Primer für eine PCR benutzen zu können, weshalb man 10 µl Primer mit 390 µl aufgereinigtem Wasser verdünnt um ein Volumen von 400 µl zu erhalten (s. Abb. 20).

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

$$\Leftrightarrow V_1 = (c_2 * V_2) / c_1$$

$$\Leftrightarrow V_1 = (2,5 \text{ pmol}/\mu\text{l} * 400 \mu\text{l}) / 100 \text{ pmol}/\mu\text{l}$$

$$\Leftrightarrow V_1 = 10 \mu\text{l}$$

Abb. 20: Formel zur Berechnung des gesuchten Primervolumens

$c_1 = 100 \text{ pmol}/\mu\text{l}$; $c_2 = 2,5 \text{ pmol}/\mu\text{l}$; $V_1 = \text{gesuchtes Volumen}$; $V_2 = 400 \mu\text{l}$

(a) Primertestung - PCR:

Ist die gewünschte Konzentration von $2,5 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ erreicht, erfolgt die Primer-Testung mit Hilfe einer Test-DNA. Hierzu legt man jeweils $2 \mu\text{l}$ des Forward (F-) Primers, bzw, $2 \mu\text{l}$ des Reverse (R-) Primers in $0,2 \text{ ml}$ Einzelreaktionsgefäße für die PCR vor, um anschließend pro Reaktion einen Reaktionsansatz (s. Tab. 9) von $16,0 \mu\text{l}$, bestehend aus H_2O , dNTPs, Puffer, MgCl_2 (50 mmol), DMSO 5% , Betaine 5M , Taq Polymerase, und Test-DNA von Proband K01, hinzuzufügen.

	H_2O	dNTPs	Puffer	MgCl_2	DMSO	Betaine	DNA	Taq
Reaktionsansatz	$5,6 \mu\text{l}$	$2 \mu\text{l}$	$2 \mu\text{l}$	$0,6 \mu\text{l}$	$1 \mu\text{l}$	$4 \mu\text{l}$	$0,7 \mu\text{l}$	$0,1 \mu\text{l}$

Tab. 9: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die PCR

Der jeweilige Reaktionsansatz wird gründlich gemischt und im Anschluss zentrifugiert. Nun werden die Einzelreaktionsgefäße in den PCR Thermal Cyclers Duo Cyclers gestellt und das PCR Programm (sog. „PCR-Protokoll nach Erlangen 65“) gestartet. Die Einstellungen hierfür sind in Tabelle 10 aufgelistet.

1. Denaturierung	2. Amplifikation	3. Elongation	4. Abkühlung
94 °C, 3 min	41 Zyklen Denaturierung: 94 °C, 30 s Primerhybridisierung: 65 °C, 45 s Elongation: 72 °C, 45 s	72 °C, 10 min	Ziel 10 °C, andauernd

Tab. 10: PCR-Protokoll nach Erlangen 65

Hiernach erfolgt die Beladung eines 2%igen Agarosegels mit den jeweiligen PCR-Produkten (s. 3.2.2).

In Abbildung 21 ist bei allen 13 SNPs eine deutliche Bande zu erkennen. Die Funktionsfähigkeit der Primer ist somit bewiesen. Die 13 Banden enden annähernd auf gleicher Laufhöhe, weil die 13 produzierten unterschiedlichen Basensequenzen in etwa die gleiche Basenpaaranzahl besitzen, nämlich zwischen 100-250bp.

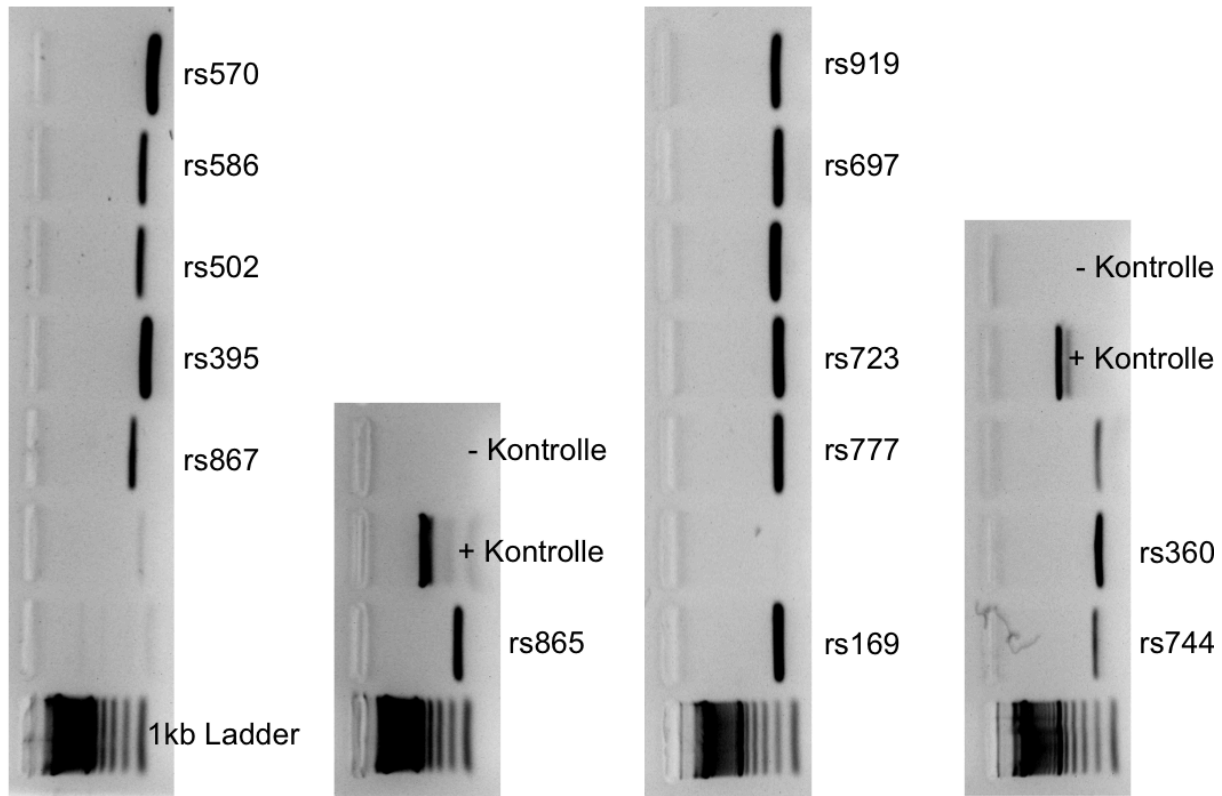


Abb. 21: Bilder der Gelelektrophorese mit den Ergebnissen der Primertestung

Die jeweils unterste Gelkammer enthält den 1kb Leiter, für die Bezeichnung der SNPs wurden die jeweiligen letzten drei Ziffern als Abkürzung genutzt.

(b) Primertestung - HRM

Jeder Primer wird viermal getestet, zweimal mit der Test-DNA K02 und zweimal mit der Test-DNA K06. In die LightCycler 480 Multiwell Platten mit 96 Taschen, werden jeweils 4µl Test-DNA vorgelegt (s. Abb. 22), wobei für jeden Primer eine neue Platte benutzt wird.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K02	K02	K06	K06								
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Abb. 22: Beladung der LightCycler 480 Mutiwell Plate 96 zur HRM-Primer-Testung

Zu der Test-DNA kommt der, zuvor in einem 1,5ml Reaktionsgefäß angesetzten, Reaktionsansatz von 16µl pro Reaktion hinzu (s. Tab. 11). In jedem Well befinden sich jetzt 20µl.

	Primer F	Primer R	MgCl ₂ 25mM	HRM Master Mix
Reaktionsansatz	2 µl	2 µl	2 µl	10 µl

Tab. 11: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die HRM Methode

Nun wird die LightCycler-Platte mit einer Abdeckfolie beklebt und zum Sammeln der gesamten Lösung am Taschenboden zentrifugiert.

Im Anschluss daran wird die LightCycler-Platte in das LightCycler Real-Time PCR System eingesetzt und die HRM gestartet.

Die Abbildung 23 zeigt die HRM-Primer-Testung am Beispiel des SNP rs3110697. Die Test-DNA K02 (rot) bzw. Test-DNA K06 (blau) sind jeweils zweimal als normalisierte Schmelzkurve, als normalisierte Schmelzkurve nach Temperaturverlagerung bzw. als Differenzplot dargestellt. Somit ist belegt, dass die Primer des SNP rs3110697 für die HRM Methode einsetzbar sind. Bei fünf der dreizehn SNPs waren keine Schmelzkurven darstellbar, weshalb hier in der Folge keine HRM-Methode angewendet wurde, sondern die DNA-Proben vollständig sequenziert wurden (rs2270777, rs572169, rs2871865, rs3845395, rs2845744).

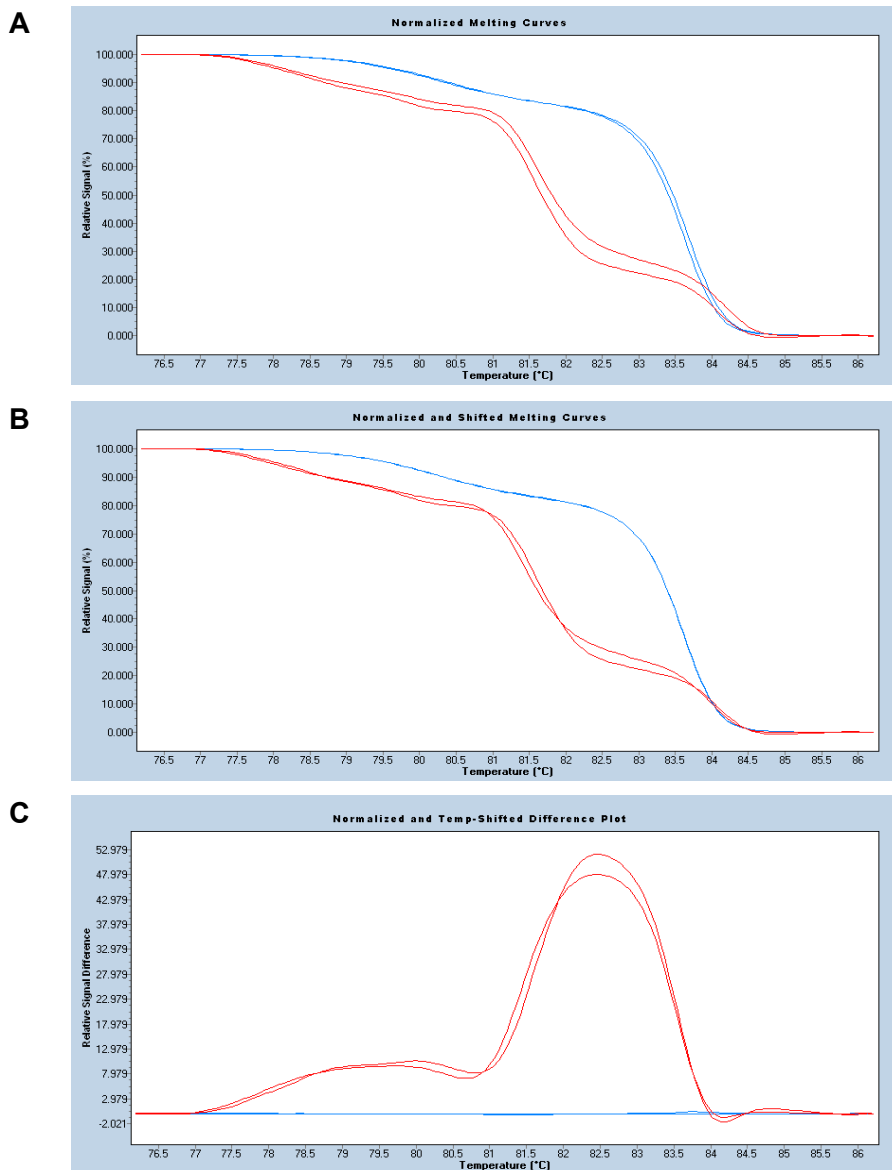


Abb. 23: HRM-Primer-Testung mit SNP rs3110697

A Normalisierte Schmelzkurven

B Normalisierte Schmelzkurven nach Temperaturverlagerung

C Differenzplot: die beiden Test-DNAs besitzen einen unterschiedlichen Genotyp, da die Schmelzkurven von K02 (rot) und K06 (blau) divergieren

(c) HRM der DNA Proben

Für jeden SNP werden zwei LightCycler 480 Multiwell Platten benötigt. In die LightCycler 480 Multiwell Platten mit 96 Taschen, werden jeweils 4 µl Patienten-DNA aus den DNA-Platten A und B vorgelegt (s. Abb. 12 und 13), sodass pro Platte 78 Wells belegt sind.

Der Patienten-DNA werden pro Reaktion 16 μl Reaktionsansatz hinzugefügt (s. Tab. 12). Die Reaktionsansätze werden zuvor in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt. In jedem Well befinden sich nun 20 μl .

	Primer F	Primer R	MgCl ₂ 25mM	HRM Master Mix
Reaktionsansatz	2 μl	2 μl	2 μl	10 μl

Tab. 12: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die HRM Methode

Nun wird die LightCycler-Platte mit einer Abdeckfolie beklebt und zum Sammeln der gesamten Lösung am Taschenboden zentrifugiert.

Im Anschluss daran wird die LightCycler-Platte in das LightCycler Real-Time PCR System eingesetzt und die HRM gestartet. Nach Abschluss des Experiments erfolgt die Auswertung mittels LightCycler 480 Gene Scanning Software (3.2.4.1).

3.2.4.2 DNA-Sequenzierung

Um die Basensequenz in der ein SNP vermutet wird, aufschlüsseln zu können, muss eine Sequenzierung durchgeführt werden. Hierfür gibt es unterschiedliche Vorgehensweisen, wobei die Methode nach Sanger unter Einsatz der Taq-Polymerase als Standard gilt. Für diese Arbeit wurde ein automatischer Sequenzierer benutzt, der ohne radioaktive Substanzen arbeitet.

Die DNA-Sequenzierung ähnelt methodisch, bis auf die Tatsache, dass hierbei lediglich ein Oligonukleotid-Primer eingesetzt wird und zusätzlich mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleotide hinzugefügt werden, dem Ablauf einer PCR (s. 3.2.1).

Der für eine DNA-Sequenzierung benötigte Ansatz besteht aus mehreren Komponenten:

- PCR-Produkt
- Forward- oder Reverse- Oligonukleotidprimer
- DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase)
- Desoxyribonukleotide (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Didesoxyribonukleotide (ddNTPs: ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)
- Mg^{2+} -Ionen (Polymerase benötigt für ihre Aktivität freies Magnesium)
- Puffer (Taq-Polymerase erreicht ihr Aktivitätsmaximum bei pH-Werten > 8)

Zunächst wird die DNA denaturiert, um die Doppelstränge aufzubrechen. An die nun einzelsträngige DNA lagert sich der Primer an, an welchen wiederum durch die Polymerase Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) angebaut werden. Mit Hilfe des komplementären Matrizenstrangs und dem Primer kann in Folge dessen ein zweiter DNA-Strang entstehen. Sobald es zum Einbau eines Didesoxyribonukleosidtriphosphat (ddNTPs) kommt wird die Strangsynthese abgebrochen. Aufgrund der hohen Menge an DNA-Molekülen – ermöglicht durch die vorausgegangene PCR – geschehen diese Syntheseabbrüche bei jeder einzelnen Base der DNA-Sequenz mehrere Male. Durch mehrfache Wiederholung des Ablaufs liegen schlussendlich zahlreiche neu synthetisierte Einzelstränge vor. Anschließend analysiert ein automatisches Sequenzierungsgerät den Sequenzierungsansatz. Hierfür werden die Einzelstränge entsprechend ihrer in einer mit einem Polymer gefüllten Kapillare getrennt. Ein Laser-Detektor erfasst am Ende der Kapillare die abgestrahlte Fluoreszenz. Eine Auswertungs-Software schreibt dann die gemessene Fluoreszenz - in Form von grünen (Adenin), schwarzen (Guanin), blauen (Cytosin) und roten (Thymin) Peaks - in die Basensequenz um. Applied Biosystems entwickelte die Markierung der vier Didesoxynucleotide mit verschiedenen Farbstoffen, sodass die Sequenzier-Reaktion in nur einem Gefäß bzw. Ansatz durchgeführt werden kann. Der Ablauf der Sequenzierung ist nochmals in Abbildung 24 zusammengefasst.

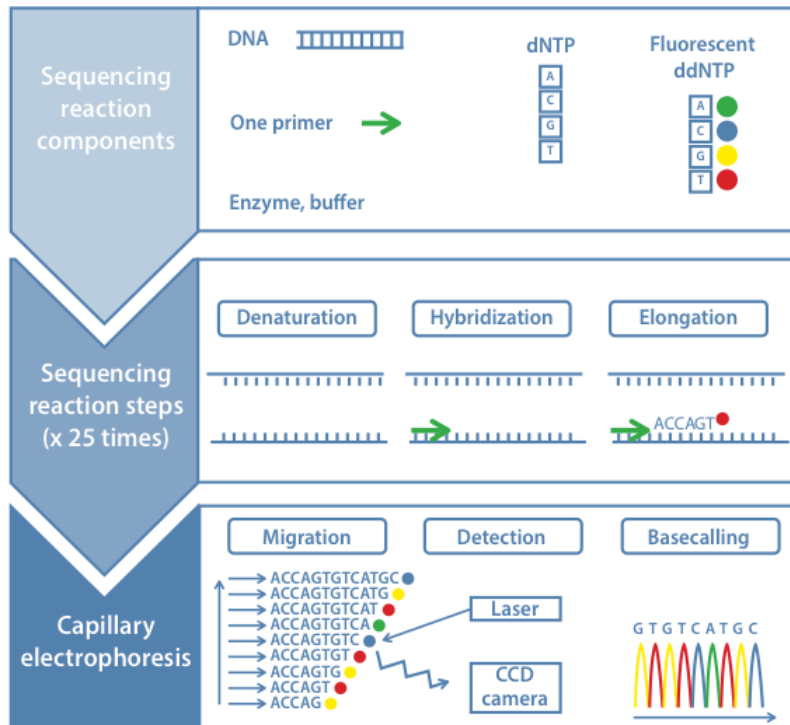


Abb. 24: Zusammenfassung der einzelnen Schritte einer DNA-Sequenzierung (entnommen aus: Applied Biosystems® Genetic Analyzers Manuals)

Sequenzierung vollständiger DNA Platten

Bei fünf der dreizehn SNPs (rs2270777, rs572169, rs2871865, rs3845395, rs2854744) war es nicht möglich, den Genotyp durch die HRM Methode mit anschließender Sequenzierung einzelner DNA Proben zu bestimmen. Deshalb erfolgte die Sequenzierung jeder einzelnen DNA Probe in sechs aufeinanderfolgenden Schritten (a) bis (f).

(a) PCR

Für jeden SNP, für den eine vollständige Sequenzierung aller DNA Proben notwendig ist, werden zwei 96 Well PCR Platten benötigt. In die PCR Platten wird pro Well 4 µl Patienten-DNA aus den DNA-Platten A und B nach selbigem Schema vorgelegt (s. Abb. 12 und 13.), sodass pro Platte 78 Wells belegt sind. Zu der Patienten-DNA kommt ein Reaktionsansatz von 16 µl hinzu (s. Tab. 13), welcher zuvor für alle Reaktionen zusammen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt wurde. Dieser Reaktionsansatz

besteht aus H₂O, dNTPs, Puffer, MgCl₂, DMSO, Betaine 5M, Taq-Polymerase und den Primern F und R. In jedem Well befinden sich jetzt 20 µl.

	H ₂ O	dNTPs	Puffer	MgCl ₂	DMSO	Betaine	Taq	F	R
Reaktionsansatz	2,3 µl	2 µl	2 µl	0,6 µl	1 µl	4 µl	0,1 µl	2 µl	2 µl

Tab. 13: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die PCR

Die Platten werden mit Klebefolie versiegelt, zentrifugiert und in den PCR Thermal Cyclers Duo Cycler gestellt. Das angewandte PCR Protokoll ist ebenfalls Tabelle 10 zu entnehmen („PCR-Protokoll nach Erlangen 65“).

Nach Beendigung des PCR Programms werden stichprobenartig PCR Produkte zur Überprüfung der PCR Qualität auf 2%iges Agarosegel aufgetragen (s. 3.2.2) .

(b) PCR - Cleanup

Im Anschluss an die PCR erfolgt die Aufreinigung der PCR Produkte, um eine höhere Qualität in der Sequenzierprodukte zu erreichen. Die Aufreinigung erfolgt automatisch mit Hilfe des Agencourt AMPure XP PCR Purification Systems von Beckman Coulter. Das Prinzip nachdem diese Aufreinigung abläuft ist in der Abbildung 25 beschrieben.

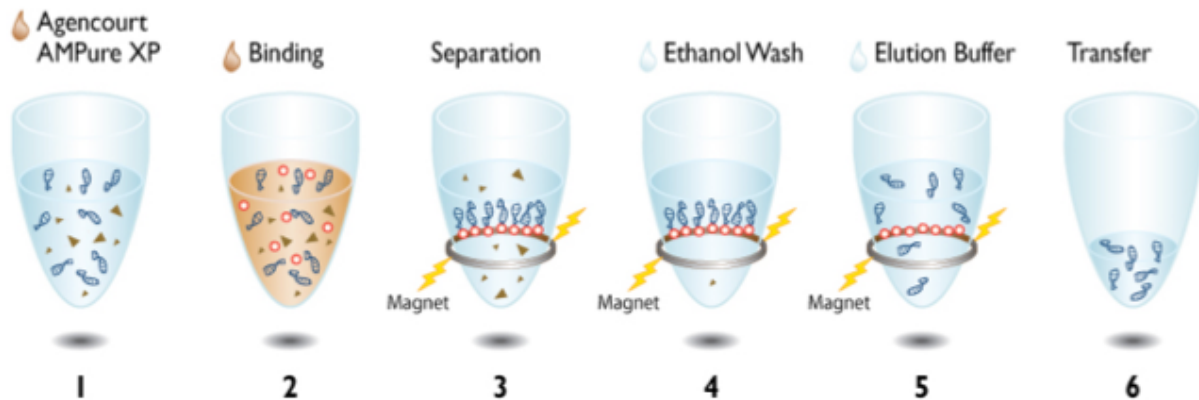


Abb. 25: Ablauf der PCR Aufreinigung mittels Agencourt AMPure XP PCR Purification Systems von Beckman Coulter (AMPureXP Protokoll)

1 Zu den PCR Produkten werden magnetische Kügelchen hinzugefügt

2 Die magnetischen Kügelchen binden an die PCR Produkte

3 Hier wird ein Magnet eingesetzt an den die PCR Produkte mit Hilfe der magnetischen Kügelchen können um die PCR Produkte von Verunreinigungen zu separieren

4 Im Anschluss wird die Lösung zweimal mit 70%igem Alkohol gewaschen, um Verunreinigungen zu beseitigen

5 Um die PCR Produkte von den magnetischen Kügelchen zu trennen wird ein Elutionspuffer hinzugegeben

6 Da die magnetischen Kügelchen noch immer an den Magneten gebunden sind, können die aufgereinigten PCR Produkte durch abpipettieren der Lösung in eine neue PCR Platte übertragen werden

(c) Sequenzierprogramm ABI seq e1

Aus den PCR Platten werden mit Hilfe einer Mehrkanalpipette 0,5 µl PCR Produkt entnommen und in eine Micro Amp Fast 96 Well Platte überführt. Hinzu kommen je 0,6 µl Forward- oder Reverse-Primer. Das Pipettierschema für PCR Produkte und Primer kann den Abbildungen 26 bis 29 entnommen werden. Im Anschluss daran wird ein Reaktionsansatz (3,9 µl) - bestehend aus H₂O, Puffer und Big Dye, der zuvor für alle Reaktionen gemeinsam in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt wurde (s. Tab. 15), hinzugefügt. In jedem Well befinden sich jetzt 5 µl. Nach Bekleben der Platten mit Plattenfolie, werden sie zentrifugiert und in den Fast Thermal Cycler gestellt und das Programm mit den in Tabelle 14 aufgelisteten Einstellungen gestartet.

1. Amplifikation	2. Elongation	3. Abkühlung
26 Zyklen 96 °C, 10 sec 55 °C, 10 sec 60 °C, 60 sec	72 °C, 10 min	Ziel 10 °C, dauerhaft

Tab. 14: Protokoll des Cyclerprogramms

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	WS3	WS13	WS22	WS36	WS46	WS58	WS3	WS13	WS22	WS36	WS46	WS58
B	WS4	WS14	WS25	WS38	WS49	WS59	WS4	WS14	WS25	WS38	WS49	WS59
C	WS5	WS16	WS26	WS40	WS50	WS60	WS5	WS16	WS26	WS40	WS50	WS60
D	WS7	WS17	WS27	WS41	WS51	WS61	WS7	WS17	WS27	WS41	WS51	WS61
E	WS8	WS18	WS30	WS42	WS54	WS62	WS8	WS18	WS30	WS42	WS54	WS62
F	WS10	WS19	WS31	WS43	WS55	WS63	WS10	WS19	WS31	WS43	WS55	WS63
G	WS11	WS20	WS34	WS44	WS56	WS65	WS11	WS20	WS34	WS44	WS56	WS65
H	WS12	WS21	WS35	WS45	WS57	WS70	WS12	WS21	WS35	WS45	WS57	WS70

Abb. 26: Micro Amp Fast 96 Well Platte mit PCR Produkten der Proben WS3 bis WS70
hellgrau hinterlegte Felder = Primer F; dunkelgrau hinterlegte Felder = Primer R

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	WS73	WS84	WS99	WS113			WS73	WS84	WS99	WS113		
B	WS76	WS85	WS101b	WS115			WS76	WS85	WS101b	WS115		
C	WS77	WS86	WS102b	WS116			WS77	WS86	WS102b	WS116		
D	WS78	WS87	WS103a	WS118			WS78	WS87	WS103a	WS118		
E	WS79	WS89	WS104a	WS119			WS79	WS89	WS104a	WS119		
F	WS81	WS91	WS105b	WS120			WS81	WS91	WS105b	WS120		
G	WS82	WS95	WS106b				WS82	WS95	WS106b			
H	WS83	WS97	WS107				WS83	WS97	WS107			

Abb. 27: Micro Amp Fast 96 Well Platte mit PCR Produkten der Proben WS73 bis WS120
hellgrau hinterlegte Felder = Primer F; dunkelgrau hinterlegte Felder = Primer R

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	WS121	WS132	WS142	WS154a	WS166	WS184a	WS121	WS132	WS142	WS154a	WS166	WS184a
B	WS122	WS133	WS143	WS157	WS167	WS186a	WS122	WS133	WS143	WS157	WS167	WS186a
C	WS123	WS134	WS144	WS158	WS169	WS187a	WS123	WS134	WS144	WS158	WS169	WS187a
D	WS124	WS136	WS145	WS159	WS175	WS188a	WS124	WS136	WS145	WS159	WS175	WS188a
E	WS125	WS137	WS146	WS161	WS176	WS189a	WS125	WS137	WS146	WS161	WS176	WS189a
F	WS126	WS138	WS148b	WS162	WS178	WS190a	WS126	WS138	WS148b	WS162	WS178	WS190a
G	WS127	WS140	WS149	WS164	WS181	WS191a	WS127	WS140	WS149	WS164	WS181	WS191a
H	WS131	WS141	WS150	WS165	WS182	WS192a	WS131	WS141	WS150	WS165	WS182	WS192a

Abb. 28: Micro Amp Fast 96 Well Platte mit PCR Produkten der Proben WS121 bis WS192a

hellgrau hinterlegte Felder = Primer F; dunkelgrau hinterlegte Felder = Primer R

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	WS193a	WS201	WS209	WS219			WS193a	WS201	WS209	WS219		
B	WS194	WS202	WS210	WS220			WS194	WS202	WS210	WS220		
C	WS195	WS203	WS212	WS222			WS195	WS203	WS212	WS222		
D	WS196	WS204	WS213	WS223			WS196	WS204	WS213	WS223		
E	WS197	WS205	WS214	WS224			WS197	WS205	WS214	WS224		
F	WS198	WS206	WS215a	WS227			WS198	WS206	WS215a	WS227		
G	WS199	WS207	WS216				WS199	WS207	WS216			
H	WS200	WS208	WS218				WS200	WS208	WS218			

Abb. 29: Micro Amp Fast 96 Well Platte mit PCR Produkten der Proben WS193a bis WS227

hellgrau hinterlegte Felder = Primer F; dunkelgrau hinterlegte Felder: Primer R

	H ₂ O	Puffer	Big Dye
Reaktionsansatz	2,65 µl	1 µl	0,25 µl

Tab. 15: Reaktionsansatz für die Sequenzierung

(d) Sequenzieraufreinigung

Im Anschluss an die Sequenzierungsreaktion erfolgt die Aufreinigung der Produkte um eine höhere Qualität zu ermöglichen. Die Aufreinigung erfolgt automatisch mit Hilfe des Agencourt CleanSEQ Dye-Terminator Removal Systems von Beckman Coulter. In der Abbildung 30 ist das Prinzip, nach welchem die Aufreinigung abläuft dargestellt.

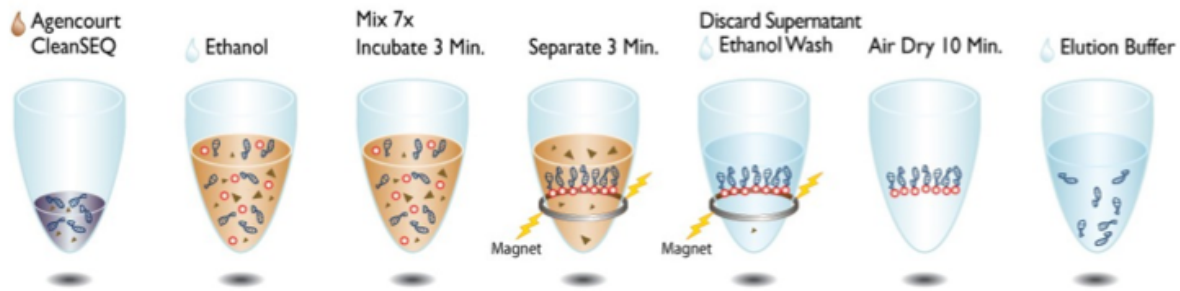


Abb. 30: Ablauf der Aufreinigung der Produkte der Sequenzierungsreaktion mittels Agencourt CleanSEQ – Dye Terminator Removal von Beckman Coulter in drei Schritten (Agencourt CleanSEQ Protokoll)

- 1 Die Produkte der Sequenzierungsreaktion werden mit Hilfe der magnetischen Kügelchen und einem Magneten von Verunreinigungen (Dye, Nukleotide, Salze, etc.) getrennt
- 2 Im Anschluss wird die Lösung zweimal mit 85%igem Alkohol gewaschen, um diese Verunreinigungen zu beseitigen
- 3 Um die PCR Produkte von den magnetischen Kügelchen zu trennen, wird ein Elutionspuffer hinzugegeben

(e) ABI-Programm Rapid

Für das ABI Programm Rapid wurde der Big Dye Terminator BDTv1.1 und das Polymer POP7 verwendet. Das Basecalling Protocoll heißt BDTv1.1_PA_Protocoll-POP7, das Instrument Protocoll heißt RapidSeq50_POP7xl_1DyeE_BDT1.1. Die Details zum Instrument Protokoll lauteten wie folgt:

- Oven Temp: 60 °C
- Run Time: 1400 sec
- Run Voltage: 19,5 kV
- PreRunTime: 90 sec
- Pre Run Voltage: 18 kV
- Injection Time: 15 sec
- Injection Voltage: 1,6 kV
- Data Delay: 1 sec

(f) SeqPilot zur Auswertung der Sequenzen

Abbildung 31 zeigt ein Beispiel zur Auswertung dreier Basensequenzen mit Hilfe des Programms SeqPilot.

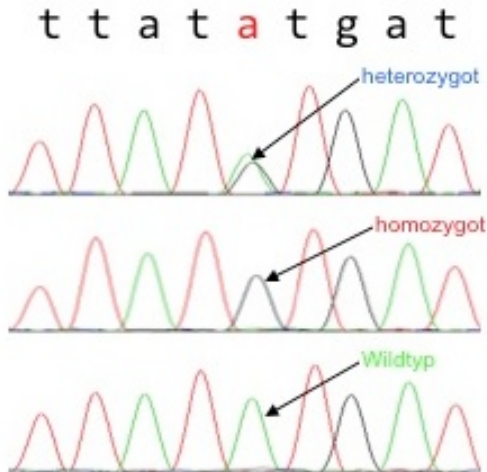


Abb. 31: Ausschnitt der Basensequenzen dreier DNA Proben nach erfolgter Sequenzierung durch einen automatischen Sequenzierer

Die vier Didesoxynukleotide sind mit verschiedenen Farbstoffen markiert worden (Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz)

Sequenzierung einzelner DNA Proben

Um jeder DNA-Proben einen Genotypen zuordnen zu können, wird im Anschluss an die HRM-Methode aus jeder einzelnen Gruppe zufällig eine DNA-Probe ausgewählt und sequenziert. Anstelle von Platten werden hierfür Einzelreaktionsgefäße benutzt. Der generelle Ablauf, bzw. die Protokolle hierfür können dem Abschnitt „Sequenzierung vollständiger DNA Platten“ entnommen werden.

3.2.5 GHR Exon 3 Deletion - Projekt

3.2.5.1 Primertestung - PCR

Die benötigten Primer-Sequenzen stammen von ThermoFischerScientific und wurden als Trockensubstanzen geliefert. Die Aufarbeitung dieser Trockensubstanzen erfolgt nach dem gleichen Schema, das bereits im Abschnitt „Primertestung“ unter Punkt 3.2.4.1 High Resolution Melting erörtert wird.

Zunächst wird mit den bearbeiteten Primern und verschiedenen Test-DNAs ein Probedurchlauf gestartet, wobei das PCR-Protokoll der Arbeit von Pantel et al. (105) entnommen wurde. Jedoch war hierbei die Bandenqualität nicht ausreichend, um die Genotypen zuordnen zu können, weshalb die Elongationszeit der Amplifikation von 1,5 min auf 1 min verkürzt wurde. Mit diesem modifizierten PCR-Protokoll nach Pantel et al. konnten bessere Ergebnisse erzielt werden, weshalb es für die PCR der Patienten DNA angewendet wurde.

Modifiziertes PCR-Protokoll nach Pantel et al.

Zunächst wird in eine 8er Reihe PCR Einzelreaktionsgefäße 4 µl Test-DNA vorgelegt (s. Tab. 16). Die Primer werden hinzu pipettiert, das Pipettierschema ist ebenfalls in Tabelle 16 zu aufgeführt.

A	B	C	D	E	F	G	H
K01_G1F +G2R	K01_G1F +G3R	K01_Test primer	Negativ- kontrolle	K01_4 µl PM	K01_2 µl PM	K02_4 µl PM	K02_2 µl PM

Tab. 16: Vorlage der DNA bzw. der Primer für die PCR-Primertestung

K01 = Test-DNA Nr. 1; K02 = Test-DNA Nr. 2; Negativkontrolle = beinhaltet keine Test-DNA; G1F = Forward Primer; G2R / G3F = Reverse Primer; PM = 2 µl G1F + 1 µl G2R + 1 µl G3R

Zur Test-DNA und den Primern kommt der zuvor in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß angesetzte Reaktionsansatz - bestehend aus H₂O, dNTPs, Puffer, MgCl₂, DMSO, Betaine und Taq Polymerase - von 12 µl hinzu (s. Tab. 17).

	H ₂ O	dNTPs	Puffer	MgCl ₂	DMSO	Betaine	Taq
Reaktionsansatz	2,3 µl	2 µl	2 µl	0,6 µl	1 µl	4 µl	0,1 µl

Tab. 17: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die PCR

Nachdem man die Deckel der Einzelreaktionsgefäße geschlossen hat, werden sie zentrifugiert und in den PCR Thermal Cyclers Duo Cyler gestellt und das PCR-Programm gestartet. Das PCR-Protokoll (sog. „Modifiziertes PCR-Protokoll nach Pantel et al.“) ist der Tabelle 18 zu entnehmen.

1. Denaturierung	2. Amplifikation	3. Elongation	4. Abkühlung
94 °C, 5 min	35 Zyklen Denaturierung: 94 °C, 30 s Primerhybridisierung: 60 °C, 30 s Elongation: 72 °C, 1 min	72 °C, 7 min	Ziel 10 °C, andauernd

Tab. 18: Modifiziertes PCR-Protokoll nach Pantel et al.

Nach Beendigung des PCR Programms werden die Einzelreaktionsgefäße aus dem PCR Thermal Cyclers Duo Cyler genommen und die PCR Produkte zur Darstellung der Banden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen (s. 3.2.2).

3.2.5.2 PCR der DNA Proben

Aus den DNA-Platten A und B (s. Abb. 12 und 13) werden jeweils 4 µl entnommen und in PCR-Platten (A und B) vorgelegt. Anschließend wird in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß der Reaktionsansatz bestehend aus H₂O, dNTPs, Puffer, MgCl₂, DMSO, Betaine, Primermix (PM) und Taq Polymerase für die gesamten 156 Proben angesetzt (s. Tab. 18). Bevor aus diesem Reaktionsgefäß nun für jedes Well 16 µl Reaktionsansatz entnommen und zu der vorgelegten DNA hinzupipettiert werden, wird der Ansatz gemischt und zentrifugiert.

	H ₂ O	dNTPs	Puffer	MgCl ₂	DMSO	Betaine	Taq	PM
Reaktionsansatz	2,3 µl	2 µl	2 µl	0,6 µl	1 µl	4 µl	0,1 µl	4 µl

Tab. 19: Zusammensetzung des Reaktionsansatz für die PCR

Die PCR Platten werden mit PCR Plattenfolie versiegelt, zentrifugiert und in den PCR Thermal Cyclers Duo Cyler gestellt. In der Folge wird das modifizierte PCR-Protokoll nach Pantel et al. gestartet (s. Tab. 18).

Nach Beendigung der PCR werden die PCR Produkte zur Darstellung auf 2%iges Agarosegel (s. 3.2.2) aufgetragen. Die Auswertung der Gele (s. Abschnitt 6.3) erfolgt nach dem Schema, das der Abbildung 32 zu entnehmen ist.

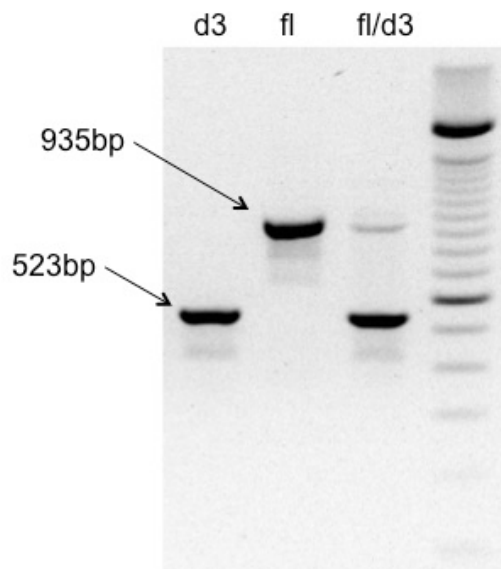


Abb. 32: Schema zur Auswertung des Genotyps der DNA Proben

d3 = Patient ist homozygot (Mutante) für die Deletion im Exon 3 des Growth Hormone Receptor; fl = Volllängenrezeptor; d3/fl = Patient ist heterozygot für die Deletion im Exon 3 des Growth Hormone Receptor

3.2.6 Statistik

Um die Ansprechbarkeit auf eine Therapie mit rhGH zu objektivieren, wird der sog. „Index of Responsivness“ (IoR) verwendet. Er stammt aus einem von Ranke und Lindberg (113) entwickelten Vorhersagemodell der Ansprechbarkeit auf rhGH („prediction model to measure responsivness to growth hormone“) und ist ein dimensionsloser Parameter, in den die Faktoren Alter bei Therapiebeginn, Dosierung der Wachstumshormontherapie, maximal erreichte GH-Konzentration bei

Stimulationstest, Größe und Gewicht bei Therapiebeginn, mittlere Elterngröße und Geburtsgewicht eingehen.

Das Ansprechen wird unterteilt in

- „high responder“ $\hat{=}$ $IoR > 1,3$
- „average responder“ $\hat{=}$ $-1,29 < IoR < 1,29$
- „low responder“ $\hat{=}$ $IoR < -1,3$

Zunächst wird mit Hilfe zweier alternativer Tests (Kolmogorov-Smirnov-Test und Shapiro-Wilk-Test) geprüft ob für den Parameter IoR eine Normalverteilung vorliegt. Hierfür wird zunächst das gesamte Patientenkollektiv von 101 Kindern für das SNP-Projekt bzw. von 81 Kindern für das GHR Exon 3 Deletion-Projekt untersucht. Sowohl die Ergebnisse der Tests auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test s. Tab. 20; Shapiro-Wilk-Test s. Tab. 21) mit einem p-Wert $> 0,05$, als auch das Q-Q-Diagramm (s. Abb. 33) und das Histogramm (s. Abb. 34) zeigen eine Normalverteilung des IoR. Im Anschluss daran werden die jeweiligen Gruppen mit gleichem Genotypen (homozygote Wildtypen, homozygote und heterozygote Mutante) für jeden SNP separat getestet. Hier konnte ebenfalls eine Normalverteilung festgestellt werden (Kolmogorov-Smirnov-Test bzw. Shapiro-Wilk-Test mit p-Werten $> 0,05$).

	Statistik	df	Sig.
IoR	0,057	101	0,200
IoR	0,088	81	0,191

Tab. 20: Kolmogorov-Smirnov-Test zur Überprüfung auf Normalverteilung des IoR

Erste Spalte für das Patientenkollektiv von 101 Kindern des SNP-Projekts; Zweite Spalte für das Patientenkollektiv von 81 Kindern des GHR Exon 3 Deletion-Projekt; p-Werte $> 0,05$ sprechen für eine Normalverteilung der Variablen

	Statistik	df	Sig.
IoR	0,995	101	0,960
IoR	0,987	81	0,595

Tab. 21: Shapiro-Wilk-Test zur Überprüfung auf Normalverteilung des IoR

Erste Spalte für das Patientenkollektiv von 101 Kindern des SNP-Projekts; Zweite Spalte für das Patientenkollektiv von 81 Kindern des GHR Exon 3 Deletion-Projekt; p-Werte > 0,05 sprechen für eine Normalverteilung der Variablen

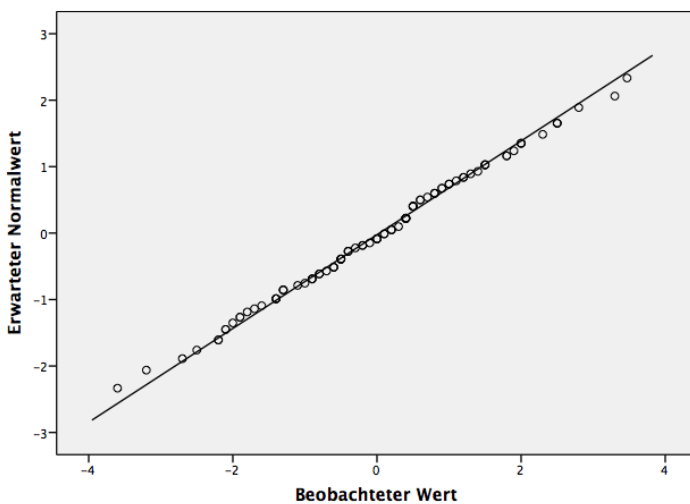


Abb. 33: Q-Q-Diagramm des IoR zur Testung auf Normalverteilung für das SNP-Projekt

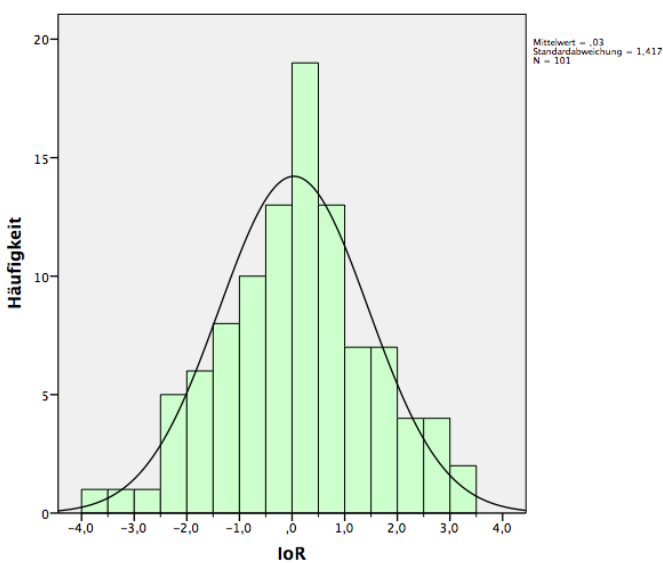


Abb. 34: Histogramm mit Normalverteilungskurve für die Variable IoR für das SNP-Projekt

Nach Feststellung der Normalverteilung des Parameters IoR dürfen eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und ein t-Test für unabhängige Stichproben unter zusätzlicher Hinzunahme eines Levene-Tests zur Überprüfung auf Homogenität der Varianzen angewendet werden.

Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wird zunächst eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Verglichen werden die Mittelwerte des IoR zwischen den Gruppen homozygoter Wildtypen, homozygoter Mutanten und heterozygoter Mutanten. Statistische Signifikanz wird für p -Werte $< 0,05$ angenommen. Im Falle eines statistisch signifikanten Ergebnisses der einfaktoriellen ANOVA folgt im Anschluss ein Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest. Bei Varianzgleichheit ($p > 0,05$ im Levene-Test) kommt hierfür der Tukey-Test und bei Varianzungleichheit ($p < 0,05$ im Levene-Test) der Tamhane-Test zum Einsatz. Kann in der einfaktoriellen ANOVA bzw. im Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest ein signifikanter Unterschied zwischen einzelnen Genotypen ermittelt werden, wird anschließend ein t-Test für unabhängige Stichproben hinzugefügt, um diese beiden Genotypen gesondert miteinander vergleichen zu können.

4 ERGEBNISSE

4.1 SNP - Projekt

Von den initial 156 in die Studie aufgenommen Patienten mit GHD wurden bei 101 Patienten die Genotypen der untersuchten SNPs bestimmt und der IoR berechnet. Aufgrund fehlender Hintergrundinformationen zur Berechnung des IoR mussten die restlichen 55 Patienten aus dem Patientenkollektiv gestrichen werden.

Ausgeschlossen sind Patienten mit GHD in Folge onkologischer Grunderkrankungen (s. 3.1.5.). Die Intervention bestand aus einer täglichen subcutanen rhGH Applikation über ein Jahr hinweg und der Dokumentation der Wachstumsparameter in dreimonatigen Abständen.

4.1.1 SNP rs2888586 im SOS1 Gen

Die Diagramme der Mittelwerte (s. Abb. 35), der Boxplots (s. Abb. 36) und der jeweiligen Konfidenzintervalle (s. Tab. 22) deuten darauf hin, dass sich die Ansprechraten auf eine rhGH Therapie zwischen den einzelnen Genotypen unterscheiden.

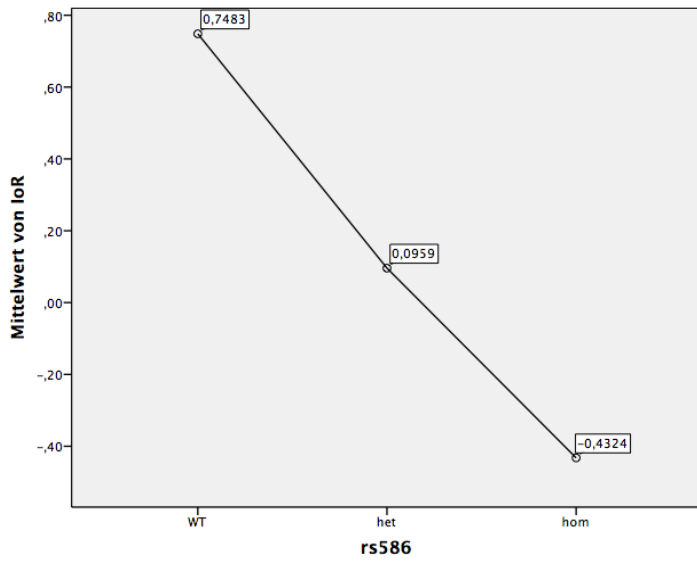


Abb. 35: SOS1 Gen rs2888586 Vergleich der Mittelwerte des IoR

WT = homozygoter Wildtyp, het = heterozygote Mutante, hom = homozygote Mutante

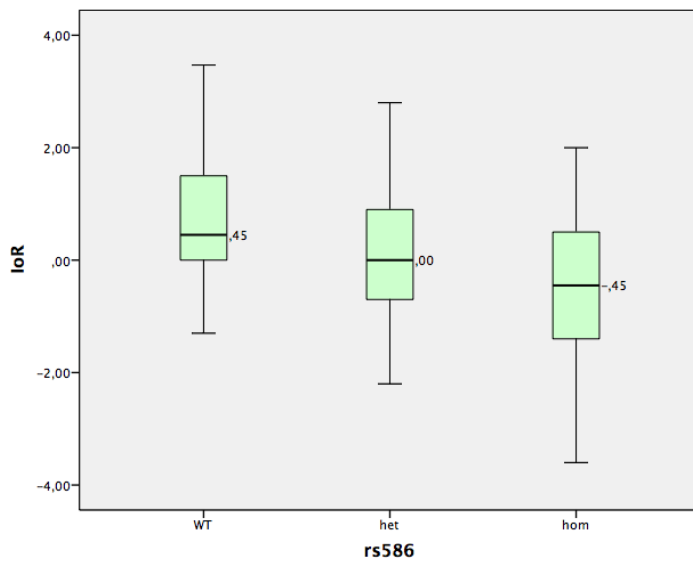


Abb. 36: SOS1 Gen rs2888586 Boxplots mit Median und 25. bzw. 75. Perzentile des IoR

WT = homozygoter Wildtyp, het = heterozygote Mutante, hom = homozygote Mutante

	n	M	SD	SE	95 % KI für M		Min	Max
					Untergrenze	Obergrenze		
het	49	0,0959	1,3229	0,1890	-0,2841	0,4759	-2,20	2,80
hom	34	-0,4324	1,4535	0,2493	-0,9395	0,0748	-3,60	2,00
WT	18	0,7483	1,3377	0,3153	0,0831	1,4136	-1,30	3,47
Gesamt	101	0,0344	1,4174	0,1410	-0,2455	0,3142	-3,60	3,47

Tab. 22: SOS1 Gen rs2888586 Deskriptive Statistik des IoR

WT = homozygoter Wildtyp, het = heterozygote Mutante, hom = homozygote Mutante

Die einfaktorielle ANOVA ergibt eine statistische Signifikanz von $p = 0,014$ (s. Tab. 23). Im Post-Hoc-Test sticht der Vergleich von homozygoten Wildtypen (AA) und homozygoten Mutanten (GG) hervor, da der hierfür errechnete p-Wert bei 0,011 (s. Tab. 25) liegt.

	QS	df	QMW	F	Sig.
Zwischen den Gruppen	16,767	2	8,384	4,462	0,014
Innerhalb der Gruppen	184,134	98	1,879		
Gesamt	200,902	100			

Tab. 23: SOS1 Gen rs2888586 Einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Mittelwerte des IoR

Levene-Statistik	df1	df2	Sig.
0,358	2	98	0,700

Tab. 24: SOS1 Gen rs2888586 Levene-Test zur Überprüfung der Homogenität der Varianzen

$p > 0,05$ spricht für Varianzgleichheit; $p < 0,05$ spricht für Varianzungleichheit

(I) rs586	(J) rs586	MD (I-J)	SE	Sig.	95 % KI	
					Untergrenze	Obergrenze
het	hom	0,5283	0,3060	0,200	-0,1999	1,2564
	WT	-0,6524	0,3778	0,200	-1,5515	0,2467
hom	het	-0,5283	0,3060	0,200	-1,2564	0,1999
	WT	-1,1807	0,3996	0,011	-2,1316	-0,2298
WT	het	0,6524	0,3778	0,200	-0,2467	1,5515
	hom	1,1807	0,3996	0,011	0,2298	2,1316

Tab. 25: SOS1 Gen rs2888586 PostHoc-Test zum Mehrfachgruppenvergleich
hier: Tukey weil Varianzgleichheit angenommen wird

Infolgedessen wird ein t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt, der ausschließlich homozygote Wildtypen (AA) und homozygote Mutanten (GG) (s. Tab. 26) miteinander vergleicht. Bei Annahme von Varianzgleichheit (p-Wert im Levene-Test > 0,05 s. Tab. 27) liegt der p-Wert nun bei 0,006 (s. Tab. 27). Man kann daher von einer hohen Signifikanz (p-Wert < 0,01) sprechen.

	n	M	SD	SE
hom	34	-0,4324	1,4535	0,2493
WT	18	0,7483	1,3377	0,3153

Tab. 26: SOS1 Gen rs2888586 Deskriptive Statistik des IoR
WT = homozygoter Wildtyp, hom = homozygote Mutante

	Levene-Test		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-seitig)	MD	SE Diff.	95% KI der Differenz	
								Unterer	Oberer
Varianzgleichheit	0,476	0,493	-2,862	50	0,006	-1,18069	0,41251	-2,00924	-0,35214
Varianzungleichheit			-2,938	37,371	0,006	-1,18069	0,40193	-1,99480	-0,36657

Tab. 27: SOS1 Gen rs2888586 Levene-Test und t-Test für unabhängige Stichproben zum Vergleich der Mittelwerte des loR zwischen homozygoter Mutante und homozygoten Wildtypen

4.1.2 SNP rs2069502 im CDK4 Gen

Wie in 4.1.1. beschrieben sind auch für den SNP rs2069502 im CDK4 Gen das Diagramm der Mittelwerte (s. Abb. 37) und der Boxplots (s. Abb. 38) sowie die Konfidenzintervalle (s. Tab. 28) bereits Hinweis gebend für eine statistische Signifikanz.

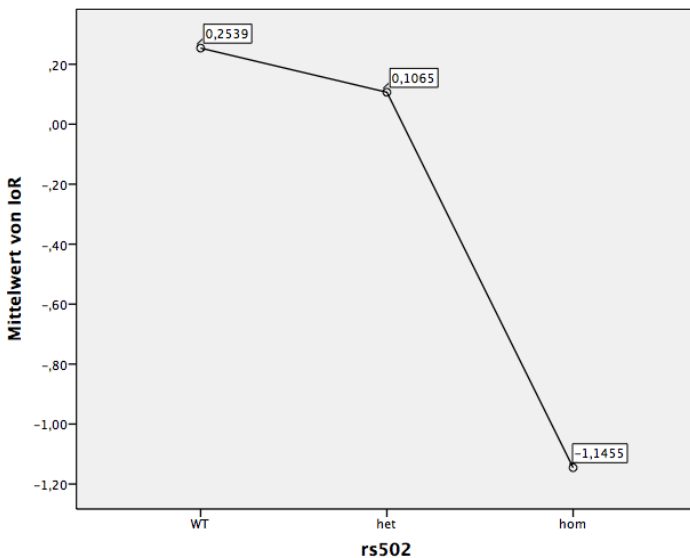


Abb. 37: CDK4 Gen rs2069502 Vergleich der Mittelwerte des loR

WT = homozygoter Wildtyp, het = heterozygote Mutante, hom = homozygote Mutante

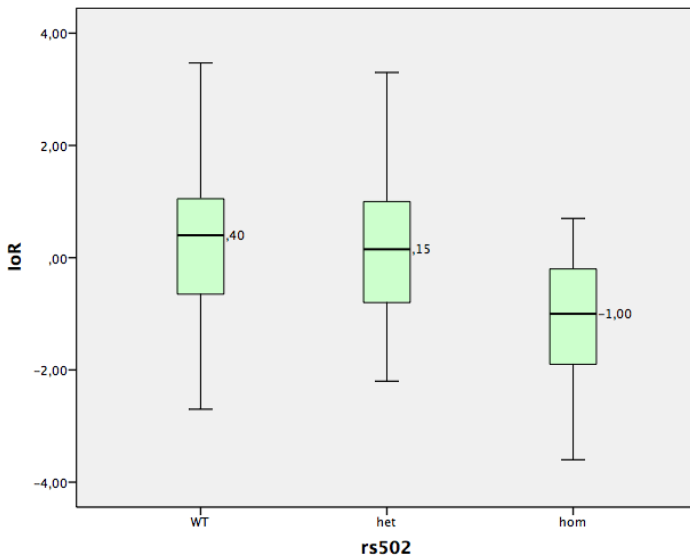


Abb. 38: CDK4 Gen rs2069502 Boxplots mit Median und 25. bzw. 75. Perzentile des IoR
 WT = homozygoter Wildtyp, het = heterozygote Mutante, hom = homozygote Mutante

	n	M	SD	SE	95 % KI für M		Min	Max
					Untergrenze	Obergrenze		
het	46	0,1065	1,3482	0,1988	-0,2938	0,5069	-2,20	3,30
hom	11	-1,1455	1,4109	0,4254	-2,0933	-0,1976	-3,60	0,70
WT	44	0,2539	1,3770	0,2076	-0,1648	0,6725	-2,70	3,47
Gesamt	101	0,0344	1,4174	0,1410	-0,2455	0,3142	-3,60	3,47

Tab. 28: CDK4 Gen rs2069502 Deskriptive Statistik des IoR
 WT = homozygoter Wildtyp, het = heterozygote Mutante, hom = homozygote Mutante

In der einfaktoriellen ANOVA wird ein p-Wert von = 0,011 (s. Tab. 29) errechnet. Im Post-Hoc-Test kann darauffolgend für homozygote Wildtypen (GG) und homozygote Mutanten (AA) ein p-Wert von 0,009 (s. Tab. 31) ermittelt werden.

	QS	df	QMW	F	Sig.
Zwischen den Gruppen	17,671	2	8,836	4,726	0,011
Innerhalb der Gruppen	183,231	98	1,870		
Gesamtsumme	200,902	100			

Tab. 29: CDK4 Gen rs2069502 Einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Mittelwerte des IoR

Levene	df1	df2	Sig.
0,047	2	98	0,954

Tab. 30: CDK4 Gen rs2069502 Levene-Test zur Überprüfung der Homogenität der Varianzen
 $p > 0,05$ spricht für Varianzgleichheit; $p < 0,05$ spricht für Varianzungleichheit

(I) rs502	(J) rs502	MD (I-J)	SE	Sig.	95 % KI	
					Untergrenze	Obergrenze
het	hom	1,2520	0,4589	0,020	0,1598	2,3442
	WT	-0,1473	0,2883	0,866	-0,8335	0,5389
hom	het	-1,2520	0,4589	0,020	-2,3442	-0,1598
	WT	-1,3993	0,4609	0,009	-2,4963	-0,3024
WT	het	0,1473	0,2883	0,866	-0,5389	0,8335
	hom	1,3993	0,4609	0,009	0,3024	2,4963

Tab. 31: CDK4 Gen rs2069502 PostHoc-Test zum Mehrfachgruppenvergleich

hier: Tukey, weil Varianzgleichheit angenommen wird

Anlässlich dieser Ergebnisse wird ein t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt, der ausschließlich homozygote Wildtypen (GG) und homozygote Mutanten (AA) (s. Tab. 32) miteinander vergleicht. Bei Annahme von Varianzgleichheit (p -Wert im Levene-Test $> 0,05$ s. Tab. 33) liegt der p -Wert bei 0,004 (s. Tab. 33). Auch hier kann deshalb von hoher Signifikanz gesprochen werden.

	n	M	SD	SE
hom	11	-1,1455	1,4109	0,4254
WT	44	0,2539	1,3770	0,2076

Tab. 32: CDK4 Gen rs2069502 Deskriptive Statistik des IoR

WT = homozygoter Wildtyp, hom = homozygote Mutante

	Levene-Test		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-seitig)	MD	SE Diff.	95% KI der Differenz	
								Unterer	Oberer
Varianzgleichheit	0,060	0,807	-3,000	53	0,004	-1,3993	0,4664	-2,3347	-0,4639
Varianzungleichheit			-2,956	15,130	0,010	-1,3993	0,4734	-2,4075	-0,3911

Tab. 33: CDK4 Gen rs2069502 Levene-Test und t-Test für unabhängige Stichproben zum Vergleich der Mittelwerte des IoR zwischen homozygoter Mutanten und homozygoten Wildtypen

Im Post-Hoc-Test (s. Tab. 31) fällt außerdem auf, dass auch ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den heterozygoten Mutanten (AG) und den homozygoten Mutanten (AA) (s. Tab. 34) besteht. Hinweisgebend hierfür ist bereits das Mittelwertdiagramm und die Boxplots (s. Abb. 37 und 38). Im t-Test für unabhängige Stichproben zum Vergleich der heterozygoten (AG) und homozygoten (AA) Mutanten ergibt sich ein p-Wert von 0,008 (Annahme von Varianzgleichheit mit p-Wert im Levene-Test von > 0,05) (s. Tab. 35).

	n	M	SD	SE
hom	11	-1,1455	1,4109	0,4254
het	46	0,1065	1,3482	0,1988

Tab. 34: CDK4 Gen rs2069502 Deskriptive Statistik des loR

hom = homozygote Mutante, het = heterozygote Mutante

	Levene-Test		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-seitig)	MD	SE Diff.	95% KI der Differenz	
								Unterer	Oberer
Varianzgleichheit	0,012	0,912	-2,743	55	0,008	-1,2520	0,4564	-2,1666	-0,3374
Varianzungleichheit			-2,666	14,688	0,018	-1,2520	0,4696	-2,2547	-0,2493

Tab. 35: CDK4 Gen rs2069502 Levene-Test und t-Test für unabhängige Stichproben zum Vergleich der Mittelwerte des loR zwischen homozygoten und heterozygoten Mutanten

4.1.3 Einfluss von weiteren 11 SNPs auf die Ansprechrate einer rhGH Therapie

Bei Anwendung einer einfaktoriellen ANOVA zum Vergleich der loR-Mittelwerte der drei Gruppen homozygote Wildtypen (WT), heterozygote Mutanten (het) und homozygote Mutanten (hom) erhält man bei 9 weiteren untersuchten SNPs jeweils einen p-Wert > 0,05 (s. Tab. 36). Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen im Ansprechen auf eine rhGH- Therapie.

Nr.	SNP	n (WT)	n (het)	n (hom)	p-Wert
1	rs300919	28	50	23	0,271
2	rs3845395	43	48	10	0,493
3	rs3110697	14	46	41	0,503
4	rs933360	10	29	62	0,320
5	rs2854744	26	47	28	0,278
6	rs2267723	28	53	20	0,917
7	rs10735570	13	40	48	0,178
8	rs2347867	14	46	41	0,690
9	rs2270777	40	40	21	0,859

Tab. 36: Verteilung der Genotypen und p-Werte der einfaktoriellen ANOVA für neun weitere SNPs
n = Anzahl der Patienten mit dem jeweiligen Genotyp; WT = homozygoter Wildtyp; het = heterozygote Mutante; hom = homozygote Mutante

Bei den zwei verbleibenden SNPs rs2871865 und rs572169 ist die Anzahl der homozygoten Mutanten jeweils kleiner 6, weshalb hier keine einfaktorielle ANOVA angewendet kann (s. Tab. 37).

Nr.	SNP	n (WT)	n (het)	n (hom)
10	rs2871865	77	23	1
11	rs572169	58	39	4

Tab. 37: Verteilung der Genotypen für die SNPs rs2871865 und rs572169
n = Anzahl der Patienten mit dem jeweiligen Genotyp; WT = homozygoter Wildtyp; het = heterozygote Mutante; hom = homozygote Mutante

Für den SNP rs2871865 kann kein anderer Test angewendet werden, da es im gesamten Patientenkollektiv nur eine einzige homozygote Mutante gibt und somit kein Mittelwert errechnet werden kann. Es kann hier lediglich beschrieben werden, dass die

Mittelwerte (s. Abb. 39) des IoR in den Gruppen der homozygoten Wildtypen und heterozygoten Mutanten deutlich über dem IoR Wert des Patienten mit homozygoter Mutante liegen.

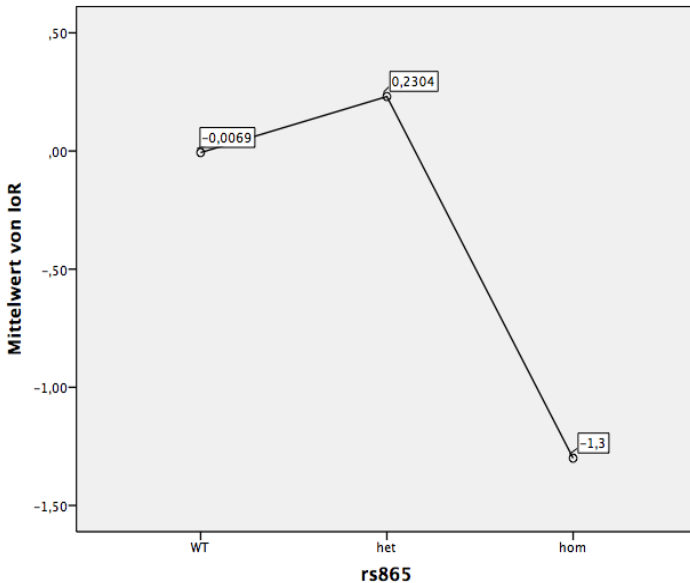


Abb. 39: IGF1R Gen rs2871865 Vergleich der Mittelwerte des IoR

WT = homozygoter Wildtyp, het = heterozygote Mutante, hom = homozygote Mutante

Für den SNP rs572169 kann anstelle der einfaktoriellen ANOVA ein t-Test für unabhängige Stichproben verwendet werden, wobei hier nach dem rezessiven Modell homozygote Wildtypen und heterozygote Mutanten zusammengefasst werden. Der t-Test vergleicht hierbei den Mittelwert des IoR dieser Gruppe mit dem Mittelwert des IoR der homozygoten Mutanten. Die Veranlassung homozygote Wildtypen und heterozygote Mutanten in eine Gruppe zusammen zu fassen und nicht etwa homozygote und heterozygote Mutanten, liegt erneut im Diagramm der Mittelwerte begründet (s. Abb. 40). Dabei ist zu sehen das die Mittelwerte des IoR der Gruppen homozygote Wildtypen und heterozygote Mutanten nahe beieinander liegen im Gegensatz zum Mittelwert des IoR der homozygoten Mutanten der deutlich geringer ausfällt.

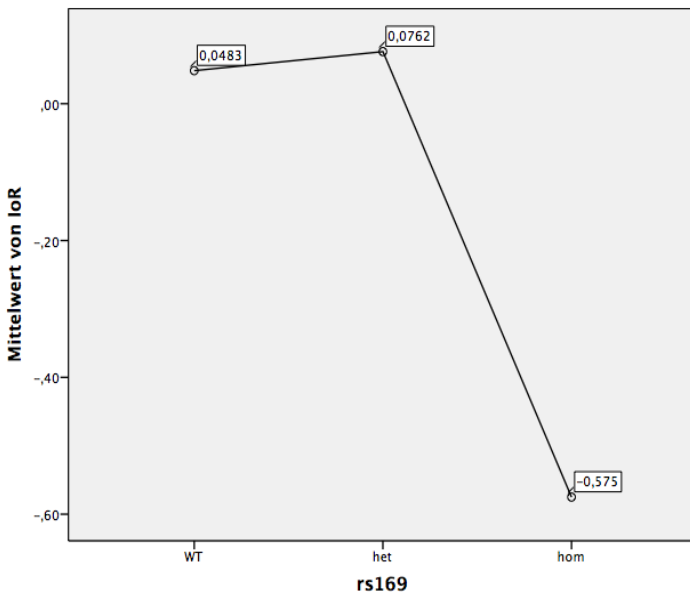


Abb. 40: GHSR Gen rs572169 Vergleich der Mittelwerte des IoR

WT = homozygoter Wildtyp, het = heterozygote Mutante, hom = homozygote Mutante

Unter Annahme der Varianzgleichheit (Levene-Test > 0,05) zeigt sich im t-Test für unabhängige Stichproben (s. Tab. 38 und 39) kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (p-Wert = 0,383).

	n	M	SD	SE
hom	4	-0,5750	1,62558	0,81279
WT+het	97	0,0595	1,41210	0,14338

Tab. 38: GHSR Gen rs5721 Deskriptive Statistik des IoR

WT = homozygoter Wildtyp, het = heterozygote Mutante, hom = homozygote Mutante

	Levene-Test		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-seitig)	MD	SE Diff.	95% KI der Differenz	
								Unterer	Oberer
Varianzgleichheit	0,371	0,544	-0,876	99	0,383	-0,6345	0,7240	-2,071	0,8021
Varianzungleichheit			-0,796	3,190	0,495	-0,6345	0,8253	-3,175	-1,9060

Tab. 39: GHSR Gen rs572169 Levene-Test und t-Test für unabhängige Stichproben zum Vergleich der Mittelwerte des IoR zwischen homozygoten Mutanten mit homozygoten Wildtypen und heterozygoten Mutanten

4.2 GHR Exon 3 Deletion - Projekt

Es wurden 81 präpubertäre Patienten mit GHD untersucht, die in der kinderendokrinologischen Sprechstunde der Universitätsklinik Homburg behandelt werden. Ausgeschlossen wurden Patienten mit GHD nach onkologischen Grunderkrankungen (s. 3.1.5.).

Die Abbildungen 41 und 42 lassen vermuten, dass die Ansprechraten der homozygoten Wildtypen (fl = full-length receptor, Vollängenrezeptor) bzw. heterozygoten Mutanten (d3/fl) und der homozygoten Mutanten (d3 = homozygote Deletion von Exon 3 des GHR) des Patientenkollektivs auf eine rhGH-Therapie divergieren. Auch die 95%-Konfidenzintervalle der Mittelwerte (s. Tab. 40) könnten auf eine statistische Signifikanz hindeuten.

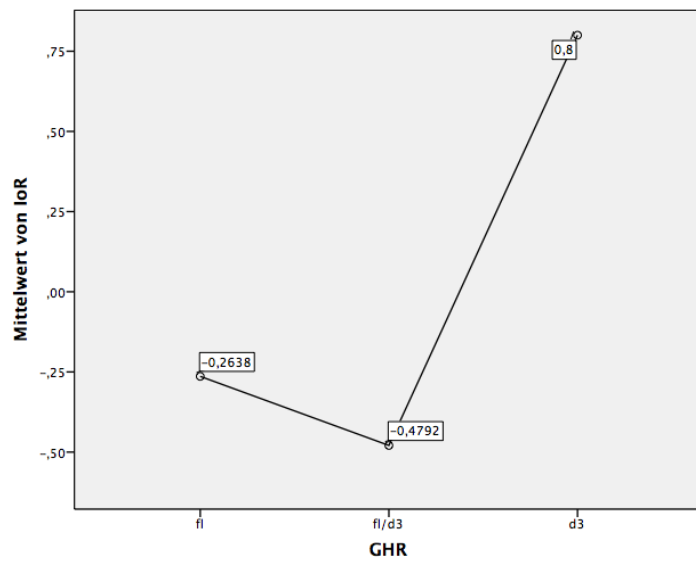


Abb. 41: GHR Exon 3 Deletion Vergleich der Mittelwerte des IoR

fl = homozygoter Wildtyp (Volllängenrezeptor), d3/fl = heterozygote Mutante, d3 = homozygote Mutante (Deletion)

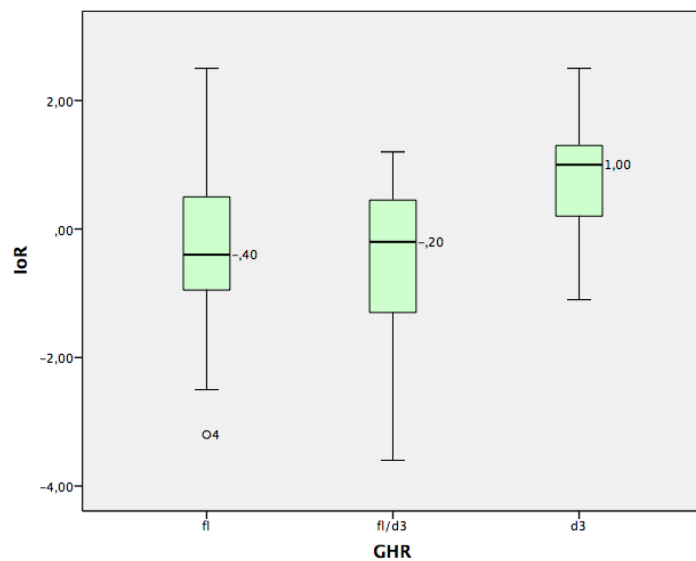


Abb. 42: GHR Exon 3 Deletion Boxplots mit Median und 25. bzw. 75. Perzentile des IoR

fl = homozygoter Wildtyp (Volllängenrezeptor), d3/fl = heterozygote Mutante, d3 = homozygote Mutante (Deletion)

	n	M	SD	SE	95 % KI für M		Min	Max
					Untergrenze	Obergrenze		
d3/fl	24	-0,4792	1,2108	0,2472	-0,9904	0,0321	-3,60	1,20
d3	10	0,8000	0,9798	0,3098	0,0991	1,5009	-1,10	2,50
fl	47	-0,2638	1,2787	0,1865	-0,6393	0,1116	-3,20	2,50
Gesamt	81	-0,1963	1,2729	0,1414	-0,4778	0,0852	-3,60	2,50

Tab. 40: GHR Exon 3 Deletion Deskriptive Statistik des IoR

fl = homozygoter Wildtyp,(Volllängenrezeptor), d3/fl = heterozygote Mutante, d3 = homozygote Mutante (Deletion)

Bei Anwendung einer einfaktoriellen ANOVA zum Vergleich der IoR-Mittelwerte der drei Gruppen homozygote Wildtypen (fl), heterozygote Mutante (d3/fl), homozygote Mutante (d3) erhält man einen p-Wert von 0,022 (s. Tab. 41) bei Annahme von Varianzhomogenität (p-Wert des Levene-Test > 0,05, s. Tab 42). Auffällig im Post-Hoc-Test ist hierbei der Vergleich von homozygoten Wildtypen (fl) und homozygoten Mutanten (d3) (p = 0,039) bzw. von heterozygoten Mutanten (d3/fl) und homozygoten Mutanten (d3) (p = 0,019) (s. Tab 43).

	QS	df	QMW	F	Sig.
Zwischen den Gruppen	12,061	2	6,030	4,001	0,022
Innerhalb der Gruppen	117,568	78	1,507		
Gesamt	129,629	80			

Tab. 41: GHR Exon 3 Deletion Einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Mittelwerte des IoR

Levene	df1	df2	Sig.
0,623	2	78	0,539

Tab. 42: GHR Exon 3 Deletion Levene-Test zur Überprüfung der Homogenität der Varianzen

p > 0,05 spricht für Varianzgleichheit; p < 0,05 spricht für Varianzungleichheit

(I) GHR	(J) GHR	MD (I-J)	SE	Sig.	95 % KI	
					Untergrenze	Obergrenze
d3/fl	d3	-1,2792	0,4621	0,019	-2,3832	-0,1751
	fl	-0,2153	0,3080	0,765	-0,9513	0,5206
d3	d3/fl	1,2792	0,4621	0,019	0,1751	2,3832
	fl	1,0638	0,4276	0,039	0,0423	2,0854
fl	d3/fl	0,2153	0,3080	0,765	-0,5206	0,9513
	d3	-1,0638	0,4276	0,039	-2,0854	-0,0423

Tab. 43: GHR Exon 3 Deletion PostHoc-Test zum Mehrfachgruppenvergleich

hier: Tukey weil Varianzgleichheit angenommen wird; fl = homozygoter Wildtyp (Vollängenrezeptor), d3/fl = heterozygote Mutante, d3 = homozygote Mutante (Deletion)

Vergleicht man ausschließlich die homozygoten Wildtypen (fl) mit den homozygoten Mutanten (d3) mit Hilfe eines t-Tests für unabhängige Stichproben erhält man bei Annahme von Varianzhomogenität (Levene > 0,05 s. Tab. 44) einen p-Wert von 0,016 (s. Tab. 44 und 45).

	n	M	SD	SE
d3	10	0,8000	0,9798	0,3098
fl	47	-0,2638	1,2787	0,1865

Tab. 44: GHR Exon 3 Deletion Deskriptive Statistik des IoR

fl = homozygoter Wildtyp (Vollängenrezeptor), d3 = homozygote Mutante (Deletion)

	Levene-Test		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-seitig)	MD	SE Diff.	95% KI der Differenz	
								Unterer	Oberer
Varianzgleichheit	1,225	0,273	2,474	55	0,016	1,0638	0,4300	0,2021	1,9255
Varianzungleichheit			2,942	16,286	0,009	1,0638	0,3616	0,2983	1,8294

Tab. 45: GHR Exon 3 Deletion Levene-Test und t-Test für unabhängige Stichproben zum Vergleich der Mittelwerte des IoR zwischen homozygoter Mutanten (d3) und homozygoten Wildtypen (fl)

Bei Anwendung eines t-Test für unabhängige Stichproben zum Vergleich der homozygoten (d3) und der heterozygoten Mutanten (d3/fl) ergibt sich bei Annahme von Varianzhomogenität ein p-Wert von 0,006 (s. Tab. 46 und 47).

	n	M	SD	SE
d3/fl	24	-0,4792	1,2108	0,2472
d3	10	0,8000	0,9798	0,3098

Tab. 46: GHR Exon 3 Deletion Deskriptive Statistik des IoR
d3/fl = Heterozygote Mutante; d3 = Homozygote Mutante (Deletion)

	Levene-Test		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-seitig)	MD	SE Diff.	95% KI der Differenz	
								Unterer	Oberer
Varianzgleichheit	0,660	0,423	-2,954	32	0,006	-1,2792	0,4331	-2,1613	-0,3971
Varianzungleichheit			-3,227	20,802	0,004	-1,2792	0,3963	-2,1039	-0,4545

Tab. 47: GHR Exon 3 Deletion Levene-Test und t-Test für unabhängige Stichproben zum Vergleich der Mittelwerte des loR zwischen homozygoter (d3) und heterozygoter Mutante (d3/fl)

Patienten mit GHD, die homozygot für die Deletion im Exon 3 des GH Rezeptors sind, zeigen signifikant höhere loR-Werte als Patienten mit dem Volllängenrezeptor oder einer heterozygoten Deletion.

5 DISKUSSION

5.1 Index of Responsiveness

Kinder mit einem Wachstumshormonmangel und entsprechender Wachstumshormontherapie stellen eine heterogene Gruppe bezüglich des Schweregrades des Hormonmangels, des Alters, des Geschlechts, des Pubertätsstadiums da. Derzeitig ist die Dosierung der rhGH-Therapie hauptsächlich von der Ursache des Kleinwuchses, dem Gewicht und der Größe des Patienten abhängig. Überwacht wird der Therapieverlauf mit Hilfe von Parametern wie der Standardabweichung der Änderung der Körpergröße im ersten Therapiejahr (Δ Ht-SDS) und der Wachstumsgeschwindigkeit im ersten Therapiejahr (HV), die nur begrenzt aussagekräftig sind (115, 117).

Tatsache ist jedoch, dass trotz Einhaltung der Therapierichtlinien, eine hohe Variabilität im individuellen Ansprechverhalten vorliegt (6). Ein neuer Ansatz zur Strukturierung der rhGH-Therapie ist die Anwendung sogenannter „Vorhersagemodelle“ (englisch: prediction models). „Vorhersagemodelle“ sind - mit Hilfe von multiplen linearen Regressionsanalysen - entwickelte mathematische Algorithmen, die basierend auf verschiedenen Wirkungsvariablen (z.B. Größe und Gewicht bei Geburt, Größe der Eltern, Alter) ein bestimmtes Wachstumsverhalten vorhersagen. Grundlage ist die Erhebung der Daten einer großen, homogenen, klar definierten Gruppe. Im Anschluss an die Entwicklung einer solchen Formel gilt es, das Modell an anderen Gruppen mit ähnlichen Voraussetzungen zu validieren (149).

Ranke et al. entwickelten 1999 zwei Algorithmen zur Berechnung der zu erwartenden Wachstumsgeschwindigkeit („predicted height velocity“ PHV) im ersten Therapiejahr für präpubertale Kinder mit GHD (113). Die untersuchten Wirkungsvariablen sind in Tabelle 48 aufgelistet.

Geburtsdaten	Patientendaten_0	Genetik	Therapiedaten
– Geburtshergang	– Hypophysenfunktion	– Größe-SDS_Mutter	– Frequenz GH-Injektionen
– Ponderal-Index	– Knochenalter	– Größe-SDS_Vater	– Anzahl der Therapiejahre
– APGAR-Score	– Gewicht-SDS	– MPH-Score	– rhGH-Dosierung
– Gewicht-SDS	– Größe-SDS	– Ethnie	
– Größe-SDS	– GHmax		
– Geschlecht	– Alter		

Tab. 48: Auflistung der von Ranke et al. untersuchten Wirkungsvariablen (113)

Patientendaten_0 = Patientendaten zu Beginn der Therapie

In einem der beiden Algorithmen wird die maximal erreichte GH-Konzentration der Stimulationstests eingeschlossen ($r^2 = 61\%$, Error SD = 1,46 cm) und im anderen nicht ($r^2 = 45\%$, Error SD = 1,72 cm). In den Regressionsanalysen zeigte sich die maximal erreichte GH-Konzentration der Stimulationstests als stärkste Wirkungsvariable. Der Grund weshalb trotzdem ein Algorithmus ohne GH_{max} entwickelt wurde, liegt an der Uneinheitlichkeit der Durchführung der Tests und der Probenentnahme zwischen den untersuchenden Kliniken. Da in dieser Arbeit bei allen Probanden die GH_{max} -Konzentration unter den gleichen Bedingungen bestimmt wurde, ist eine Einbeziehung der Variable „ GH_{max} -Konzentration“ möglich. Die Formel zur Berechnung der „predicted height velocity“ (PHV) ist in Abbildung 43 aufgeführt.

$$\begin{aligned}
 \text{PHV} = & 14,55 + (-1,37 * \text{GH}_{\text{max}}) \\
 & + (-0,32 * \text{age at GH onset}) \\
 & + (0,32 * \text{GG-SDS}) \\
 & + (1,62 * \text{GH dose}) \\
 & + (-0,4 * (\text{Ht-SDS} - \text{MPH})) \\
 & + (0,29 * \text{G-SDS})
 \end{aligned}$$

Abb. 43: Formel zur Berechnung der PHV

PHV = predicted height velocity (erwartete Wachstumsgeschwindigkeit im ersten Therapiejahr); GH_{max} = maximaler Anstieg der Wachstumshormonkonzentration in Wachstumshormonstimulationstests (In; $\mu\text{g/l}$); age at GH onset = Alter zu Beginn der rhGH-Therapie (Jahren); GG-SDS = SD-Score des Geburtsgewichts (SD Score); GH dose = rhGH-Dosierung (In; IU/kg*week); Ht-SDS = SD-Score der Körpergröße zu Beginn der rhGH-Therapie; MPH = (SD-Score der Körpergröße des Vaters + SD-Score der Körpergröße der Mutter) / 1,61; G-SDS = SD-Score des Gewichts zu Beginn der rhGH-Therapie (113)

Im Anschluss an die Berechnung der zu erwartenden Wachstumsgeschwindigkeit (PHV) im ersten Therapiejahr kann der sogenannte Index of Responsiveness (IoR) hinzu gezogen werden, um diese mit der beobachteten Wachstumsgeschwindigkeit zu vergleichen. Die Formel zur Berechnung des IoR kann der Abbildung 44 entnommen werden.

Fällt die beobachtete Wachstumsgeschwindigkeit höher oder niedriger aus als der vorhergesagte Durchschnitt der Referenzgruppe, wird der Patient als mehr oder weniger ansprechbar auf rhGH gewertet (s. 3.2.6) (70).

$$\text{IoR} = \frac{\text{OHV} - \text{PHV}}{\text{SD von PHV}}$$

Abb. 44: Formel zur Berechnung des IoR (70)

IoR = Index of Responsiveness; PHV = erwartete Wachstumsgeschwindigkeit („predicted height velocity“); OHV = beobachtete Wachstumsgeschwindigkeit („observed height velocity“)

Die Vorteile die durch die Anwendung solcher Algorithmen entstehen, sind vielseitig. Sie ermöglichen die Vermittlung einer realistischen Einschätzung der Therapieresultate für

den Patienten und dessen Eltern zur Verbesserung der Compliance. Außerdem verhelfen sie zur Erkennung der Notwendigkeit weiterer Diagnostik bei starker Diskrepanz von erwartetem und beobachtetem Wachstum (z.B. bei zusätzlichen bisher nicht-diagnostizierten Hormonstörungen). Vor allem aber ist eine Vermeidung von übermäßiger, unzureichender oder ineffektiver Therapie möglich, um potentielle Nebenwirkungen der rhGH-Therapie zu minimieren und kosteneffizientes Arbeiten zu ermöglichen (115). Zum Beispiel wäre eine Reduzierung der rhGH-Dosis bei hohen Δ Ht-SDS und einem IoR > 1,3 vertretbar, weil unter der niedrigeren Dosierung die Therapieresultate gleich blieben und das Risiko von möglichen Nebenwirkungen reduziert würde (116).

In der Zukunft sollte das Ziel sein, diese Vorhersagemodelle zu verbessern bzw. zu erweitern, indem mehr Wirkungsvariablen - wie z.B. molekulargenetische Informationen und biochemische Parameter – vereinigt werden, um eine Variabilität in der Ansprechbarkeit noch genauer und gezielter bestimmen zu können.

5.2 SNP - Projekt

Die bisher entwickelten „Vorhersagemodelle“ - die ausschließlich auxologische Parameter mit einbeziehen - sind lediglich in der Lage rund 60% der Variabilität im Ansprechverhalten auf die rhGH-Therapie zu erklären. Das menschliche Wachstum wird über zahlreiche Stoffwechselwege reguliert. Hierzu zählen z.B. Hormone, Wachstumsfaktoren und die Appetitregulation (82, 84), deren Funktion unter anderem durch Polymorphismen modifiziert werden können. Das wiederum lässt die Schlussfolgerung zu, dass diese Polymorphismen auch auf eine Therapie mit rekombinantem Wachstumshormon Einfluss haben könnten.

In dieser Arbeit wurden 13 SNPs lokalisiert in 11 Kandidatengen, die in Beziehung zur 1) Wachstumshormonachse, zur 2) Wachstumsfuge, und zum 3) Zellzyklus stehen, auf ihre potentielle Beeinflussung der Therapie mit rekombinantem Wachstumshormon untersucht.

5.2.1 Wachstumshormonachse

2013 publizierten Clayton et al. eine umfassende Untersuchung der Assoziation bestimmter Genotypen verschiedener SNPs in 103 an Wachstum und Metabolismus beteiligten Genen mit der Reaktion auf eine rhGH-Therapie (24). Für insgesamt zehn in sieben verschiedenen Genen befindlichen Polymorphismen konnte bei Kindern mit GHD ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich des Ansprechverhaltens auf eine rhGH-Therapie erkannt werden. Hierunter befindet sich auch ein im SOS1 Gen lokalosierter SNP (rs2888586, $p = 0,0095$), der ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit war. Die einfaktorielle ANOVA wies eine statistische Signifikanz auf und so konnte die aufgestellte Hypothese - rs2888586 habe Einfluss auf den Erfolg einer rhGH-Therapie - von Clayton et al. unterstützt werden. Kinder, die unter einem Wachstumshormonmangel leiden und homozygot für das Allel A (AA) sind, erreichen höhere IoR-Werte und sprechen signifikant besser auf rhGH an als Kinder die homozygot für das Allel G (GG) sind. Kinder die sowohl das G als auch das A Allel besitzen (AG) weisen IoR-Werte auf die zwischen den IoR-Werten der Kinder mit homozygoten Allelen (AA und GG) liegen.

„Son of sevenless homolog 1“ (SOS1) ist ein zentraler Bestandteil des intrazellulären Ras-MAPK-Signaltransduktionsweges (Rat Sarcoma- Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen) der z.B. durch Wachstumsfaktoren wie IGF1 ausgelöst werden kann (s. Abb. 45). Durch Bindung der Wachstumsfaktoren an eine Rezeptor-Tyrosinkinase wird eine Dimerisierung ausgelöst, die zur Autophosphorylierung des Rezeptors führt. Die Autophosphorylierung verlagert den Grb2-SOS1-Komplex (Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2) in die Nähe der Zellmembran und somit auch in direkte

Nachbarschaft zu Ras. Als Guanin-Nukleotid-Austauscher fungierend ist es SOS1 möglich Ras zu aktivieren und den Start der MAPK-Kaskade zu initiieren. Bekannt ist SOS1 vor allem deshalb, weil es das am zweithäufigsten betroffene Gen bei Patienten mit Noonan-Syndrom ist (163). Das Noonan-Syndrom ist eine der weit verbreitetsten monogenetischen Erkrankungen und geht u.a. mit typischen fazialen Anomalien, angeborenen Herzfehler und Kleinwuchs einher (164).

Im Unterschied zu dieser Arbeit setzten Clayton et al. als Parameter für das Ansprechverhalten auf die rhGH-Therapie die Änderung der Körpergröße im ersten Therapiejahr in cm ein. Jedoch blieben nicht alle Kinder im ersten Behandlungsjahr präpubertal was in Folge des Wachstumsschubs zu einer starken Beeinflussung dieses Parameters führt. Zudem erhielten die Kinder durchschnittlich weitaus höhere rhGH-Dosen (Mittelwert = 34,2 µg/kgKG/Tag) als die an der Uniklinik Homburg behandelten Kinder (Mittelwert = 23 µg/kgKG/Tag), wobei bekannt ist dass höhere rhGH Dosen zu einer stärkeren Antwort im Wachstum führen (123). Hinzu kommt, dass das Patientenkollektiv von Clayton et al. einen 2,1 ng/ml geringeren mittleren Höchstwert bei den Wachstumshormonstimulationstests aufweist. Lediglich 7,3% der Kinder wiesen einen $\text{GH}_{\text{max}} \geq 7$ ng/ml auf, im Gegensatz zu der Kohorte dieser Arbeit mit einem prozentualen Anteil von 34,7%. Je geringer die Wachstumshormonausschüttung in den Wachstumshormonstimulationstestungen ausfällt, desto besser das Ansprechen auf rhGH (6).

Aufgrund der altersabhängigen Genexpression wurden die Ansprechraten auf rhGH in drei verschiedenen Altersgruppen untersucht (< 8, 8-12 und > 12 Jahre) (139). In der vorliegenden Arbeit konnte diese Differenzierung aufgrund der kleineren Kohorte nicht vorgenommen werden, was aber als sinnvoll zu betrachten wäre, wenn eine größere Fallzahl vorliegen würde.

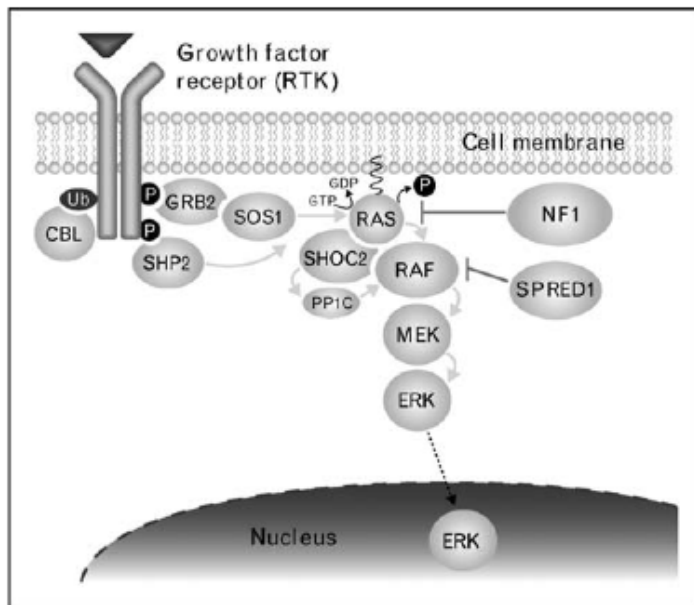


Abb. 45: SOS1 abhängige Aktivierung von RAS (165)

Initiiert wird die SOS1 abhängige Aktivierung von Ras, wie bereits angedeutet, durch die Bindung von z.B. IGF1 an den IGF1-Rezeptor (IGF1R). Der IGF1R liegt transmembranös vor und gehört zur Klasse der Tyrosinkinase-Rezeptoren, deren intrazelluläre Domäne die Tyrosinkinase trägt (8). Mutationen im IGF1R führen zur IGF1-Resistenz und damit zur schweren intrauterinen sowie postnatalen Wachstumsretardierung (63). Lui et al. suchten 2012 in einer Genom-weiten-Assoziationsstudie nach Genen, welche die Funktion der Wachstumsfuge und somit das Größenwachstum beeinflussen (92). Desweiteren stellten sie die Vermutung auf, dass SNPs, welche Einfluss auf Expression und Funktion eben dieser Gene nehmen, ebenfalls - wenn auch im sehr geringem Maße - zur Phänotyp-Bildung beitragen. Einer der hierbei untersuchten SNPs war der im IGF1R befindliche rs2871865 als C/G-Austausch. Ein signifikanter Unterschied im Ansprechen auf die rhGH-Therapie zwischen den einzelnen Genotypen CC/GC/GG dieses SNP konnte in dieser Arbeit jedoch nicht vermerkt werden.

Ein weiteres an der intrazellulären Ras-Raf-Signaltransduktionskaskade (Raf: Rat fibrosarcoma) beteiligtes Protein ist Grb2-associated binding protein (GAB1). GAB1 ist ein Insulin-Rezeptor-Substrat, wird durch die Tyrosinkinase aktiviert und kann das

Growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) mit dessen C-terminaler SH3-Domäne binden. Somit wird Grb2 und das daran gebundene SOS1 in unmittelbare Nähe von Ras gebracht und der Ras-MAPK-Signaltransduktionsweg eingeleitet (141). SNP rs300919, ein im GAB1-Gen lokalisierter C/T-Austausch, steht jedoch nicht in Verbindung mit einer signifikanten Abweichung der IoR-Werte zwischen den einzelnen Genotypen bzw. der Ansprechbarkeit auf rhGH in der vorliegenden Arbeit.

Drei weitere von Clayton et al. untersuchten SNPs waren ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit (rs3845395, rs933360, rs3110697).

rs3845395 ist ein C/G-Austausch und liegt im LHX4-Gen (LIM homeobox 4) lokalisiert. LHX4 kodiert für ein Mitglied einer großen Proteinfamilie, die durch die sogenannte LIM Domäne charakterisiert ist, einer Cystein-reichen Zink-Bindungsdomäne. Dieses Protein ist involviert in die Regulation der Entwicklung und Differenzierung der Hypophyse auf Transkriptionsebene (153). Clayton et al. konnten einen Zusammenhang zwischen der Variabilität im Ansprechverhalten auf rhGH und dem im LHX4 Gen befindlichen Polymorphismus bei Mädchen mit Ullrich-Turner-Syndrom erkennen ($p = 0,002$). Für Kinder mit GHD konnte dieser Zusammenhang nicht bewiesen werden ($p > 0,5$) (24), was mit der Datenlage dieser Arbeit in Einklang steht. Dies ist pathophysiologisch auch deshalb nachvollziehbar, da LHX4 in der Entwicklung der Hypophyse beteiligt ist und damit keinen Einfluß auf das Ansprechen des Körpers auf Wachstumshormon hat.

rs933360 ist ein A/G-Austausch im Grb10 (growth factor receptor-bound protein 10) Gen. Das durch das Grb10 Gen kodierte Protein ist ein Adapterprotein ohne katalytische Funktion, aber mit der Möglichkeit zahlreiche andere Proteine binden und so eine Interaktion zwischen diesen Proteinen vermitteln zu können. Grb10 lagert sich an aktivierte Tyrosinkinase-Rezeptoren wie z.B. den Insulin-Rezeptor und den IGF1-Rezeptor an (85, 90) und agiert als Wachstumsinhibitor. Charalambous et al. fanden 2003 heraus, dass das maternal vererbte Allel eine stärkere Expression von Grb10 verursacht und deshalb Defekte des maternalen Allels zu verstärktem Wachstum von

Embryo und Plazenten in mutierten Mäusen führen (23). Außerdem liegt bei circa 10% aller Fälle von Silver-Russel-Syndrom – eine Wachstumsstörung mit prä- und postnatalem Kleinwuchs und typischen morphologischen Auffälligkeiten wie einer dreieckigen Gesichtsform - ein maternales Imprinting des Grb10-Gens als Ursache vor (60). Der in dieser Arbeit untersuchte SNP im Grb10 Gen nimmt jedoch keinen Einfluss auf die Ansprechbarkeit hinsichtlich einer rhGH-Therapie, im Gegensatz zu den Ergebnissen von Clayton et al. ($p = 0,002$).

rs3110697 ist ein C/T-Austausch und befindet sich im IGFBP3-Gen. IGFBP3 ist das Bindungsprotein von IGF1 und IGF2 und verlängert deren Halbwertszeiten im Blut (100). Zudem scheint IGF1 im Komplex mit IGFBP3 eine potentere Wirkungsweise zu besitzen (13). Zum Beispiel vermindert IGFBP3 die IGF1-vermittelte Herabregulation des IGF1-Rezeptors (27) und potenziert den Effekt des durch IGF induzierten Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signaltransduktionswegs (28). Harrela et al. fanden 1996 in Zwillingsstudien heraus, dass circa 50% der interindividuellen Unterschiede in der Konzentration von zirkulierendem IGFBP3 genetisch determiniert sind (55). Das Interesse an der Ursache der Variabilität der IGFBP3- und der IGF1-Level liegt darin begründet, dass zahlreiche Veröffentlichungen eine positive Korrelation zwischen IGF1-Level im Blut und dem Risiko einer Malignomerkrankung aufzeigen und hohe IGFBP3-Konzentrationen im Verdacht stehen, dieses Risiko mildern zu können (93, 162). Einige im IGFBP3-Gen lokalisierte SNPs stehen erwiesenermaßen in direktem Zusammenhang mit der IGFBP3-Konzentration, wie z.B. auch der SNP rs3110697 (33). Eine rhGH-Therapie könnte von höheren IGFBP3-Konzentrationen profitieren, da wie bereits erwähnt die Wirkung von IGF1 – mit dessen Hilfe GH hauptsächlich das Wachstum beeinflusst – verstärkt wird. Für den SNP rs3110697 konnte in Beziehung auf die Ansprechbarkeit der rhGH-Therapie keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden, obwohl dieser SNP Einfluss auf den IGFBP3-Level besitzt (33).

Für einen anderen SNP im IGFBP3-Gen, genauer gesagt im Promotor des IGFBP3-Gen, (rs2854744) liegen bereits Daten vor, dass Patienten, die homozygot für das A Allel sind, höhere IGFBP3-SDS-Werte (39) und höhere Wachstumsgeschwindigkeiten

(cm/Jahr) ($p = 0,016$) im ersten Therapiejahr erreichen, als Patienten mit einem oder zwei C Allelen (30). Costalonga et al. untersuchten 71 Patienten mit schwerem isoliertem Wachstumshormonmangel oder kombinierten Hypophysenhormonausfällen ($\text{GH}_{\text{max}} < 5,0 \mu\text{g/l}$), wobei die GH-Peak-Level der Wachstumshormonstimulationstests allesamt kleiner $3,3 \mu\text{g/l}$ waren. Die täglich verabreichte rhGH-Dosis lag mit einem Mittelwert von $32,0 \mu\text{g/kg/d}$ circa $9,5 \mu\text{g/kg/d}$ über der durchschnittlich verabreichten Menge an rhGH, die das Patientenkollektiv dieser Arbeit verabreicht bekam. Die Tatsache, dass sich die Patientenkollektive im Hinblick auf Diagnose, applizierte Wachstumshormonmenge und Schweregrad des Wachstumshormonmangels (18) deutlich unterscheiden, könnte erklären, warum Costalonga et al. einen statistisch signifikanten Unterschied in der Ansprechbarkeit auf die rhGH-Therapie in Abhängigkeit des IGFBP3-Promotors vorweisen können, im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit. Zur weiteren Evaluierung wäre eine größere Kohorte von Patienten mit isoliertem Wachstumshormonmangel notwendig, wobei die Ansprechbarkeit zumindest in einem Standard-Deviation-Score (SDS) der Wachstumsgeschwindigkeit angegeben sein sollte, um eine Beeinflussung durch Alter und Geschlecht zu vermindern.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei weitere SNPs in Genen der GH-IGF1-Achse untersucht (rs2267723, rs572169), für die sich jeweils keine statistische Signifikanz gezeigt hat.

rs2267723 ist ein A/G-Austausch und ist im Growth hormone releasing hormone receptor (GHRHR) lokalisiert. Der GHRHR befindet sich vorzugsweise auf somatotropen Zellen der Adenohypophyse und ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor. Das Andocken von GHRH, einem aus 44 Aminosäuren bestehenden Peptidhormon, das von neurosekretorischen Neuronenenden sezerniert wird, und über das hypothalamo-hypophysäre Portalgefäßsystem zur Adenohypophyse gelangt, verursacht eine Konformationsänderung des Rezeptors und hiermit eine Stimulation der membrangebundenen Adenylatzyklase (29). Verschiedene Mutationen im GHRHR-Gen sind nachweislich assoziiert mit familiär isoliertem Wachstumshormonmangel, wobei

diese Art des Mangels lediglich zu reduzierter und nicht vollständig ausbleibender Wachstumshormonbildung führt (42, 133). Neben den bereits bekannten Mutationen wurden auch etliche SNPs im GHRHR-Gen entdeckt und unter anderem von Johansson et al. bezüglich ihres Einflusses auf die Körperendgröße untersucht (65). Sie fanden heraus, dass zwei Haplotypen – hierin ist auch der SNP rs2267723 involviert - im GHRHR-Gen für etwa 1,8% der Variation in der Körperendgröße verantwortlich sind. Das GHRHR-Gen stellt somit eines der wichtigsten Gene für die Beeinflussung der Körpergröße dar. Der SNP rs2267723 alleine konnte in der vorliegenden Arbeit nicht mit einer Variation der Körpergröße infolge einer Therapie mit rhGH assoziiert werden.

rs572169 ist auch ein A/G-Austausch und befindet sich im Growth hormone secretagogue receptor (GHSR). Der GHSR wurde 1996 von Howard et al. 3 Jahre vor der Entdeckung seines Liganden „Ghrelin“ (74) in Hypothalamus und Hypophyse ausgemacht (62). Ghrelin wird insbesondere von der Schleimhaut des Magens (37) aber auch zahlreichen anderen Geweben – wie z.B. der Hypophyse (75) und dem Hypothalamus (31) - sezerniert und erreicht durch endo- und parakrine Wirkung eine Stimulation der GH-Ausschüttung und eine Anregung des Appetits (76). Die Regulation der GHSR mRNA Expression geschieht über zahlreiche Hormone, unter anderem führt ein Wachstumshormonmangel zur gesteigerten (35) und eine rhGH-Therapie zur reduzierten (44) GHSR Bildung. Interessanterweise besitzt GHR eine hohe Grundaktivität, weshalb ein Ghrelin-Mangel nicht zwangsläufig zum kompletten Ausfall dieses Signaltransduktionsweges führt (61). Hingegen führen Mutationen im GHSR-Gen zum Wachstumshormonmangel (106). Gueorguiev et al. stellten 2009 die Vermutung an, SNPs im Ghrelin- bzw. GHSR-Gen könnten Ursache sein für Variationen der Körperendgröße in der Allgemeinbevölkerung (53). Bestandteil dieser Untersuchung war auch der SNP rs572169 für den – wie für alle anderen getesteten SNPs - kein Beweis für eine Beteiligung an der Modulation der Körperendgröße gezeigt wurde. Dieses Ergebnis wurde 2012 von Riedl et al. bestätigt (122). Weitere Untersuchungen des SNP rs572169 bezüglich der schweren Alkoholabhängigkeit bei Frauen und Übergewicht bei Kindern ergaben ebenfalls keine statistisch signifikanten Ergebnisse (81, 150).

5.2.2 Wachstumsfuge

Der aktive Vitamin D₃ Metabolit 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ vermittelt seine Wirkung über einen im Zellkern lokalisierten Rezeptor (VDR) (56) und beeinflusst die Transkription zahlreicher Gene (22). Im VDR konnten beim Menschen bereits einige SNPs gefunden werden (104), wie zum Beispiel der FokI SNP (rs2228570), der als einziger zu einem Protein mit veränderter Struktur führt (5). Etliche Studien beschäftigten sich mit der Frage, ob es eine Korrelation zwischen dem FokI Polymorphismus und der genetischen Prädisposition von Autoimmunerkrankungen, Neoplasien und Erkrankungen des Knochens gibt (145), da 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ nicht nur eine Hauptrolle im Ca²⁺-Stoffwechsel und am Knochen spielt, sondern auch die Proliferation normaler und entarteter Zellen hemmt und eine zentrale Rolle im Immunsystem einnimmt (95). Bereits 1998 vermochten Minamitani et al. eine Verbindung zwischen der Variabilität der Körpergröße und dem FokI Polymorphismus aufzuweisen (97). Dempfle et al. bestätigten 2006 die Ergebnisse und zeigten, dass der GG-Genotyp (homozygote Mutante) mit dem idiopathischen Kleinwuchs (Idiopathic Short Stature; ISS) assoziiert ist ($p < 0,05$) (41). Diese Hintergrundinformationen und die Tatsache, dass 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ eine entscheidende Rolle an der Regulation der Wachstumsfuge einnimmt, führten zu der Idee, den FokI Polymorphismus hinsichtlich seines Einflusses auf das Ansprechverhalten bei rhGH-Therapie zu untersuchen. Die Analyse der in dieser Arbeit gesammelten Daten zeigt jedoch in Bezug auf den FokI Polymorphismus keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen im Ansprechverhalten auf eine rhGH-Therapie.

Die gleiche Grundidee führte zur Untersuchung eines im Östrogen-Rezeptor-1-Gen (ESR1) befindlichen SNP (rs2347867), nachdem bereits in zwei großen Genom-weiten Assoziationsstudien eine Verbindung zwischen diesem auf Chromosom 6q25.1 lokalisierten Gen und der Körpergröße auffindig gemacht werden konnte (58, 160). Wie in 2.2.2. beschrieben, ist das Vorhandensein von Östrogen notwendig, um bei beiden Geschlechtern eine regelrechte Knochenreifung und einen zeitlich angepassten Epiphysenfugenverschluss zu erzielen (73). Wie auch der VDR ist der ESR1 ein

ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor. Der Hormon-Rezeptor-Komplex bindet im Zellkern an regulatorische Promotorelemente der hormonabhängigen Gene und beeinflusst die Transkription (91). 1994 veröffentlichten Smith et al. einen Case Report zu einem 24-jährigen Mann mit einer durch homozygote Mutationen im ESR1 verursachten vollständigen Östrogen-Resistenz, die zum inkompletten Epiphysenfugenschluss und Wachstum bis ins Erwachsenenalter führten (135). Bei Betrachtung der Tatsache, dass ein so seltener rezessiver Defekt in der Lage ist die Körperendgröße massiv zu beeinflussen, ist es denkbar, dass andere häufigere Genvarianten im ESR1-Gen mit kleinerem Effekt ebenso zu – wenn auch geringeren – Änderungen im Wachstum führen (34, 128). Dennoch konnten in Hinsicht auf eine rhGH-Therapie in dieser Arbeit bei Patienten mit einem Wachstumshormonmangel keine unterschiedlichen Ansprechraten auf eine rhGH-Therapie bei den verschiedenen Genotypen GG/AG/AA des SNPs rs2347867 festgestellt werden.

5.2.3 Zellzyklus

CDK4 (Cyclin-dependent kinase 4) ist ein Mitglied der Cyclin-abhängigen Kinasen, und beteiligt an der Steuerung des G1-S-Übergangs im Zellzyklus (s. 2.2.3). 2014 veröffentlichten Stevens et al. Teilergebnisse der PREDICT Study über zwei, im CDK4-Gen lokalisierte SNPs (rs2270777 und rs2069502). Hierbei wurde untersucht, ob die unterschiedlichen Genotypen der zwei Polymorphismen auf den Wandel des IGF1-Levels im ersten Behandlungsmonat einer rhGH-Therapie bei Kindern mit GHD bzw. UTS Einfluss haben (140). Das IGF1-Monitoring bietet eine Möglichkeit zur Überprüfung der Kurzzeitanprechraten und kann laut Park et al. zur Optimierung der rhGH-Therapie eingesetzt werden (26, 87, 107). Jedoch steht die Änderung der IGF1-Konzentration im Blut der Patienten nicht zwingend in direktem Zusammenhang mit der Langzeitanprechrate auf die rhGH-Therapie und kann deshalb nicht als Vorhersagewert für die Endgröße eingesetzt werden (108, 124).

Mädchen mit Ullrich-Turner-Syndrom, die betreffend rs2069502 Träger des Genotypen GG sind, zeigen in der PREDICT Study eine 4,7-fach geringere Wahrscheinlichkeit zu den „High Responder“ zu zählen und fallen mit tendenziell geringeren Δ IGF1-Werten auf. Für Kinder mit einem Wachstumshormonmangel konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den differierenden Genotypen gefunden werden. Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Träger des Genotypen GG einen signifikant höhere IoR-Werte aufweisen und besser auf eine rhGH-Therapie ansprechen. Genauer gesagt erreichte die Gruppe der Patienten, die homozygot für das Allel G (GG) waren im Durchschnitt einen IoR von 0,2539 im Gegensatz zu der Gruppe der Patienten die homozygot für das Allel A (AA) waren mit einem deutlich geringeren Mittelwert von - 1,1455. Interessanterweise konnte zudem gezeigt werden, dass Patienten die beide Allele aufweisen (AG) ähnlich hohe IoR-Werte erzielen wie Patienten mit zwei G Allelen. Patienten mit Genotyp AG hatten ebenfalls signifikant höhere IoR-Werte als Patienten mit Genotyp AA.

Kinder mit einem Wachstumshormonmangel und Genotyp AA für den SNP rs2270777 zeigen in der PREDICT Study höhere Δ IGF1-Werte und hatten eine 1,6-fach höhere Wahrscheinlichkeit zu den „High Responder“ zu gehören. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden. Für den SNP rs2270777 liegt der p-Wert in der einfaktoriellen ANOVA $> 0,05$.

Da in der Veröffentlichung von Stevens et al. die Ansprechrate mit Hilfe von biochemischen Parametern nach einem Behandlungszeitraum von nur einem Monat beurteilt wird, ist ein Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit erschwert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass pharmakologische Studien eine Möglichkeit bieten, in Kombination mit der Erhebung auxologischer und laborchemischer Parameter, die Grundlagen für eine individuelle rhGH-Therapie zu schaffen. Die Resultate, sprich die mit signifikant höheren IoR-Werten einhergehenden SNPs rs2888586 und rs2069502, bedürfen einer Validierung anhand einer großen unabhängigen Kohorte. Um das Auftreten falsch positiver oder negativer Testergebnisse zu reduzieren, sollte die Kohorte idealerweise folgende Voraussetzungen erfüllen:

- Diagnose: isolierter Wachstumshormonmangel
- Bildung von zwei Gruppen bezüglich des Schweregrads der Erkrankung ($\text{GHmax} \leq 3 \mu\text{g/l}$ und $3 \mu\text{g/l} < \text{GH max} \leq 5 \mu\text{g/l}$)
- Unterscheidung von drei Altersgruppen wegen der alterabhängigen Ausprägung der Genexpression
- Präpubertärer Status während des gesamten Beobachtungszeitraums
- Berücksichtigung der ethnischen Herkunft
- Bestmögliche Sicherstellung der Compliance
- Gebrauch eines standardisierten Parameters zur Objektivierung des Ansprechverhaltens auf die rhGH-Therapie

5.3 GHR Exon 3 Deletion - Projekt

Wachstumshormonrezeptoren (GHR) sind Rezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinase und bestehen aus einer extrazellulären, einer transmembranären und einer cytoplasmatischen Domäne (43). Durch die Bindung von GH kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors. Die Dimerisierung verursacht eine Aktivierung der assoziierten Tyrosinkinase Janus Kinase 2 (JAK2). Im Verlauf der intrazellulären Signalkaskade werden die für das kindliche Wachstum essentiellen insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (IGFs) STAT5b-vermittelt (Signal transducer and activator of transcription 5B) induziert (109). Das für den GHR kodierende Gen ist auf Chromosom 5 lokalisiert und besteht aus 10 Exons (108). Exons 2-7 sind für die extrazelluläre, die

Exons 9 und 10 für die intrazelluläre, und das Exon 8 für die transmembranäre Domäne zuständig (72). Durch die Abwesenheit des Exon 3 entsteht aus dem homozygoten Wildtyp - dem sogenannten Vollängenrezeptor („full-length-receptor“ = fl) - eine um 22 Aminosäuren kürzere Form des GHR (d3/fl = heterozygote Deletion oder d3 = homozygote Deletion) (16). Sobrier et al. beschrieben schon 1993 Unterschiede in der Expression, Rezeptorstabilität etc. der beiden Isoformen dieses Rezeptors (136).

Dos Santos et al. gelang es 2004 erstmals, sowohl in vitro als auch am Menschen, einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Deletion des Exon 3 im GHR-Gen und der erhöhten Ansprechbarkeit auf eine rhGH Therapie nachzuweisen. Durch die exogene Zugabe von rhGH entwickelten mit dem d3-Allel transfizierte Fibroblasten höhere Signalstärken in der GHR-Signalkaskade. Zudem konnte gezeigt werden, dass Kinder die heterozygot (d3/fl) oder homozygot (d3) für die Deletion des Exon 3 sind, nach dem ersten Therapiejahr höhere Wachstumsgeschwindigkeiten vorweisen konnten als Kinder die homozygot für den Vollängenrezeptor (fl) sind (43).

Daraufhin folgten weitere, den im GHR-Gen lokalisierten Polymorphismus untersuchende Studien, welche sich vor allem in den zwei Variablen 1) die der rhGH-Therapie zugrundeliegende Indikation und 2) dem Parameter zur Definition der Ansprechbarkeit auf die rhGH-Therapie unterscheiden.

2009 trugen Wassenaar et al. erstmals die bis dorthin erfassten, durchaus heterogenen, Ergebnisse in einer auf 15 Studien basierenden Metaanalyse zusammen. Das Resultat der Metaanalyse bestand aus einer Assoziation des d3 - Genotyp mit einer erhöhten Wachstumsgeschwindigkeit (etwa 0,5 cm im ersten Therapiejahr), sowie der Verstärkung dieses Effekts durch geringere rhGH-Dosen (p-Wert = 0,02) und durch ein höheres Therapiealter (152).

Drei Jahre später veröffentlichten Renehan et al. ebenfalls eine - diesmal aus 12 Studien mit 18 Datensätzen bestehende - Metaanalyse zu dieser Thematik (120) und hinterfragten hierin auch die Ergebnisse von Wassenaar et al. Hier konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der d3 - Genotyp zu moderat erhöhten rhGH-Therapieeffekten

beiträgt. Eine Modifizierung des Therapieeffekts durch die unterschiedliche Dosierung des rhGH oder durch ein differierendes Therapiealter bei Therapiebeginn konnte nicht nachgewiesen werden. Renehan et al. führten diese Tatsache auf Mängel am Konstrukt der Metaanalyse von Wassenaar et al. zurück. Zum einen bestand die zwei Jahre zuvor entstandene Metaanalyse aus drei Datensätzen weniger und zumindest zwei der Datensätze (Carrascosa et al., Audi et al.) waren doppelt aufgelistet. Extreme Abweichungen in den Mittelwerten der rhGH-Dosierung konnten somit stärker ins Gewicht fallen und die Metaregressions-Analyse beeinflussen. Zum anderen verwendeten Wassenaar et al. einen nicht-standartisierten Parameter – die Wachstumsgeschwindigkeit nach Abschluss des 1. Therapiejahres (ΔHV cm/Jahr) - zur Objektivierung der Ansprechraten auf eine rhGH-Therapie. Im Gegensatz dazu bedienten sich Renehan et al. der relativen Größenzunahme im 1. Therapiejahr (ΔHt -SDS) ausgedrückt im Standard-Deviation-Score (SDS).

Außerdem setzten Wassenaar et al. einen dominanten Erbgang voraus und unterschieden aufgrund dessen lediglich Träger (d3 oder d3/fl) von Nicht-Trägern (fl) des Polymorphismus. Im Gegensatz hierzu nutzten Renehan et al. einen Ansatz, bei dem der Vererbungsmodus nicht ins Gewicht fällt und somit eine Alternative für Metaanalysen genetischer Assoziationsstudien darstellt. Hierfür erweiterten sie einen von Minelli et al. etablierten Ansatz (98) und kamen schließlich zur Annahme, dass der am ehesten vertretbare Vererbungsmodus ein kodominanter ist. So wurden die Genotypen paarweise miteinander verglichen.

Jedoch sind auch die Ergebnisse von Renehan et al. durch gewisse Einschränkungen in ihrer Aussagekraft limitiert. Erstens sind Metaanalysen von Beobachtungsstudien schon an sich anfällig für die in den Originalstudien begangenen systematischen Fehler. Zweitens können Parameter wie z.B. die Noncompliance einiger Patienten nicht getestet und somit auch nicht berücksichtigt werden (68). Drittens wird zur Darstellung der Ansprechraten auf eine rhGH-Therapie von der ΔHt -SDS Gebrauch gemacht. Dieser Parameter ist zwar standardisiert, jedoch fließen zahlreiche andere Faktoren wie die maximal ausgeschüttete GH-Konzentration im Wachstumshormonstimulationstest oder

das Alter bei Therapiebeginn nicht mit ein. Das, das Alter betreffende, Einschlusskriterium war hier lediglich eine Kohorte, bei der 50% der Kinder jünger als 16 Jahre alt sind. Die eventuell bereits eingetretene Pubertät, einhergehend mit dem Wachstumsschub, wurde nicht berücksichtigt (117). Viertens bezieht sich die Analyse nicht nur auf eine einzige Krankheitsursache, sondern vermischt diverse Indikationen zur rhGH-Therapie (GHD, SGA, Ullrich-Turner-Syndrom). Zusätzlich zur Wachstumsgeschwindigkeit bestimmten Wassenaar et al. 2009 auch die relative Körpergröße vor Therapiebeginn (baseline Ht-SDS). Präpubertäre Kinder mit GHD und einer Deletion des Exon 3 im GHR-Gen (GHR_{d3}) zeigten signifikant höhere relative Körpergrößen vor Therapiebeginn als präpubertäre Kinder mit GHD und Vollängenrezeptor (fl). Im Gegensatz dazu konnte bei präpubertären Kindern mit einer anderen, den Kleinwuchs verursachenden Erkrankung, kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden. Ein Vergleich von Kindern, die an GHD, und Kindern, die an einer anderen Grunderkrankung leiden, scheint somit nicht angebracht.

Für diese Arbeit wurde nach Vorlage von Renehan et al. ebenfalls ein kodominanter Erbgang angenommen und zunächst mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA die drei Genotypen untereinander verglichen. Hierbei ergibt sich eine statistische Signifikanz. Anschließend erfolgte ein t-Test für unabhängige Stichproben, zum Vergleich der homozygoten Deletion ($d3$) und dem Vollängenrezeptor (fl). Kinder, die homozygot für die Deletion im GHR-Gen ($d3$) sind sprechen signifikant besser auf eine rhGH-Therapie an. Interessant war auch die Feststellung, dass Patienten mit heterozygoter Deletion noch schlechtere Ansprechraten bzw. im Durchschnitt niedrigere IoR Werte erzielten als Patienten mit Vollängenrezeptor. Es sollte also weiterhin diskutiert werden, ob ein Vergleich von Patienten mit Vorhandesein eines Vollängenrezeptor (fl) mit Patienten, die eine Deletion des Exon 3 unabhängig ob nur auf einem oder sogar beiden Allelen vorweisen können, überhaupt sinnvoll ist. Es bleibt weiterhin unklar, was auf molekularer Ebene passiert, wenn sowohl der Vollängenrezeptor als auch der um 22 Aminosäuren verkürzte GHR vorhanden ist und wie sich dieser heterozygote Genotyp auf das Ansprechverhalten einer rhGH-Therapie auswirkt

Zusammenfassend gilt, dass eine vollständige Deletion des Exon 3 im GHR-Gen zu statistisch moderat erhöhten Ansprechraten auf eine Therapie mit rhGH führt. Die vorliegende Arbeit konnte die aktuelle Studienlage bestätigen, wenn auch die Überprüfung dieses GHR-Polymorphismus nur eingeschränkt als Vorhersagewert für die Wirkung einer rhGH-Therapie fungieren kann. Um sagen zu können, in welchem Ausmaß sich die jeweiligen Genotypen auf die Endgröße auswirken, bedarf es Studien mit größeren Fallzahlen, die ausschließlich Kinder mit einem idiopathischen Wachstumshormonmangel betreffen.

6 ANHANG

6.1 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
bp	Basepairs (Basenpaare)
C	Cytosin
c	Konzentration
CAK	CDK-activating Kinase
CDK	Cyclin-dependent Kinase
d3	Homozygote Deletion von Exon 3 des GHR
d3/fl	Heterozygote Deletion von Exon 3 des GHR
DAG	Diacylglycerol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
df	Degrees of Freedom
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelsträngige DNA
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESR1	Estrogen Receptor 1 (= Estrogen Receptor α)
F	Forward Primer
fl	Volllängenrezeptor des GHR (full-length receptor)
G	Guanin

g	Gramm
GAB1	GRB2-associated-binding protein 1
GH	Growth Hormone
GHD	Growth Hormone Deficiency
GHmax	Maximale GH-Konz. in Wachstumshormonstimulationstestungen
GHR	Growth Hormone Receptor
GHRd3	Growth Hormone Receptor Exon 3 Deletion
GHRHR	Growth Hormone Releasing Hormone Receptor
GHSR	Growth Hormone Secretagogue Receptor (Ghrelin Receptor)
Grb10	Growth Factor Receptor-bound Protein 10
Grb2	Growth Factor Receptor-bound Protein 2
GWA	Genomweite Assoziationstudien
H ₂ O	Wasser
HDAC	Histon-Deacetylase
het	Heterozygote Mutante
hGH	Human Growth Hormone
hom	Homozygote Mutante
HRM	High Resolution Melting
HV	Height velocity (cm/Jahr)
ICP Modell	Infancy-Childhood-Pubarty-Modell
IGF1	Insulin like Growth Factor 1
IGF1R	Insulin like Growth Factor 1 Receptor
IGFBP3	Insulin like Growth Factor Binding Protein 3
JAK	Januskinase
kb	Kilobase
KEV	Konstitutionelle Entwicklungsverzögerung
KG	Körpergewicht
KI	Konfidenzintervall
KIGS	Kabi International Growth Study
kV	Kilovolt
LHX4	LIM/homeobox protein 4

M	Mittelwert
Max	Maximum
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen
MD	Mittelwertdifferenz
MEG	Mittlere Elterngröße
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
Min	Minimum
n	Anzahl
NLS	nuclear localization signal (Kernlokalisierungssequenz)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIT-1	Pituitary-specific positive transcription factor 1
PM	Primermix
PROP1	Homeobox protein prophet of PIT-1
QMW	Mittel der Quadrate
QS	Quadratsumme
R	Reverse Primer
Ras	Rat sarcoma
rhGH	Recombinant Human Growth Hormone
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
ROI	Region of Intrest
SD	Standardabweichung
SDS	Standard Deviation Score
SE	Standardfehler
sec	Sekunden
Sig.	Signifikanz
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOS1	Son of sevenless homolog 1
ssDNA	Einzelsträngige DNA
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
T	Thymin

Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
V	Volumen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WS	Wachstumsstudie (zur Numerierung der DNA Proben)
WT	Homozygoter Wildtyp
Δ Ht-SDS	Δ Height-Standard Deviation Score
μ l	Mikroliter

6.2 HRM - Abbildungen

6.2.1 Wachstumshormonachse

– SOS1 Gen: rs2888586

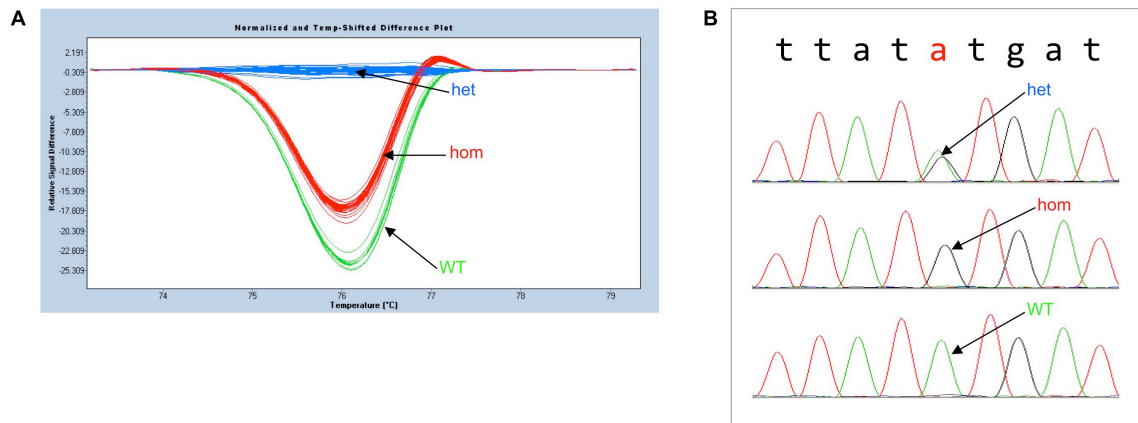


Abb. 46: SOS1 Gen rs2888586 DNA Platte A Differenzplot und Basensequenz

A: Differenzplot mit heterozygoten Mutanten (→ blau), homozygoten Mutanten (→ rot) und homozygoten Wildtypen (→ grün); als Referenzkurve dient hier die DNA Probe einer heterozygoten Mutante

B: Ausschnitt der Basensequenz dreier DNA Proben aus den jeweiligen Gruppen heterozygote Mutanten, homozygote Mutanten, und homozygote Wildtypen nach Sequenzierung, (t=Thymin, a=Adenin, g=Guanin, c=Cytosin), der entscheidende SNP ist rot markiert

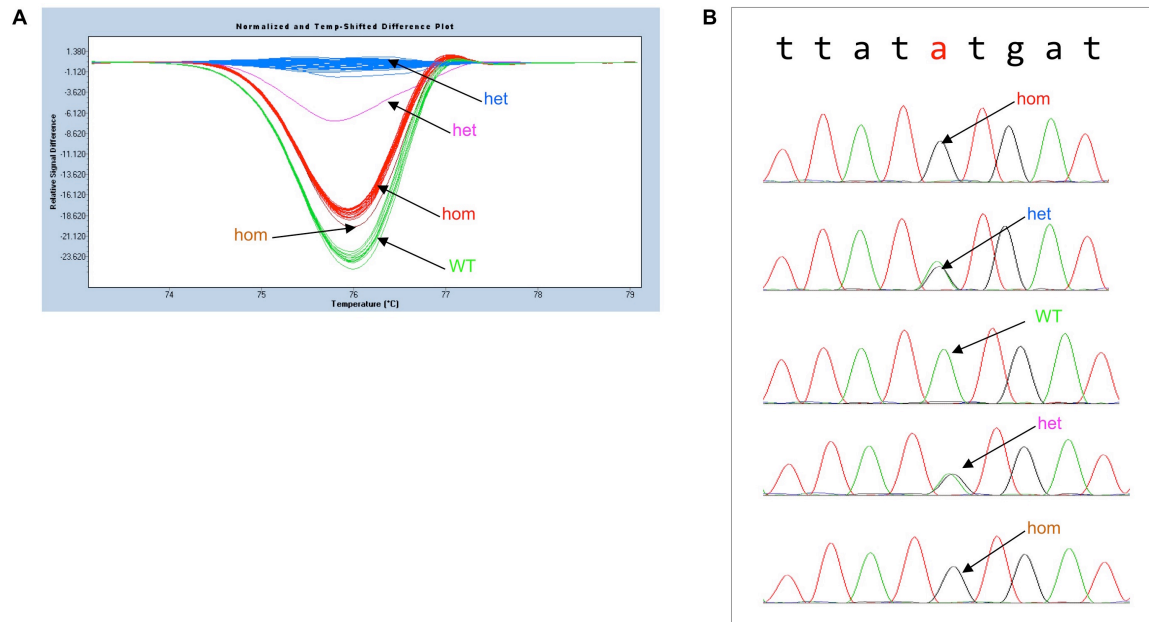


Abb. 47: SOS1 Gen rs2888586 DNA Platte B Differenzplot und Basensequenz

A: Differenzplot mit heterozygoten Mutanten (→ blau/pink), homozygoten Mutanten (→ rot/braun) und homozygoten Wildtypen (→ grün)

B: Ausschnitt der Basensequenz von fünf DNA Proben aus den jeweiligen Gruppen heterozygote Mutanten, homozygote Mutanten, und homozygote Wildtypen plus zwei Ausreißer (pink und braun) nach Sequenzierung, (t=Thymin, a=Adenin, g=Guanin, c=Cytosin), der entscheidende SNP ist rot markiert

– GAB1 Gen: rs300919

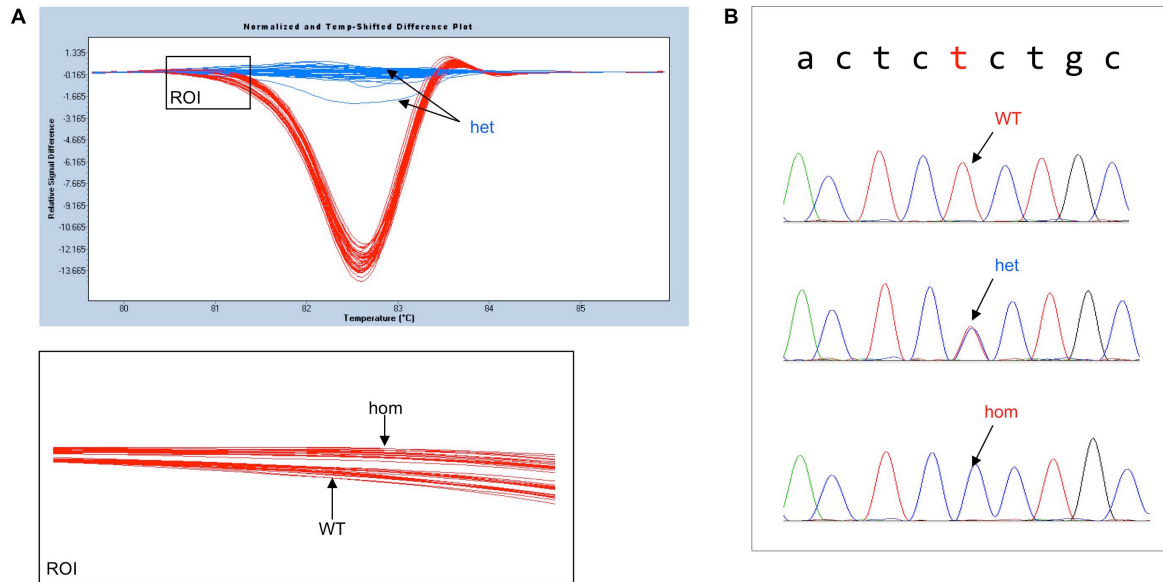


Abb. 48: GAB1 Gen rs300919 DNA Platte A Differenzplot und Basensequenz

A: Differenzplot mit heterozygoten Mutanten (→ blau), homozygoten Mutanten (→ rot) und homozygoten Wildtypen (→ rot); als Referenzkurve dient hier die DNA Probe einer heterozygoten Mutante; ROI mit Darstellung der Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen

B: Ausschnitt der Basensequenz dreier DNA Proben aus den jeweiligen Gruppen heterozygote Mutanten, homozygote Mutanten, und homozygote Wildtypen nach Sequenzierung, (t=Thymin, a=Adenin, g=Guanin, c=Cytosin), der entscheidende SNP ist rot markiert

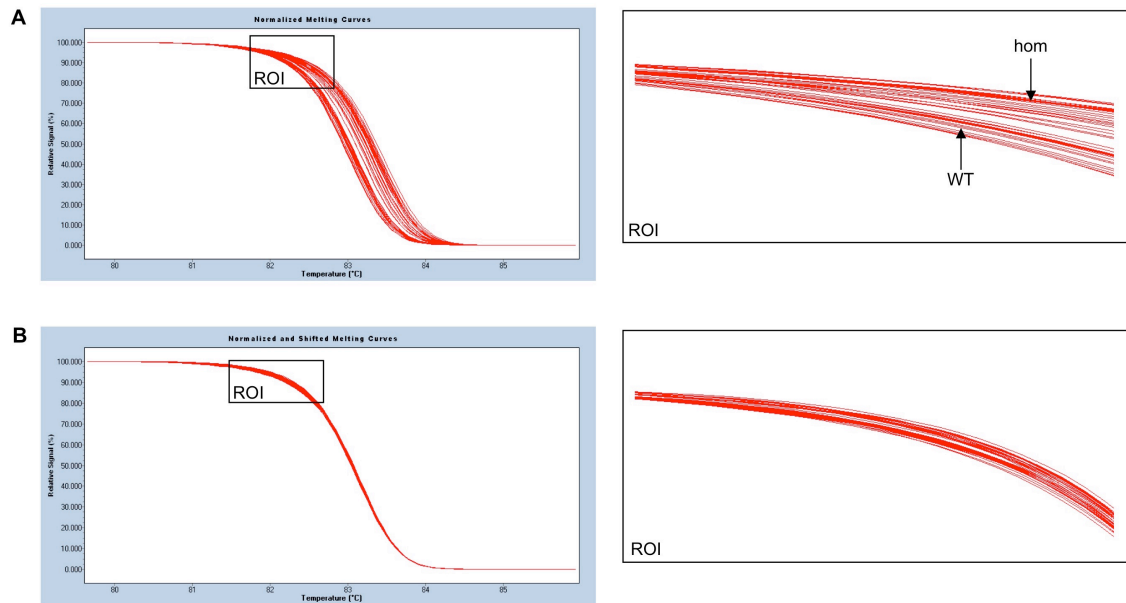


Abb. 49: GAB1 Gen rs300919 DNA Platte A Schmelzkurven

A: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen

B: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven nach der Temperaturverlagerung der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen

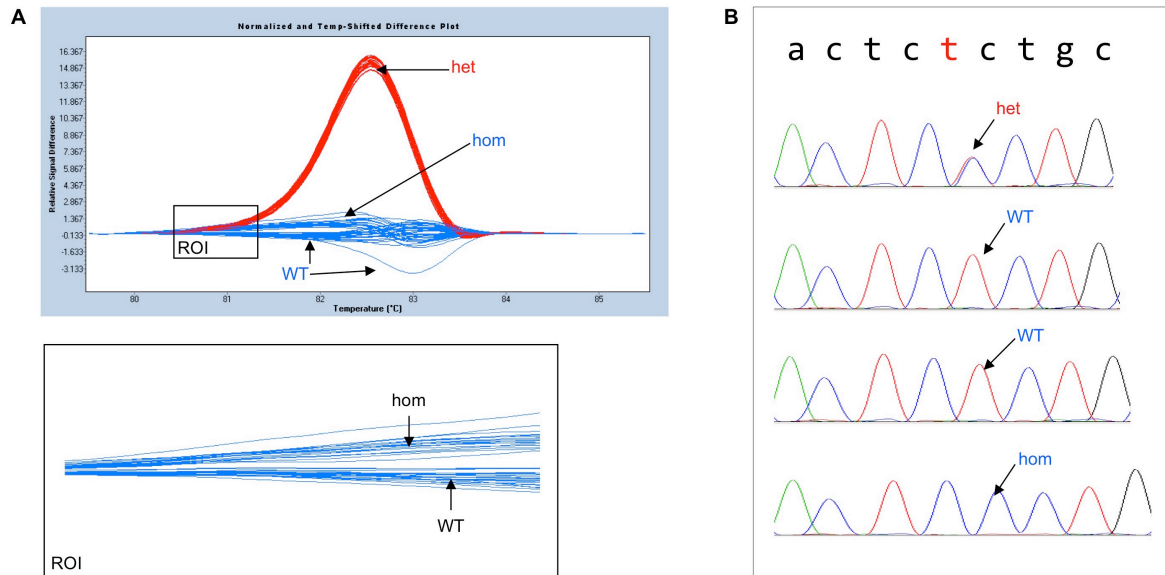


Abb. 50: GAB1 Gen rs300919 DNA Platte B Differenzplot und Basensequenz

A: Differenzplot mit heterozygoten Mutanten (→ rot), homozygoten Mutanten (→ blau) und homozygoten Wildtypen (→blau); als Referenzkurve dient hier die DNA eines homozygoten Wildtypen; ROI mit Darstellung der Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen

B: Ausschnitt der Basensequenz vierer DNA Proben aus den jeweiligen Gruppen heterozygote Mutanten, homozygote Mutanten, und homozygote Wildtypen plus ein Ausreißer nach Sequenzierung, (t=Thymin, a=Adenin, g=Guanin, c=Cytosin), der entscheidende SNP ist rot markiert

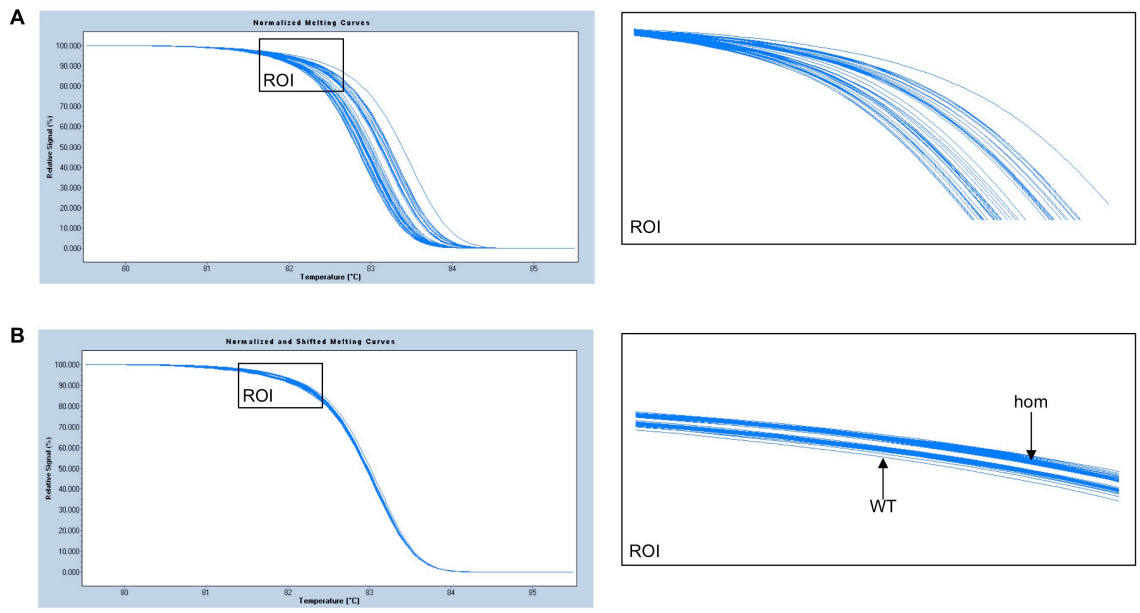


Abb. 51: GAB1 Gen rs300919 DNA Platte B Schmelzkurven

A: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen

B: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven nach der Temperaturverlagerung der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen

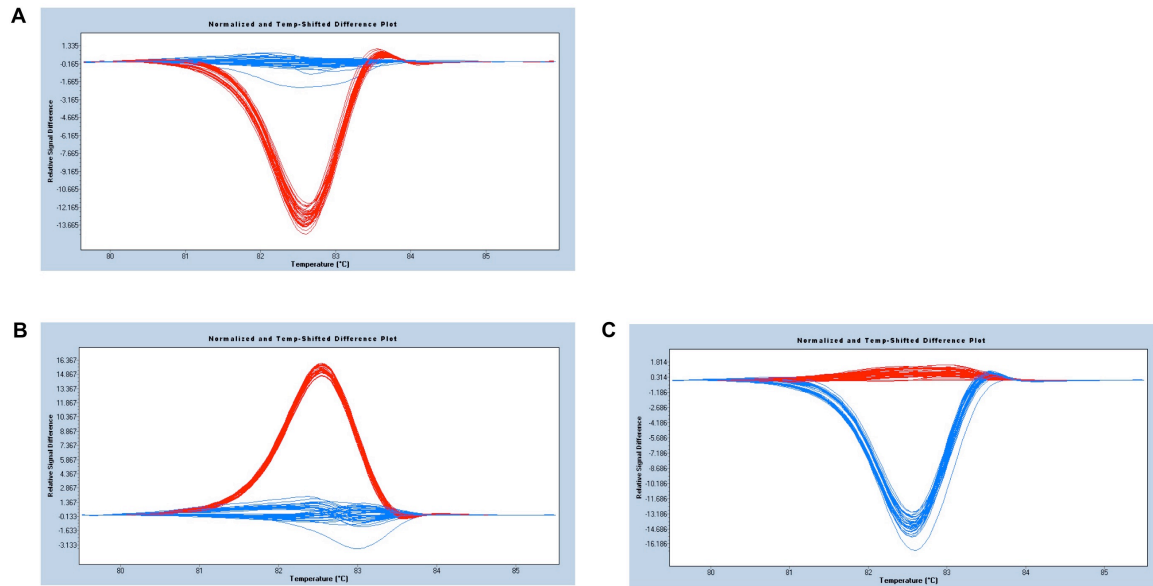


Abb. 52: GAB1 Gen rs300919 Vergleich der Differenzplots beider DNA Platten in Abhängigkeit von der per Zufall ausgewählten Referenzkurve

- A:** DNA Platte A mit einer DNA Probe einer heterozygoten Mutante als Referenzkurve
- B:** DNA Platte B mit einer DNA Probe eines homozygoten Wildtypen als Referenzkurve
- C:** DNA Platte B mit einer DNA Probe einer heterozygoten Mutante als Referenzkurve

– IGFBP3 Gen: rs3110697

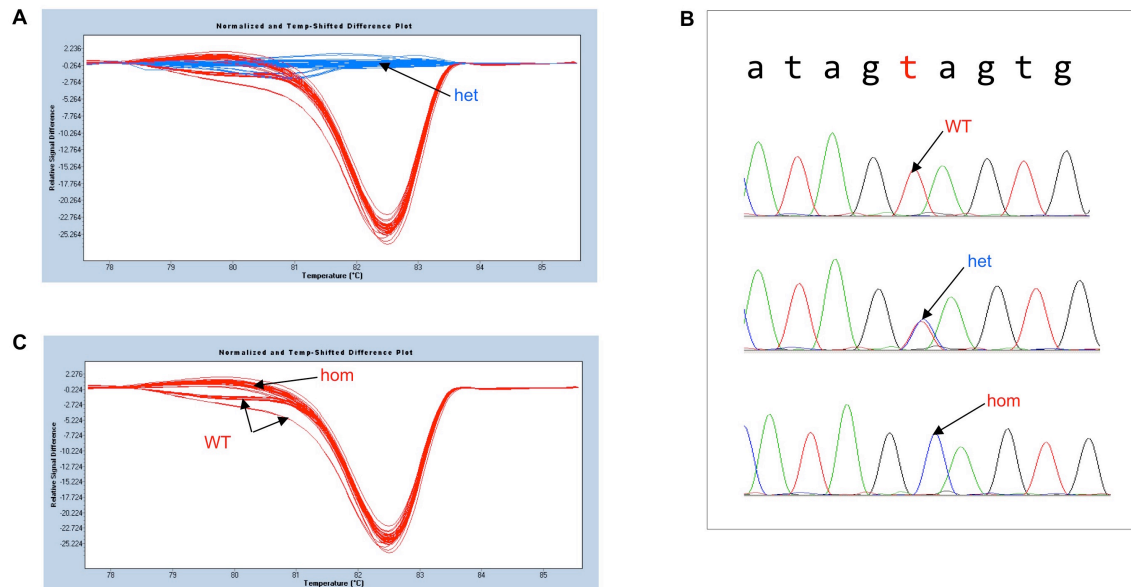


Abb. 53: IGFBP3 Gen rs3110697 DNA Platte A Differenzplot und Basensequenz

A und C: Differenzplot mit heterozygoten Mutanten (→ blau), homozygoten Mutanten (→ rot) und homozygoten Wildtypen (→rot); als Referenzkurve dient hier die DNA Probe einer heterozygoten Mutante

B: Ausschnitt der Basensequenz dreier DNA Proben aus den jeweiligen Gruppen heterozygote Mutanten, homozygote Mutanten, und homozygote Wildtypen nach Sequenzierung, (t=Thymin, a=Adenin, g=Guanin, c=Cytosin), der entscheidende SNP ist rot markiert

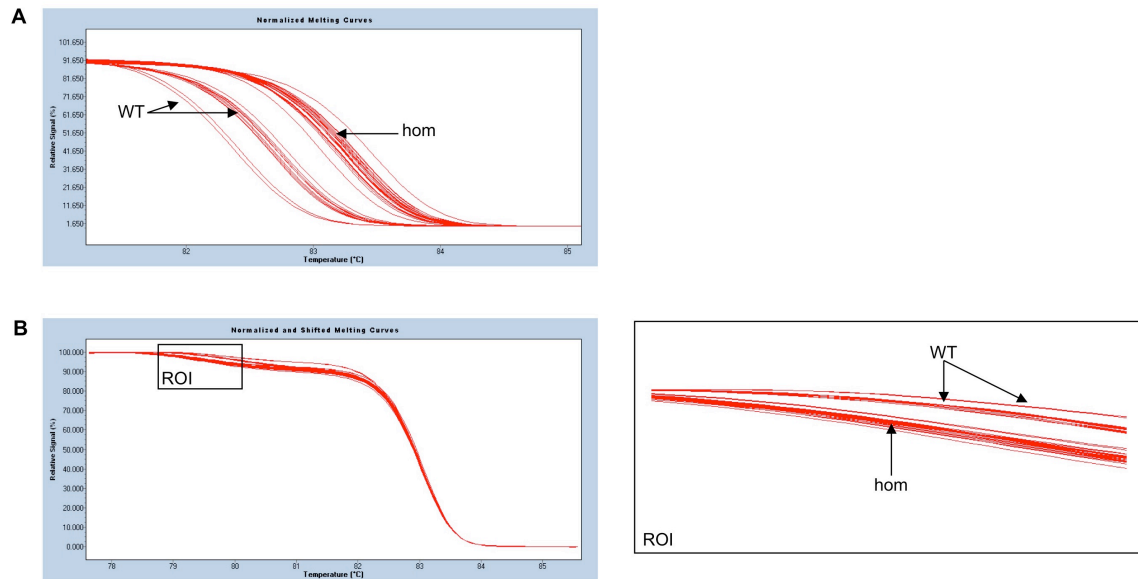


Abb. 54: IGFBP3 Gen rs3110697 DNA Platte A Schmelzkurven

A: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen

B: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven nach der Temperaturverlagerung der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen

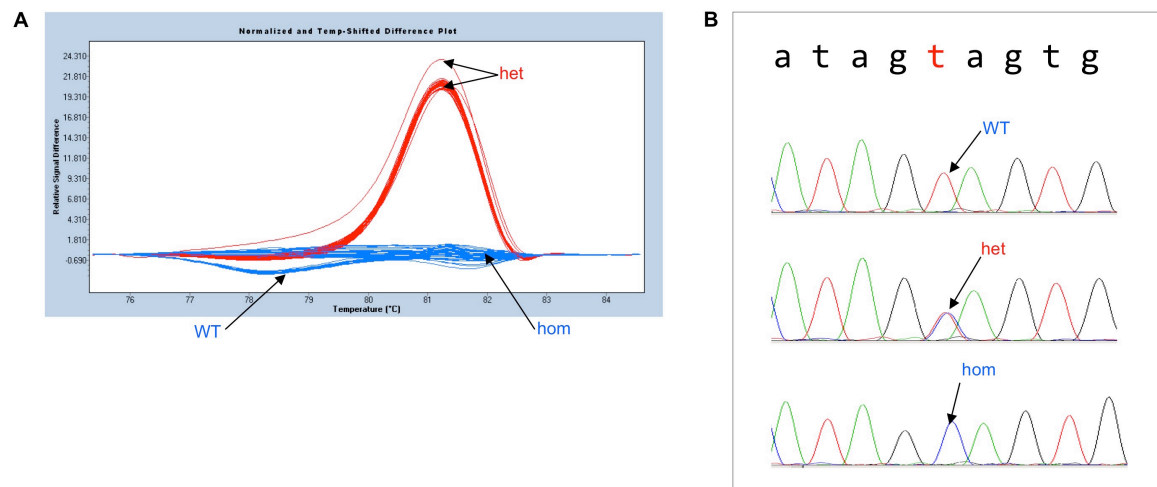


Abb. 55: IGFBP3 Gen rs3110697 DNA Platte B Differenzplot und Basensequenz

A: Differenzplot mit heterozygoten Mutanten (→ rot), homozygoten Mutanten (→ blau) und homozygoten Wildtypen (→blau); als Referenzkurve dient hier die DNA Probe einer homozygoten Mutante

B: Ausschnitt der Basensequenz dreier DNA Proben aus den jeweiligen Gruppen heterozygote Mutanten, homozygote Mutanten, und homozygote Wildtypen nach Sequenzierung, (t=Thymin, a=Adenin, g=Guanin, c=Cytosin), der entscheidende SNP ist rot markiert

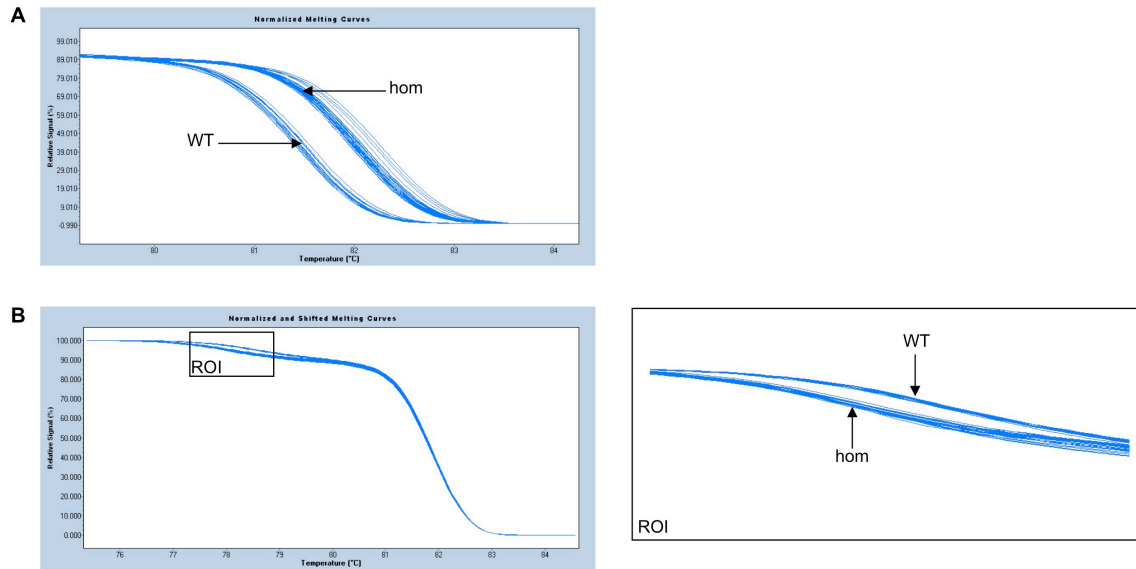


Abb. 56: IGFBP3 Gen rs3110697 DNA Platte B Schmelzkurven

A: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen

B: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven nach der Temperaturverlagerung der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen

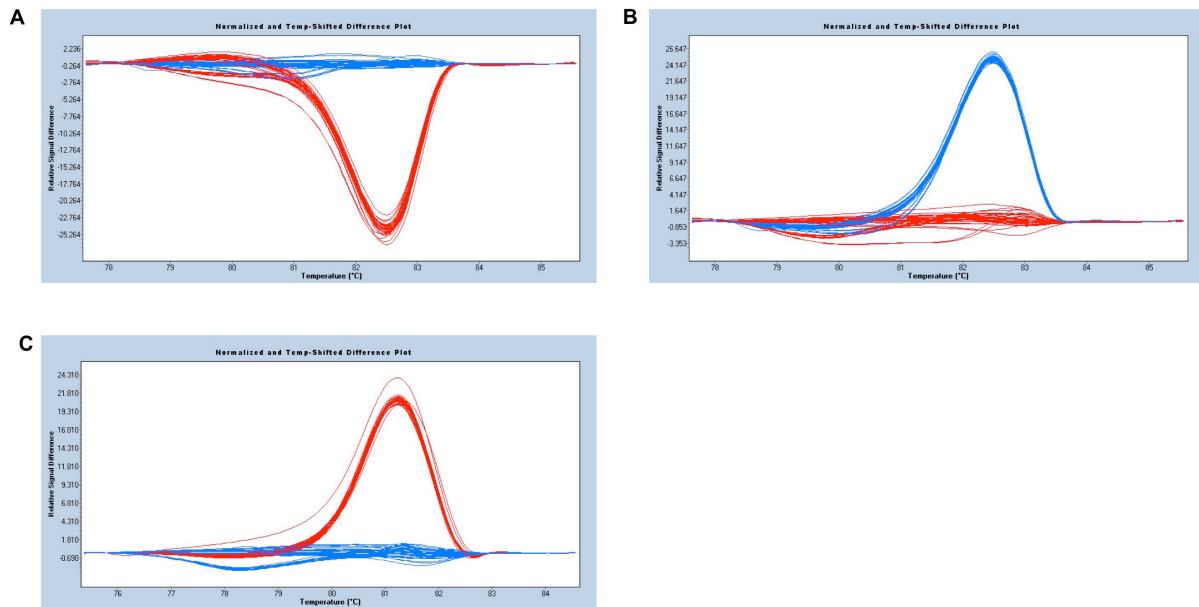


Abb. 57: IGFBP3 Gen rs3110697 Vergleich der Differenzplots beider DNA Platten in Abhängigkeit von der per Zufall ausgewählten Referenzkurve

A: DNA Platte A mit einer DNA Probe einer heterozygoten Mutante als Referenzkurve

B: DNA Platte A mit einer DNA Probe einer homozygoten Mutante als Referenzkurve

C: DNA Platte B mit einer DNA Probe einer heterozygoten Mutante als Referenzkurve

– Grb10 Gen: rs933360

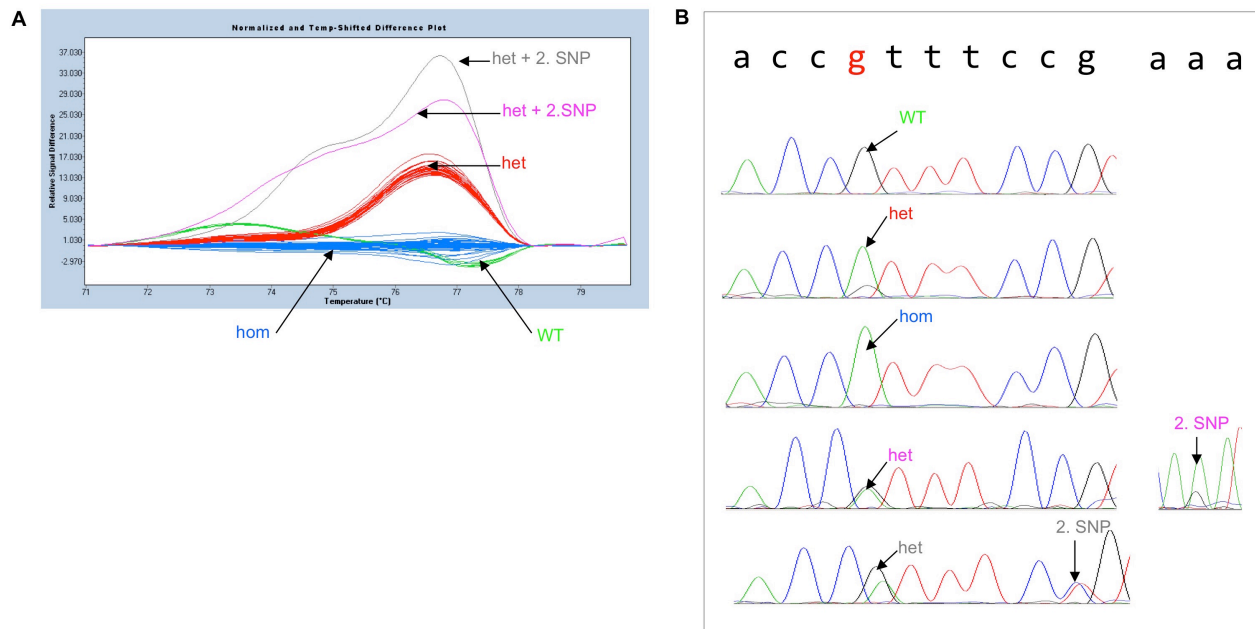


Abb. 58: Grb10 Gen rs933360 DNA Platte A Differenzplot und Basensequenz

A: Differenzplot mit heterozygoten Mutanten (→ rot), homozygoten Mutanten (→ blau) und homozygoten Wildtypen (→ grün); als Referenzkurve dient hier die DNA Probe einer homozygoten Mutante

B: Ausschnitt der Basensequenz von fünf DNA Proben aus den jeweiligen Gruppen heterozygote Mutanten, homozygote Mutanten, und homozygote Wildtypen plus zwei Ausreißer nach Sequenzierung, (t=Thymin, a=Adenin, g=Guanin, c=Cytosin), der entscheidende SNP ist rot markiert

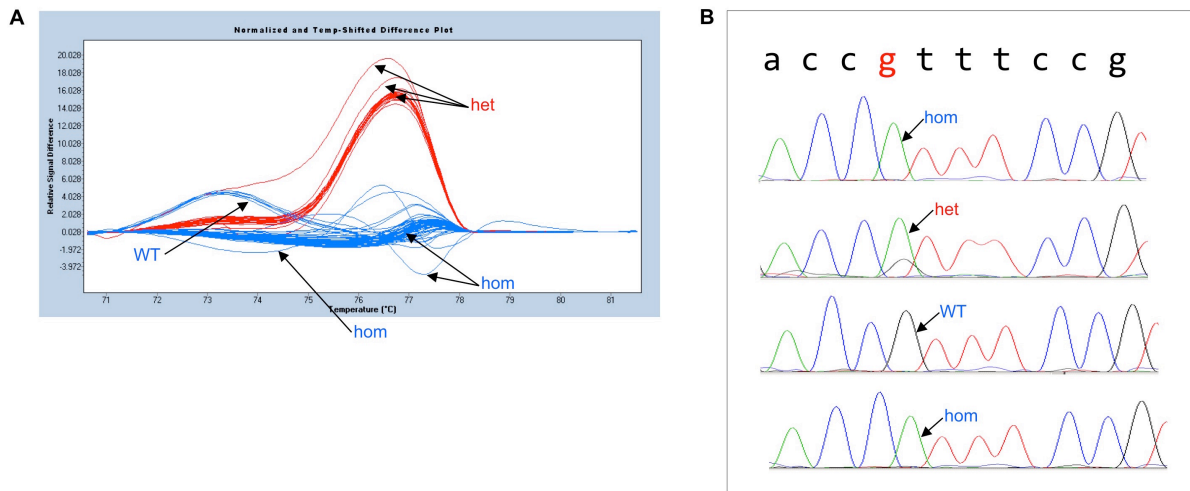


Abb. 59: Grb10 Gen rs933360 DNA Platte B Differenzplot und Basensequenz

A: Differenzplot mit heterozygoten Mutanten (→ rot), homozygoten Mutanten (→ blau) und homozygoten Wildtypen (→blau); als Referenzkurve dient hier die DNA Probe einer homozygoten Mutante

B: Ausschnitt der Basensequenz von vier DNA Proben aus den jeweiligen Gruppen heterozygote Mutanten, homozygote Mutanten, und homozygote Wildtypen plus ein Ausreißer nach Sequenzierung, (t=Thymin, a=Adenin, g=Guanin, c=Cytosin), der entscheidende SNP ist rot markiert

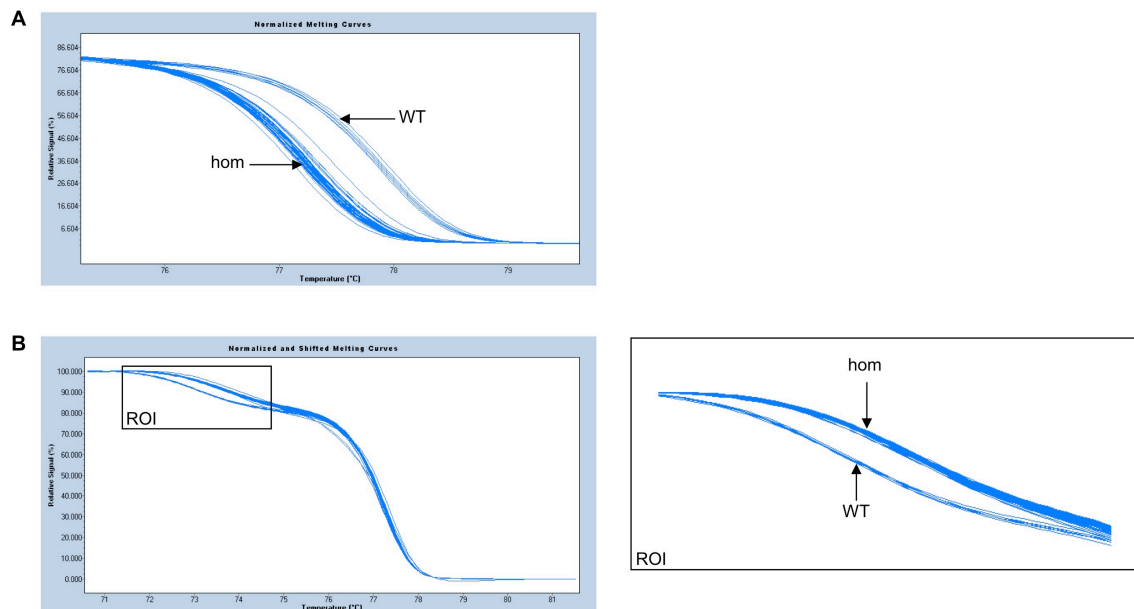


Abb. 60: Grb10 Gen rs933360 DNA Platte B Schmelzkurven

A: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen

B: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven nach der Temperaturverlagerung der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen

– GHRHR Gen: rs2267723

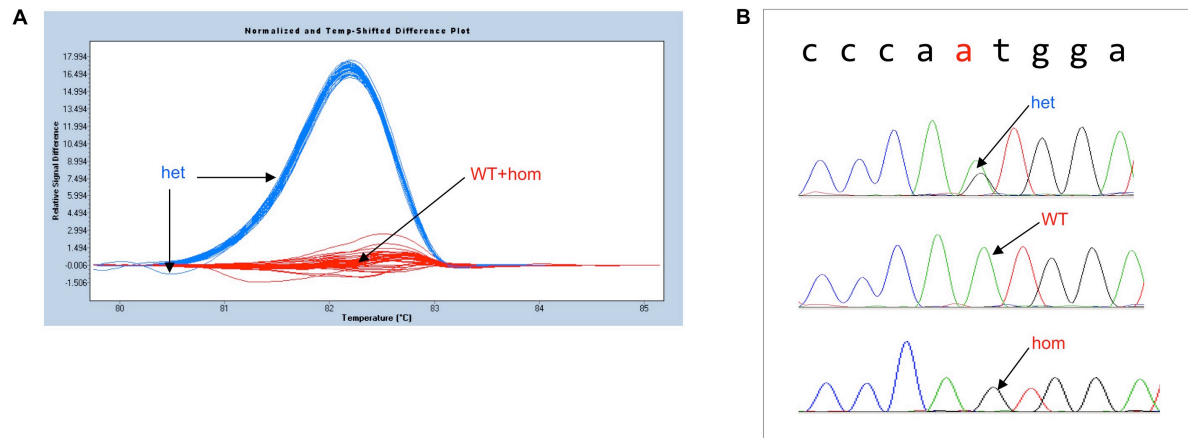


Abb. 61: GHRHR Gen rs2267723 DNA Platte A Differenzplot und Basensequenz

A: Differenzplot mit heterozygote Mutanten (→ blau), homozygote Mutanten (→ rot) und homozygote Wildtypen (→ rot); als Referenzkurve dient hier die DNA Probe einer homozygoten Mutante

B: Ausschnitt der Basensequenz dreier DNA Proben aus den jeweiligen Gruppen heterozygote Mutanten, homozygote Mutanten, und homozygote Wildtypen nach Sequenzierung, (t=Thymin, a=Adenin, g=Guanin, c=Cytosin), der entscheidende SNP ist rot markiert

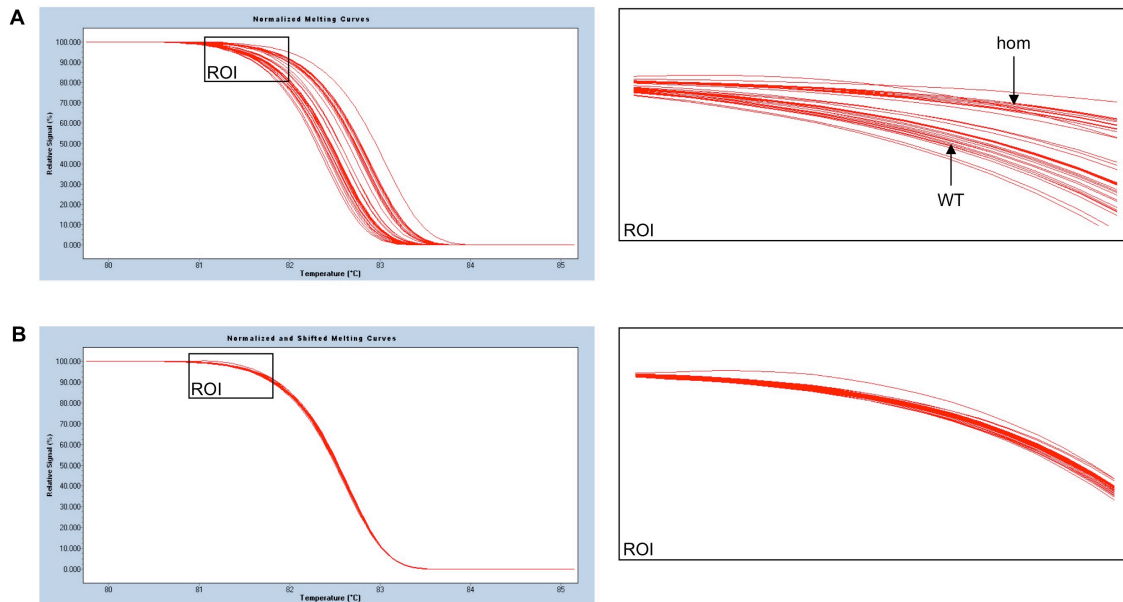


Abb. 62: GHRHR Gen rs2267723 DNA Platte A Schmelzkurven

A: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen

B: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven nach der Temperaturverlagerung der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen (hier: keine eindeutige Zuordnung der DNA Proben in die Gruppen homozygoten Mutanten und homozygoten Wildtypen möglich)

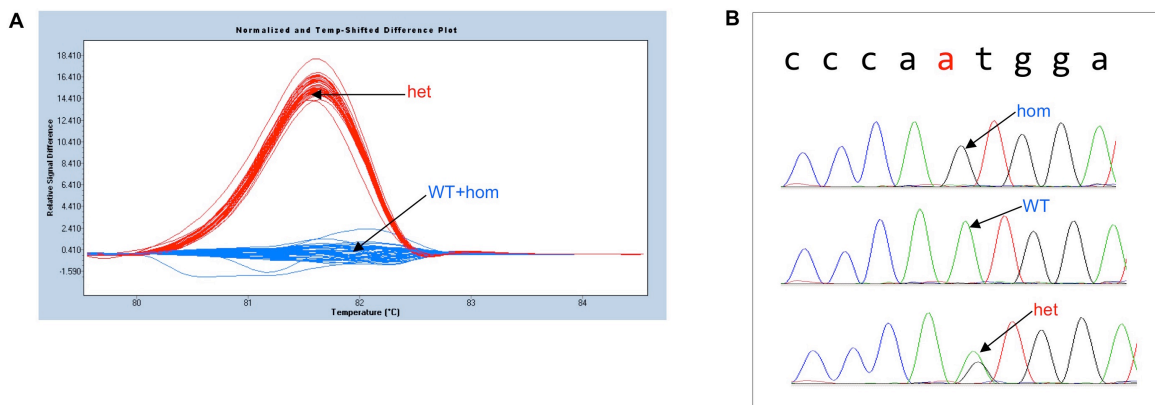


Abb. 63: GHRHR Gen rs2267723 DNA Platte B Differenzplot und Basensequenz

A: Differenzplot mit heterozygoten Mutanten (→ rot), homozygote Mutanten (→ blau) und homozygoten Wildtypen (→blau); als Referenzkurve dient hier die DNA Probe einer homozygoten Mutante

B: Ausschnitt der Basensequenz dreier DNA Proben aus den jeweiligen Gruppen heterozygote Mutanten, homozygote Mutanten, und homozygote Wildtypen nach Sequenzierung, (t=Thymin, a=Adenin, g=Guanin, c=Cytosin), der entscheidende SNP ist rot markiert

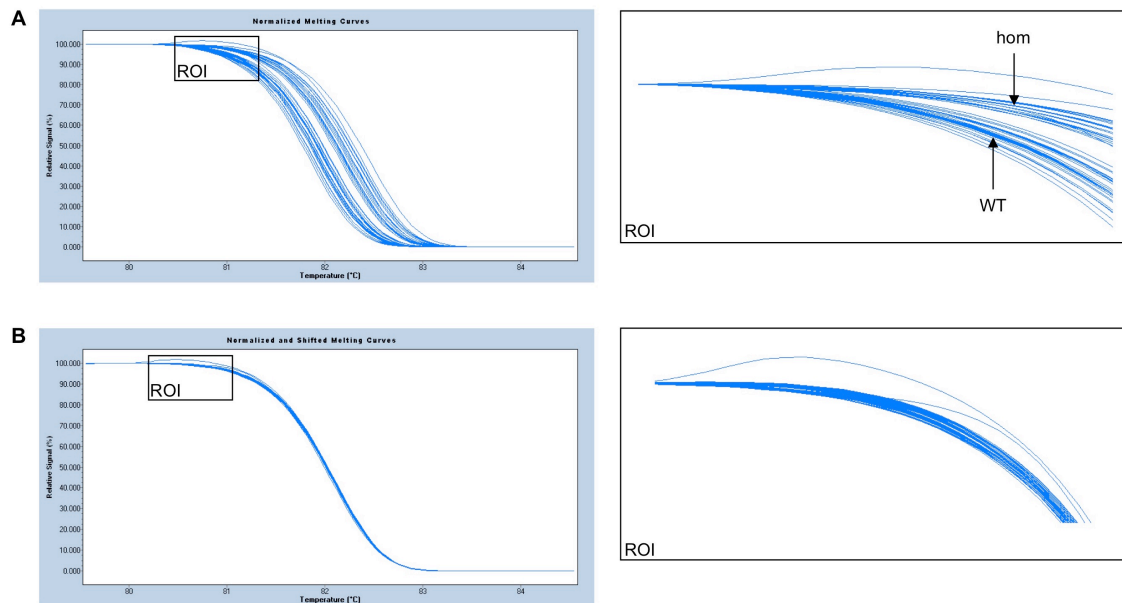


Abb. 64: GHRHR Gen rs2267723 DNA Platte B Schmelzkurven

A: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen

B: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven nach der Temperaturverlagerung der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen (hier: keine eindeutige Zuordnung der DNA Proben in die Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen möglich)

6.2.2 Wachstumsfuge

– VDR Gen: rs228570

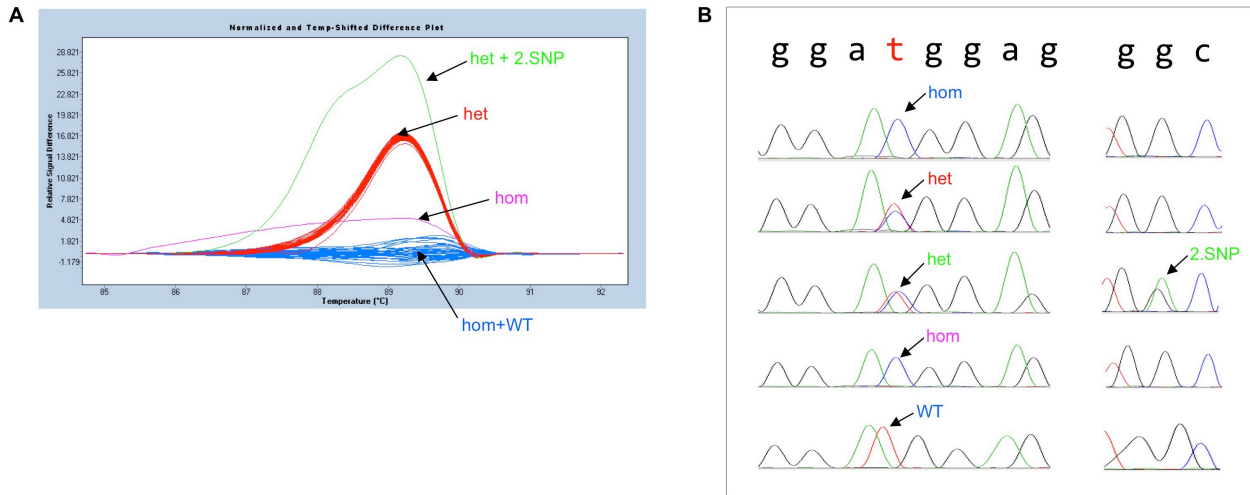


Abb. 65: VDR Gen rs228570 DNA Platte A Differenzplot und Basensequenz

A: Differenzplot mit heterozygoten Mutanten (→ rot/grün), homozygoten Mutanten (→ blau/pink) und homozygoten Wildtypen (→blau); als Referenzkurve dient hier die DNA Probe einer homozygoten Mutante

B: Ausschnitt der Basensequenz von fünf DNA Proben aus den jeweiligen Gruppen heterozygote Mutanten, homozygote Mutanten, und homozygote Wildtypen plus zwei Ausreißer (grün und pink) nach Sequenzierung, (t=Thymin, a=Adenin, g=Guanin, c=Cytosin), der entscheidende SNP ist rot markiert

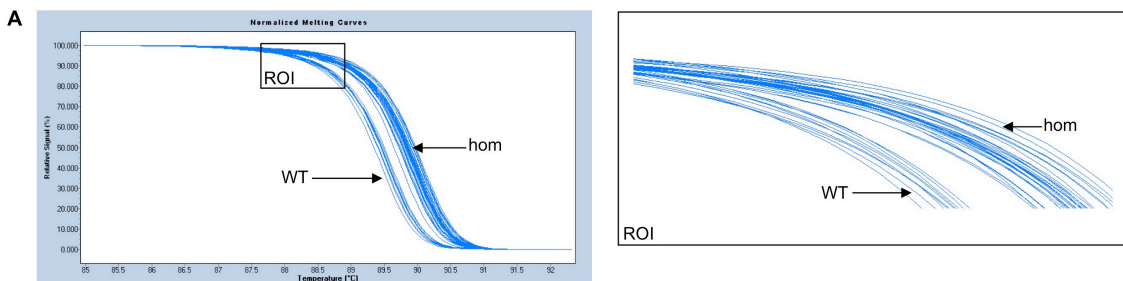


Abb. 66: VDR Gen rs228570 DNA Platte A Schmelzkurven

A: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen (hier: eine eindeutige Zuordnung der DNA Proben in die Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen ist in dieser Darstellung möglich)

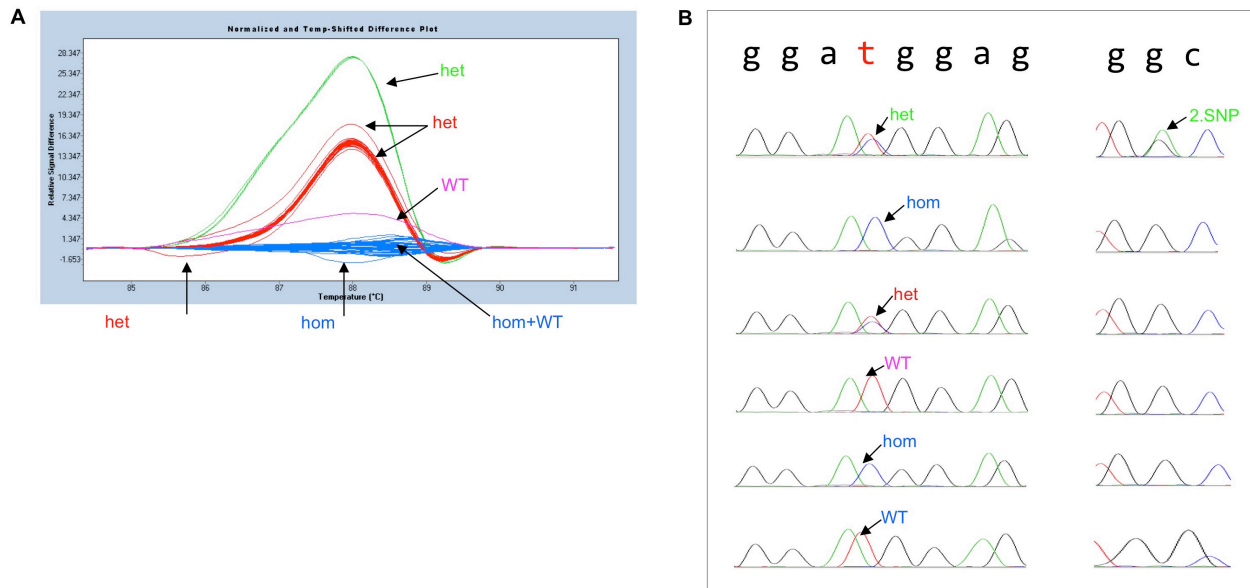


Abb. 67: VDR Gen rs228570 DNA Platte B Differenzplot und Basensequenz

A: Differenzplot mit heterozygoten Mutanten (→ rot/grün), homozygoten Mutanten (→ blau/pink) und homozygoten Wildtypen (→blau); als Referenzkurve dient hier die DNA Probe einer homozygoten Mutante

B: Ausschnitt der Basensequenz von fünf DNA Proben aus den jeweiligen Gruppen heterozygote Mutanten, homozygote Mutanten, und homozygote Wildtypen plus zwei Ausreißer (grün und pink) nach Sequenzierung, (t=Thymin, a=Adenin, g=Guanin, c=Cytosin), der entscheidende SNP ist rot markiert

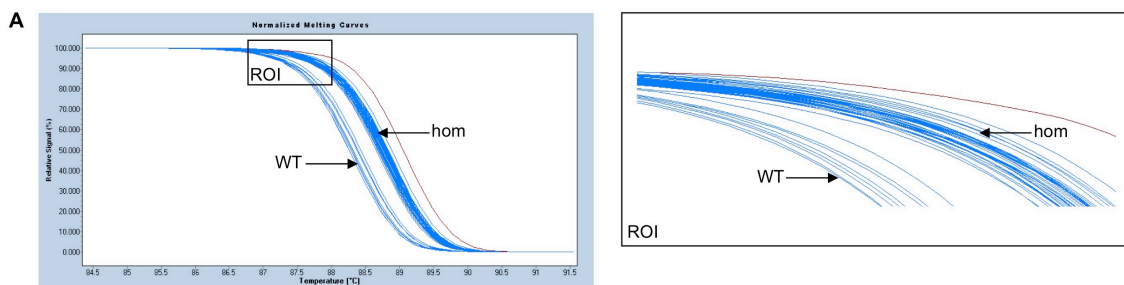


Abb. 68: VDR Gen rs228570 DNA Platte B Schmelzkurven

A: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven der beiden Gruppen homozygote Mutante und homozygote Wildtypen (hier: eine eindeutige Zuordnung der DNA Proben in die Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen ist in dieser Darstellung möglich)

– ESR1 Gen: rs2347867

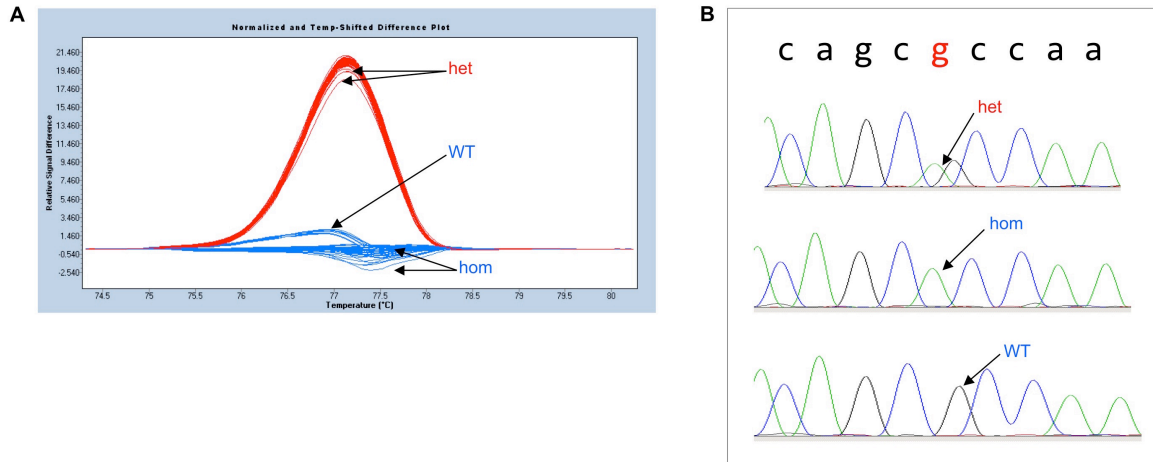


Abb. 69: ESR1 Gen rs2347867 DNA Platte A Differenzplot und Basensequenz

A: Differenzplot mit heterozygoten Mutanten (→ rot), homozygoten Mutanten (→blau) und homozygoten Wildtypen (→blau); als Referenzkurve dient hier die DNA Probe einer homozygoten Mutante

B: Ausschnitt der Basensequenz dreier DNA Proben aus den jeweiligen Gruppen heterozygote Mutanten, homozygote Mutanten, und homozygote Wildtypen nach Sequenzierung, (t=Thymin, a=Adenin, g=Guanin, c=Cytosin), der entscheidende SNP ist rot markiert

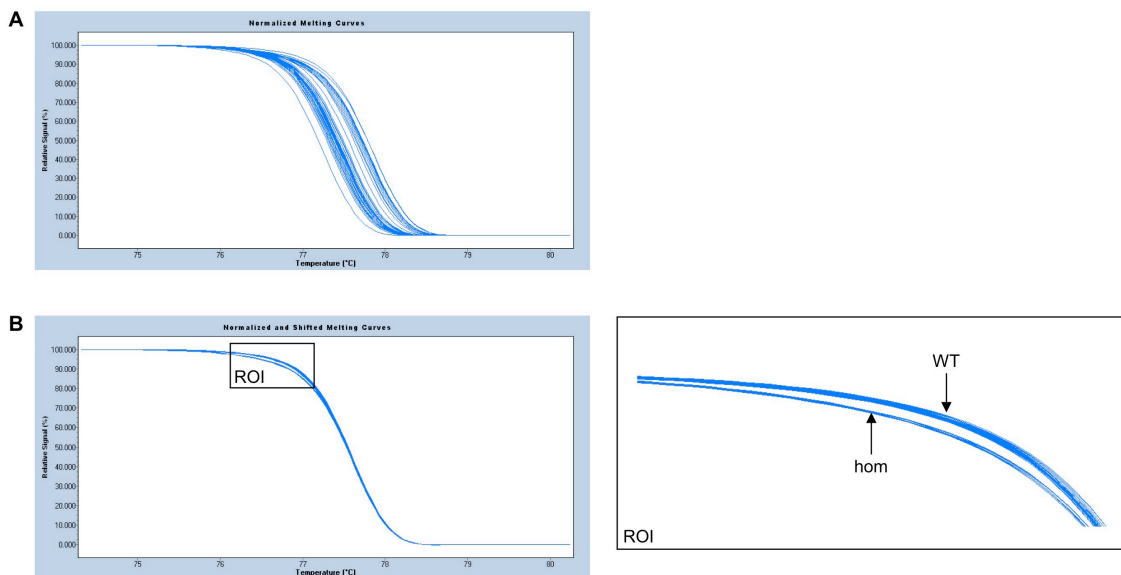


Abb. 70: ESR1 Gen rs2347867 DNA Platte A Schmelzkurven

A: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen

B: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven nach der Temperaturverlagerung der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen (hier: eindeutige Zuordnung der DNA Proben in die Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen möglich)

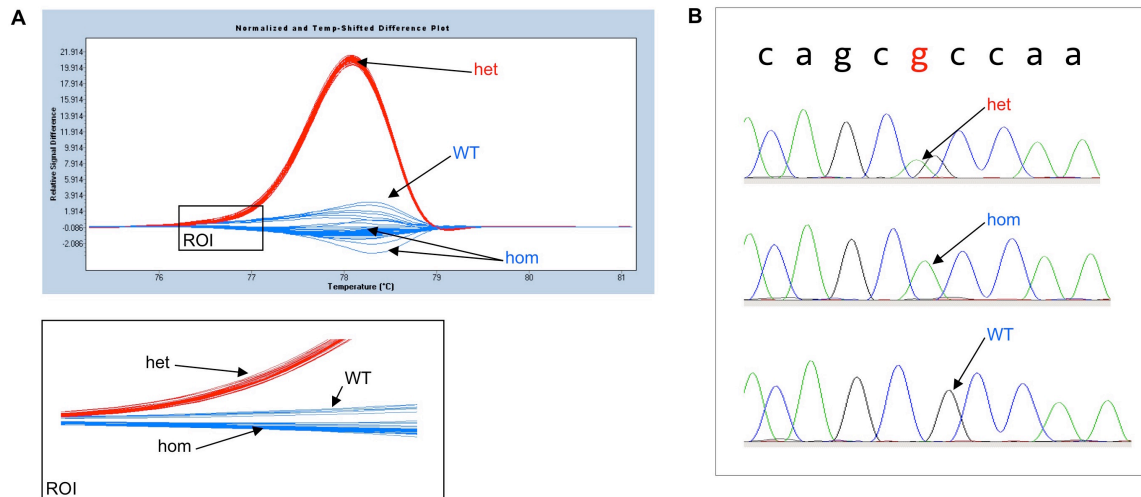


Abb. 71: ESR1 Gen rs2347867 DNA Platte B Differenzplot und Basensequenz

A: Differenzplot mit heterozygoten Mutanten (→ rot), homozygoten Mutanten (→blau) und homozygoten Wildtypen (→blau); als Referenzkurve dient hier die DNA Probe einer homozygoten Mutante

B: Ausschnitt der Basensequenz dreier DNA Proben aus den jeweiligen Gruppen heterozygote Mutanten, homozygote Mutanten, und homozygote Wildtypen nach Sequenzierung, (t=Thymin, a=Adenin, g=Guanin, c=Cytosin), der entscheidende SNP ist rot markiert

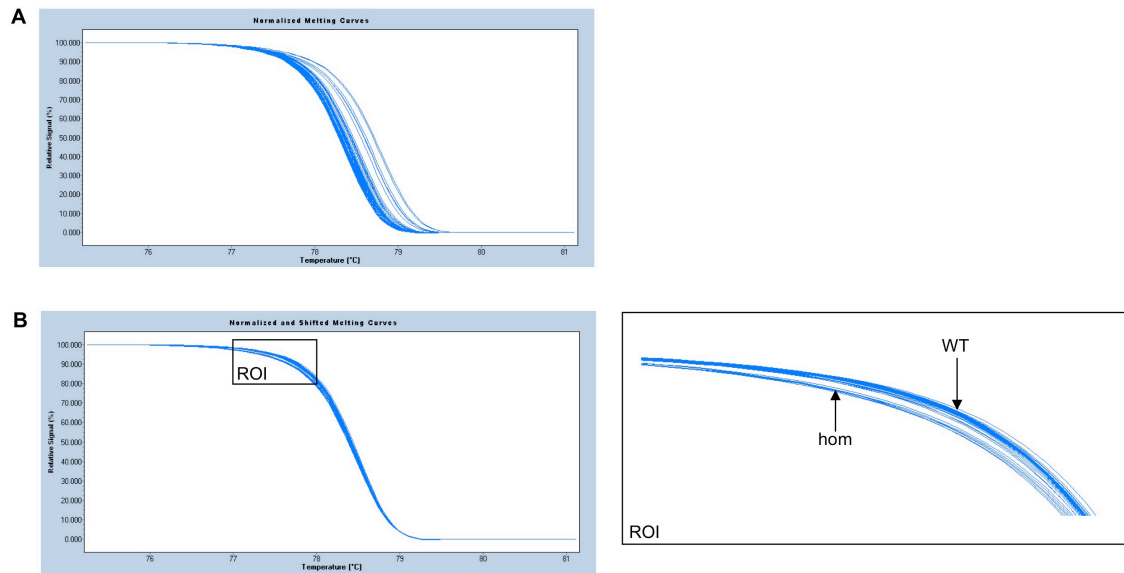


Abb. 72: ESR1 Gen rs2347867 DNA Platte B Schmelzkurven

A: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen

B: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven nach der Temperaturverlagerung der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen (hier: eindeutige Zuordnung der DNA Proben in die Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen möglich)

6.2.3 Zellzyklus

– CDK4 Gen: rs2069502

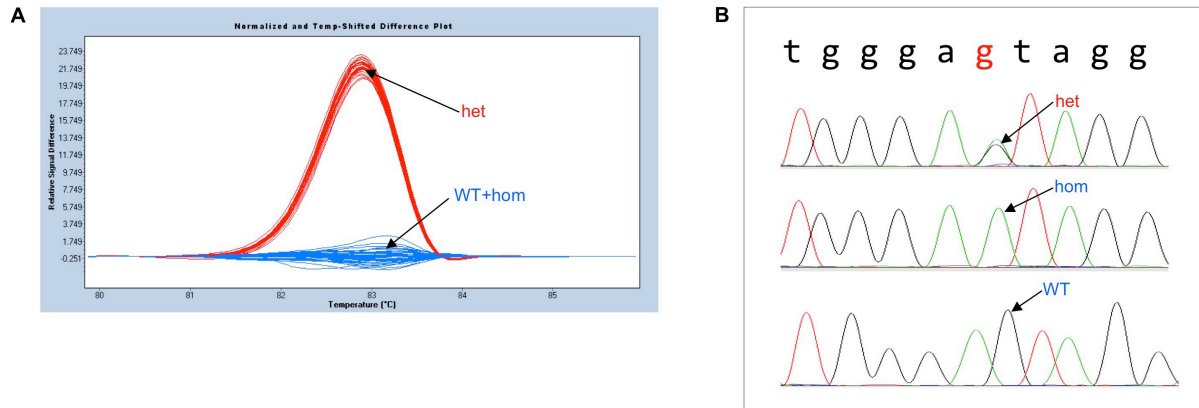


Abb. 73: CDK4 Gen rs2069502 DNA Platte A Differenzplot und Basensequenz

A: Differenzplot mit heterozygoten Mutanten (→ rot), homozygoten Mutanten (→blau) und homozygoten Wildtypen (→blau); als Referenzkurve dient hier die DNA Probe einer homozygoten Mutante

B: Ausschnitt der Basensequenz dreier DNA Proben aus den jeweiligen Gruppen heterozygote Mutanten, homozygote Mutanten, und homozygote Wildtypen nach Sequenzierung, (t=Thymin, a=Adenin, g=Guanin, c=Cytosin), der entscheidende SNP ist rot markiert

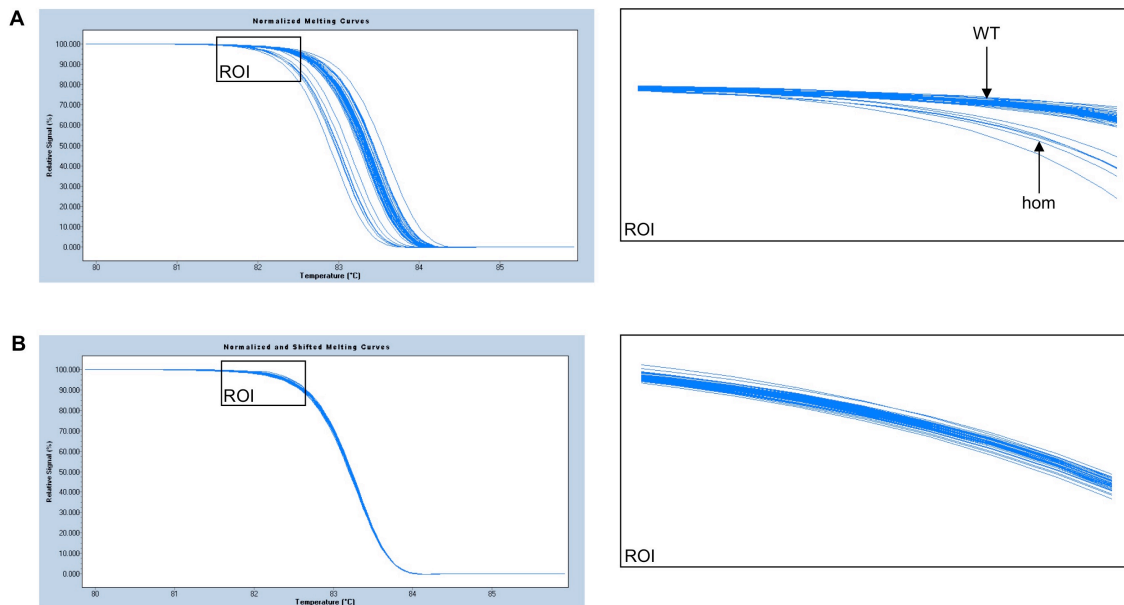


Abb. 74: CDK4 Gen rs2069502 DNA Platte A Schmelzkurven

A: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen (hier: eindeutige Zuordnung der DNA Proben in die Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen möglich)

B: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven nach der Temperaturverlagerung der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen (hier: keine eindeutige Zuordnung der DNA Proben in die Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen möglich)

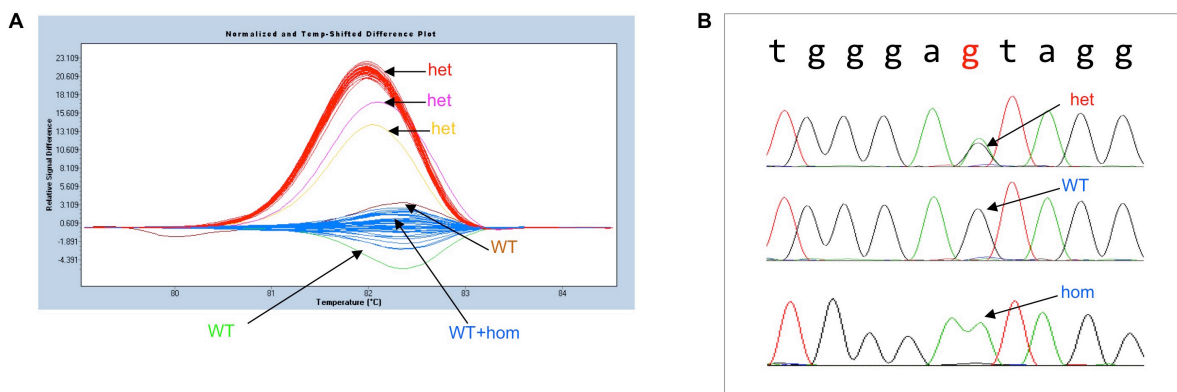


Abb. 75: CDK4 Gen rs2069502 DNA Platte B Differenzplot und Basensequenz

A: Differenzplot mit heterozygoten Mutanten (→ rot/pink/gelb), homozygoten Mutanten (→blau) und homozygoten Wildtypen (→blau/grün/braun); als Referenzkurve dient hier die DNA Probe einer homozygoten Mutante

B: Ausschnitt der Basensequenz dreier DNA Proben aus den jeweiligen Gruppen heterozygote Mutanten, homozygote Mutanten, und homozygote Wildtypen nach Sequenzierung, (t=Thymin, a=Adenin, g=Guanin, c=Cytosin), der entscheidende SNP ist rot markiert

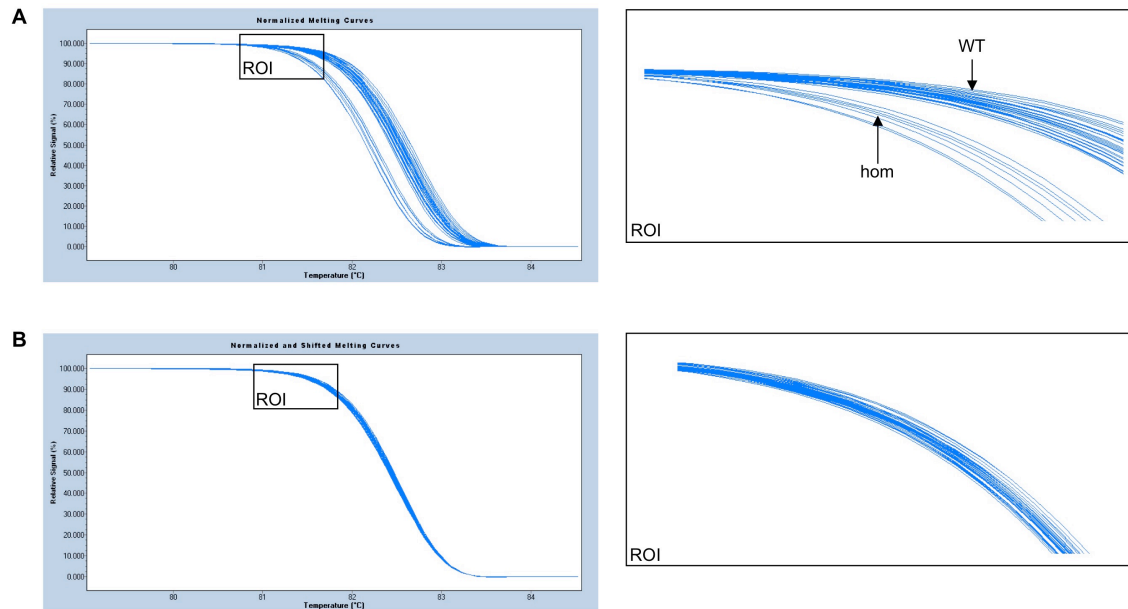


Abb. 76: CDK4 Gen rs2069502 DNA Platte B Schmelzkurven

A: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen (hier: eindeutige Zuordnung der DNA Proben in die Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen möglich)

B: Darstellung der normalisierten Schmelzkurven nach der Temperaturverlagerung der beiden Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen (hier: keine eindeutige Zuordnung der DNA Proben in die Gruppen homozygote Mutanten und homozygote Wildtypen möglich)

6.3 Gelbilder GHR Exon 3 Deletion - Projekt

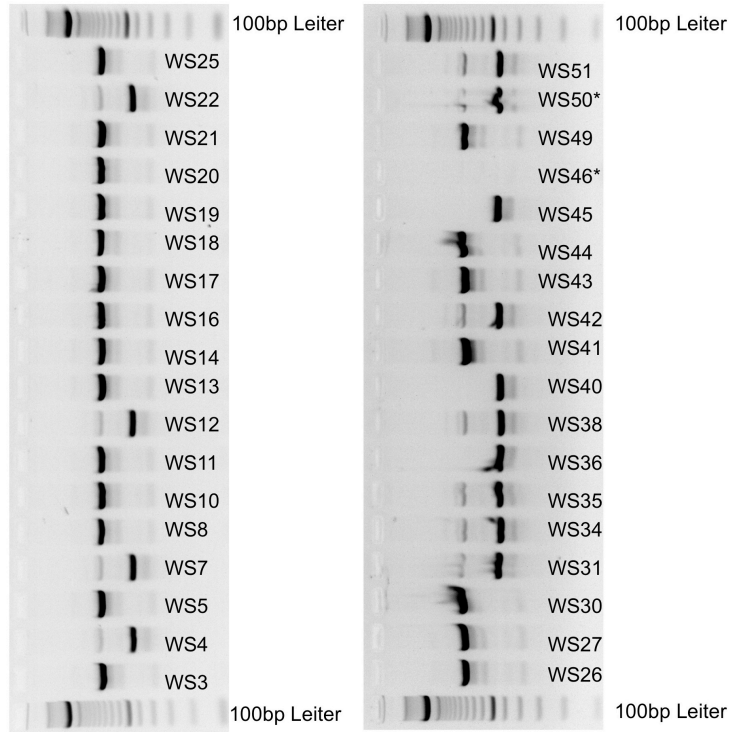


Abb. 77: 2%ige Agarosegele der DNA Proben WS3 bis WS51

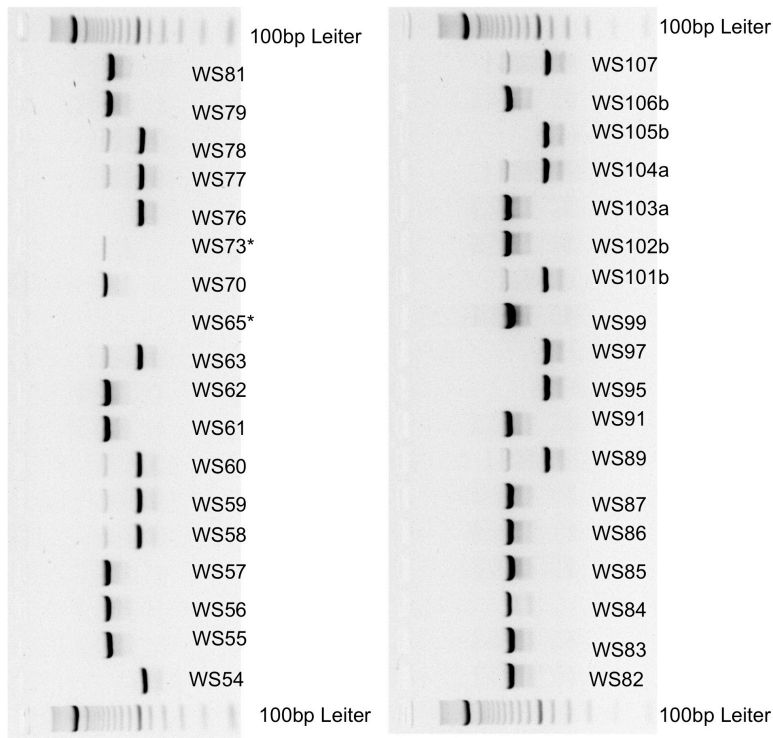


Abb. 78: 2%ige Agarosegele der DNA Proben WS54 bis WS107

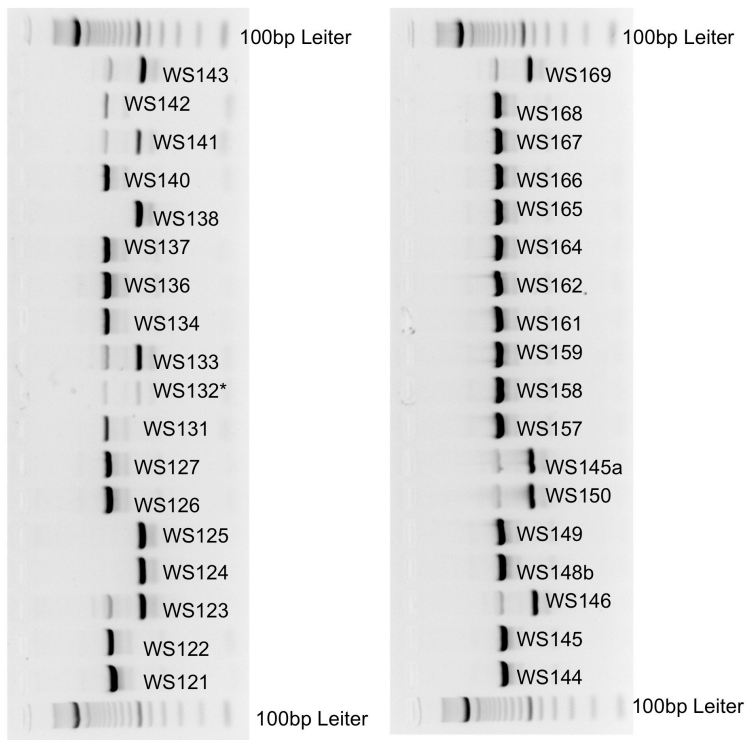


Abb. 79: 2%ige Agarosegele der DNA Proben WS121 bis WS175

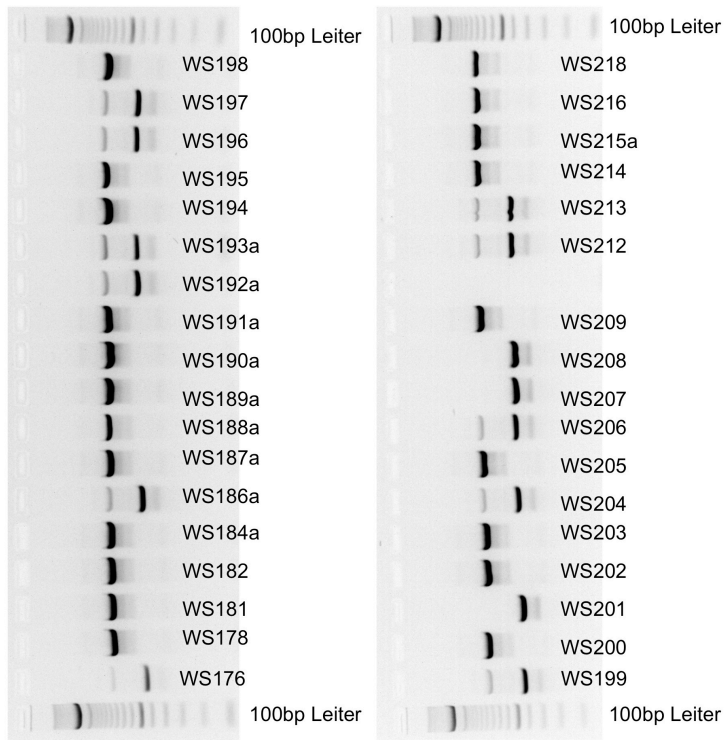


Abb. 80: 2%ige Agarosegele der DNA Proben WS176 bis WS218

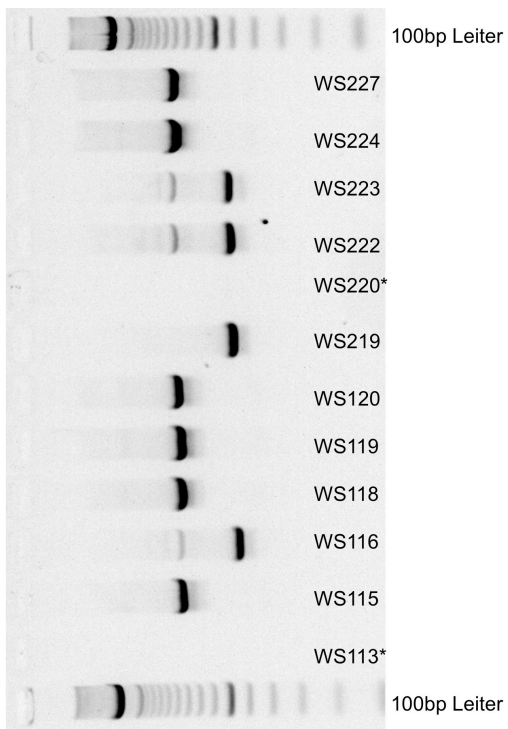


Abb. 81: 2%ige Agarosegele der DNA Proben WS113 bis WS120 bzw. DNA Proben WS219 bis WS227

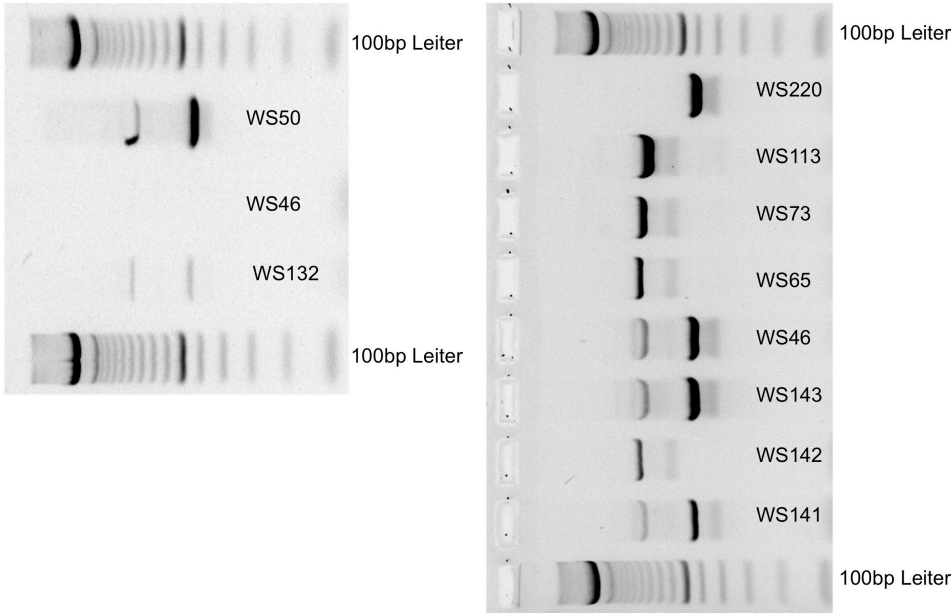


Abb. 82: 2%ige Agarosegele mit der Wiederholung der DNA Proben (*) die im ersten PCR Durchlauf keine qualitativ hochwertigen Banden lieferten

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abad V, Meyers JL, Weise M, Gafni RI, Barnes KM, Nilsson O, Bacher JD, Baron J (2002) *The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis*. *Endocrinology* 5: 1851-7
2. Albertsson-Wikland K, Westphal O, Westgren U (1986) *Daily subcutaneous administration of human growth hormone in growth hormone deficient children*. *Acta Paediatr Scand* 1: 89-97
3. Albertsson-Wikland K (1987) *The effect of human growth hormone injection frequency on linear growth rate*. *Acta Paediatr Scand Suppl* 110-6
4. Anderson HC (2003) *Matrix vesicles and calcification*. *Curr Rheumatol Rep* 3: 222-6
5. Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, Tonai T, Nishisho T, Mori S, Takeda E (1997) *A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women*. *J Bone Miner Res* 6: 915-21
6. Bang P, Bjerknes R, Dahlgren J, Dunkel L, Gustafsson J, Juul A, Kristrom B, Tapanainen P, Aberg V (2011) *A comparison of different definitions of growth response in short prepubertal children treated with growth hormone*. *Horm Res Paediatr* 5: 335-45
7. Baxter RC (2000) *Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities*. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 6: E967-76
8. Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, Hoth M, Kurtz A, Leipziger J, Müller F, Pedain C, Rettig J, Wagner C, Wischmeyer E, Bob A, Bob K, (eds) (2009) *Duale Reihe: Physiologie*. 1st ed. Thieme, Stuttgart
9. Binder G, Bosk A, Gass M, Ranke MB, Heidemann PH (2004) *Insulin tolerance test causes hypokalaemia and can provoke cardiac arrhythmias*. *Horm Res* 2: 84-7
10. Binder G, Braemswig J, Kratzsch J, Pfaeffle R, Woelfle J (2008) *AWMF (Reg.-Nr. 174-002) S2e-Leitlinie: Wachstumshormonmangel im Kindes- und Jugendalter, Diagnostik*. <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/174-002.html>
11. Blethen SL, Baptista J, Kuntze J, Foley T, LaFranchi S, Johanson A (1997) *Adult height in growth hormone (GH)-deficient children treated with biosynthetic GH. The Genentech Growth Study Group*. *J Clin Endocrinol Metab* 2: 418-20
12. Blum HE, Siegenthaler W, (eds) (2006) *Klinische Pathophysiologie*. 9th ed. Thieme, Stuttgart
13. Blum WF, Jenne EW, Reppin F, Kietzmann K, Ranke MB, Bierich JR (1989) *Insulin-like growth factor I (IGF-I)-binding protein complex is a better mitogen than free IGF-I*. *Endocrinology* 2: 766-72
14. Blum WF, Machinis K, Shavrikova EP, Keller A, Stobbe H, Pfaeffle RW, Amselem S (2006) *The growth response to growth hormone (GH) treatment in children with isolated GH deficiency is independent of the presence of the exon 3-minus isoform of the GH receptor*. *J Clin Endocrinol Metab* 10: 4171-4

15. Boyan BD, Schwartz Z, Carnes DL, Jr., Ramirez V (1988) *The effects of vitamin D metabolites on the plasma and matrix vesicle membranes of growth and resting cartilage cells in vitro*. *Endocrinology* 6: 2851-60
16. Buzi F, Mella P, Pilotta A, Prandi E, Lanfranchi F, Carapella T (2007) *Growth hormone receptor polymorphisms*. *Endocr Dev* 28-35
17. Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J, Korach KS, Simpson ER (1997) *Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency*. *N Engl J Med* 2: 91-5
18. Cardoso DF, Martinelli CE, Jr., Campos VC, Gomes ES, Rocha IE, Oliveira CR, Vicente TA, Pereira RM, Pereira FA, Cartaxo CK, Milani SL, Oliveira MC, Melo EV, Oliveira AL, Aguiar-Oliveira MH (2014) *Comparison between the growth response to growth hormone (GH) therapy in children with partial GH insensitivity or mild GH deficiency*. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 1: 23-9
19. Carel JC, Ecosse E, Nicolino M, Tauber M, Leger J, Cabrol S, Bastie-Sigeac I, Chaussain JL, Coste J (2002) *Adult height after long term treatment with recombinant growth hormone for idiopathic isolated growth hormone deficiency: observational follow up study of the French population based registry*. *BMJ* 7355: 70
20. Carel JC, Butler G (2010) *Safety of recombinant human growth hormone*. *Endocr Dev* 40-54
21. Carel JC, Ecosse E, Landier F, Meguellati-Hakkas D, Kaguelidou F, Rey G, Coste J (2012) *Long-term mortality after recombinant growth hormone treatment for isolated growth hormone deficiency or childhood short stature: preliminary report of the French SAGhE study*. *J Clin Endocrinol Metab* 2: 416-25
22. Carlberg C, Polly P (1998) *Gene regulation by vitamin D3*. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1: 19-42
23. Charalambous M, Smith FM, Bennett WR, Crew TE, Mackenzie F, Ward A (2003) *Disruption of the imprinted Grb10 gene leads to disproportionate overgrowth by an Igf2-independent mechanism*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 14: 8292-7
24. Clayton P, Chatelain P, Tato L, Yoo HW, Ambler GR, Belgorosky A, Quinteiro S, Deal C, Stevens A, Raelson J, Croteau P, Destenaves B, Olivier C (2013) *A pharmacogenomic approach to the treatment of children with GH deficiency or Turner syndrome*. *Eur J Endocrinol* 3: 277-89
25. Cohen P, Rogol AD, Howard CP, Bright GM, Kappelgaard AM, Rosenfeld RG, American Norditropin Study G (2007) *Insulin growth factor-based dosing of growth hormone therapy in children: a randomized, controlled study*. *J Clin Endocrinol Metab* 7: 2480-6
26. Cohen P, Germak J, Rogol AD, Weng W, Kappelgaard AM, Rosenfeld RG, American Norditropin Study G (2010) *Variable degree of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) sensitivity in children with idiopathic short stature compared with GH-deficient patients: evidence from an IGF-based dosing study of short children*. *J Clin Endocrinol Metab* 5: 2089-98
27. Conover CA, Powell DR (1991) *Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 blocks IGF-I-induced receptor down-regulation and cell desensitization in cultured bovine fibroblasts*. *Endocrinology* 2: 710-6
28. Conover CA, Bale LK, Durham SK, Powell DR (2000) *Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 potentiation of IGF action is mediated through the*

- phosphatidylinositol-3-kinase pathway and is associated with alteration in protein kinase B/AKT sensitivity. Endocrinology 9: 3098-103*
29. Corazzini V, Salvatori R (2013) *Molecular and clinical aspects of GHRH receptor mutations. Endocr Dev 106-17*
 30. Costalonga EF, Antonini SR, Guerra-Junior G, Mendonca BB, Arnhold IJ, Jorge AA (2009) *The -202 A allele of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP3) promoter polymorphism is associated with higher IGFBP-3 serum levels and better growth response to growth hormone treatment in patients with severe growth hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2: 588-95*
 31. Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL (2003) *The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. Neuron 4: 649-61*
 32. Cutfield WS, Wilton P, Bennmarker H, Albertsson-Wikland K, Chatelain P, Ranke MB, Price DA (2000) *Incidence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in children and adolescents receiving growth-hormone treatment. Lancet 9204: 610-3*
 33. D'Aloisio AA, Schroeder JC, North KE, Poole C, West SL, Travlos GS, Baird DD (2009) *IGF-I and IGFBP-3 polymorphisms in relation to circulating levels among African American and Caucasian women. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 3: 954-66*
 34. Dahlgren A, Lundmark P, Axelsson T, Lind L, Syvanen AC (2008) *Association of the estrogen receptor 1 (ESR1) gene with body height in adult males from two Swedish population cohorts. PLoS One 3: e1807*
 35. Dall R, Kanaley J, Hansen TK, Moller N, Christiansen JS, Hosoda H, Kangawa K, Jorgensen JO (2002) *Plasma ghrelin levels during exercise in healthy subjects and in growth hormone-deficient patients. Eur J Endocrinol 1: 65-70*
 36. Darendeliler F, Karagiannis G, Wilton P (2007) *Headache, idiopathic intracranial hypertension and slipped capital femoral epiphysis during growth hormone treatment: a safety update from the KIGS database. Horm Res 41-7*
 37. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M (2000) *Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. Endocrinology 11: 4255-61*
 38. de Ridder MA, Stijnen T, Hokken-Koelega AC (2007) *Prediction of adult height in growth-hormone-treated children with growth hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab 3: 925-31*
 39. Deal C, Ma J, Wilkin F, Paquette J, Rozen F, Ge B, Hudson T, Stampfer M, Pollak M (2001) *Novel promoter polymorphism in insulin-like growth factor-binding protein-3: correlation with serum levels and interaction with known regulators. J Clin Endocrinol Metab 3: 1274-80*
 40. Dean DD, Boyan BD, Muniz OE, Howell DS, Schwartz Z (1996) *Vitamin D metabolites regulate matrix vesicle metalloproteinase content in a cell maturation-dependent manner. Calcif Tissue Int 2: 109-16*

41. Dempfle A, Wudy SA, Saar K, Hagemann S, Friedel S, Scherag A, Berthold LD, Alzen G, Gortner L, Blum WF, Hinney A, Nurnberg P, Schafer H, Hebebrand J (2006) *Evidence for involvement of the vitamin D receptor gene in idiopathic short stature via a genome-wide linkage study and subsequent association studies.* Hum Mol Genet 18: 2772-83
42. Desai MP, Upadhye PS, Kamijo T, Yamamoto M, Ogawa M, Hayashi Y, Seo H, Nair SR (2005) *Growth hormone releasing hormone receptor (GHRH-r) gene mutation in Indian children with familial isolated growth hormone deficiency: a study from western India.* J Pediatr Endocrinol Metab 10: 955-73
43. Dos Santos C, Essioux L, Teinturier C, Tauber M, Goffin V, Bougneres P (2004) *A common polymorphism of the growth hormone receptor is associated with increased responsiveness to growth hormone.* Nat Genet 7: 720-4
44. Eden Engstrom B, Burman P, Holdstock C, Karlsson FA (2003) *Effects of growth hormone (GH) on ghrelin, leptin, and adiponectin in GH-deficient patients.* J Clin Endocrinol Metab 11: 5193-8
45. Ergun-Longmire B, Mertens AC, Mitby P, Qin J, Heller G, Shi W, Yasui Y, Robison LL, Sklar CA (2006) *Growth hormone treatment and risk of second neoplasms in the childhood cancer survivor.* J Clin Endocrinol Metab 9: 3494-8
46. Frasier SD, Costin G, Lippe BM, Aceto T, Jr., Bunker PF (1981) *A dose-response curve for human growth hormone.* J Clin Endocrinol Metab 6: 1213-7
47. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch AM, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin MR, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJ, Barroso I, Wareham NJ, Karpe F, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CN, Doney AS, Morris AD, Smith GD, Hattersley AT, McCarthy MI (2007) *A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity.* Science 5826: 889-94
48. Garabedian M, Du Bois MB, Corvol MT, Pezant E, Balsan S (1978) *Vitamin D and cartilage. I. In vitro metabolism of 25-hydroxycholecalciferol by cartilage.* Endocrinology 4: 1262-8
49. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N (1999) *VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation.* Nat Med 6: 623-8
50. Gordon K (1997) *Pediatric pseudotumor cerebri: descriptive epidemiology.* Can J Neurol Sci 3: 219-21
51. Greulich WW, Pyle SI (1959) *Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist.* Stanford University Press 3: 393
52. Growth Hormone Research Society (2000) *Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH Research Society.* GH Research Society. J Clin Endocrinol Metab 11: 3990-3
53. Gueorguiev M, Lecoeur C, Benzinou M, Mein CA, Meyre D, Vatin V, Weill J, Heude B, Grossman AB, Froguel P, Korbonits M (2009) *A genetic study of the ghrelin and growth hormone secretagogue receptor (GHSR) genes and stature.* Ann Hum Genet 1: 1-9

54. Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, Rosner B, Speizer FE, Pollak M (1998) *Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer*. Lancet 9113: 1393-6
55. Harrela M, Koistinen H, Kaprio J, Lehtovirta M, Tuomilehto J, Eriksson J, Toivanen L, Koskenvuo M, Leinonen P, Koistinen R, Seppala M (1996) *Genetic and environmental components of interindividual variation in circulating levels of IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, and IGFBP-3*. J Clin Invest 11: 2612-5
56. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW (1998) *The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed*. J Bone Miner Res 3: 325-49
57. Hiort O, Danne T, Wabitsch M, (eds) (2010) *Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie*. 1st ed. Springer, Berlin Heidelberg New York
58. Hirschhorn JN, Lindgren CM, Daly MJ, Kirby A, Schaffner SF, Burt NP, Altshuler D, Parker A, Rioux JD, Platko J, Gaudet D, Hudson TJ, Groop LC, Lander ES (2001) *Genomewide linkage analysis of stature in multiple populations reveals several regions with evidence of linkage to adult height*. Am J Hum Genet 1: 106-16
59. Hirschhorn JN, Daly MJ (2005) *Genome-wide association studies for common diseases and complex traits*. Nat Rev Genet 2: 95-108
60. Hitchins MP, Monk D, Bell GM, Ali Z, Preece MA, Stanier P, Moore GE (2001) *Maternal repression of the human GRB10 gene in the developing central nervous system; evaluation of the role for GRB10 in Silver-Russell syndrome*. Eur J Hum Genet 2: 82-90
61. Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, Ankersen M, Schwartz TW (2003) *High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist*. Mol Endocrinol 11: 2201-10
62. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH (1996) *A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release*. Science 5277: 974-7
63. Hwa V, Fang P, Derr MA, Fiegerlova E, Rosenfeld RG (2013) *IGF-I in human growth: lessons from defects in the GH-IGF-I axis*. Nestle Nutr Inst Workshop Ser 43-55
64. Isaksson OG, Jansson JO, Gause IA (1982) *Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly*. Science 4551: 1237-9
65. Johansson A, Jonasson I, Gyllenstein U (2009) *Extended haplotypes in the growth hormone releasing hormone receptor gene (GHRHR) are associated with normal variation in height*. PLoS One 2: e4464
66. Jorge AA, Marchisotti FG, Montenegro LR, Carvalho LR, Mendonca BB, Arnhold IJ (2006) *Growth hormone (GH) pharmacogenetics: influence of GH receptor exon 3 retention or deletion on first-year growth response and final height in patients with severe GH deficiency*. J Clin Endocrinol Metab 3: 1076-80
67. Juul A (2001) *The effects of oestrogens on linear bone growth*. Hum Reprod Update 3: 303-13

68. Kapoor RR, Burke SA, Sparrow SE, Hughes IA, Dunger DB, Ong KK, Acerini CL (2008) *Monitoring of concordance in growth hormone therapy*. Arch Dis Child 2: 147-8
69. Karlberg J (1989) *A biologically-oriented mathematical model (ICP) for human growth*. Acta Paediatr Scand Suppl 70-94
70. Kaspers S, Ranke MB, Han D, Loftus J, Wollmann H, Lindberg A, Roelants M, Kleintjens J (2013) *Implications of a data-driven approach to treatment with growth hormone in children with growth hormone deficiency and Turner syndrome*. Appl Health Econ Health Policy 3: 237-49
71. Kastrup KW, Christiansen JS, Andersen JK, Orskov H (1983) *Increased growth rate following transfer to daily sc administration from three weekly im injections of hGH in growth hormone deficient children*. Acta Endocrinol (Copenh) 2: 148-52
72. Kelly PA, Goujon L, Sotiropoulos A, Dinerstein H, Esposito N, Edery M, Finidori J, Postel-Vinay MC (1994) *The GH receptor and signal transduction*. Horm Res 4-5: 133-9
73. Khosla S (2002) *Oestrogen, bones and men: when testosterone just isn't enough*. Clin Endocrinol (Oxf) 3: 291-3
74. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999) *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach*. Nature 6762: 656-60
75. Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, Jordan S, Adams EF, Lowe DG, Kangawa K, Grossman AB (2001) *The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors*. J Clin Endocrinol Metab 2: 881-7
76. Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, Grossman AB (2004) *Ghrelin--a hormone with multiple functions*. Front Neuroendocrinol 1: 27-68
77. Kristrom B, Wikland KA (2002) *Growth prediction models, concept and use*. Horm Res 66-70
78. Kusec V, Viridi AS, Prince R, Triffitt JT (1998) *Localization of estrogen receptor-alpha in human and rabbit skeletal tissues*. J Clin Endocrinol Metab 7: 2421-8
79. LaFranchi SH, Lippe BM, Kaplan SA (1977) *Hypoglycemia during testing for growth hormone deficiency*. J Pediatr 2: 244-5
80. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE,

- Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ, International Human Genome Sequencing C (2001) *Initial sequencing and analysis of the human genome*. *Nature* 6822: 860-921
81. Landgren S, Jerlhag E, Hallman J, Orelund L, Lissner L, Strandhagen E, Thelle DS, Zetterberg H, Blennow K, Engel JA (2010) *Genetic variation of the ghrelin signaling system in females with severe alcohol dependence*. *Alcohol Clin Exp Res* 9: 1519-24
82. Lango Allen H, Estrada K, Lettre G, Berndt SI, Weedon MN, Rivadeneira F, Willer CJ, Jackson AU, Vedantam S, Raychaudhuri S, Ferreira T, Wood AR, Weyant RJ, Segre AV, Speliotes EK, Wheeler E, Soranzo N, Park JH, Yang J, Gudbjartsson D, Heard-Costa NL, Randall JC, Qi L, Vernon Smith A, Magi R, Pastinen T, Liang L, Heid IM, Luan J, Thorleifsson G, Winkler TW, Goddard ME, Sin Lo K, Palmer C, Workalemahu T, Aulchenko YS, Johansson A, Zillikens MC, Feitosa MF, Esko T, Johnson T, Ketkar S, Kraft P, Mangino M, Prokopenko I, Absher D, Albrecht E, Ernst F, Glazer NL, Hayward C, Hottenga JJ, Jacobs KB, Knowles JW, Kutalik Z, Monda KL, Polasek O, Preuss M, Rayner NW, Robertson NR, Steinthorsdottir V, Tyrer JP, Voight BF, Wiklund F, Xu J, Zhao JH, Nyholt DR, Pellikka N, Perola M, Perry JR, Surakka I, Tammesoo ML, Altmaier EL, Amin N, Aspelund T, Bhangale T, Boucher G, Chasman DI, Chen C, Coin L, Cooper MN, Dixon AL, Gibson Q, Grundberg E, Hao K, Juhani Juntila M, Kaplan LM, Kettunen J, Konig IR, Kwan T, Lawrence RW, Levinson DF, Lorentzon M, McKnight B, Morris AP, Muller M, Suh Ngwa J, Purcell S, Rafelt S, Salem RM, Salvi E, Sanna S, Shi J, Sovio U, Thompson JR, Turchin MC, Vandenput L, Verlaan DJ, Vitart V, White CC, Ziegler A, Almgren P, Balmforth AJ, Campbell H, Citterio L, De Grandi A, Dominiczak A, Duan J, Elliott P, Elosua R, Eriksson JG, Freimer NB, Geus EJ, Glorioso N, Haiqing S, Hartikainen AL, Havulinna AS, Hicks AA, Hui J, Igl W, Illig T, Jula A,

- Kajantie E, Kilpelainen TO, Koiranen M, Kolcic I, Koskinen S, Kovacs P, Laitinen J, Liu J, Lokki ML, Marusic A, Maschio A, Meitinger T, Mulas A, Pare G, Parker AN, Peden JF, Petersmann A, Pichler I, Pietilainen KH, Pouta A, Ridderstrale M, Rotter JI, Sambrook JG, Sanders AR, Schmidt CO, Sinisalo J, Smit JH, Stringham HM, Bragi Walters G, Widen E, Wild SH, Willemsen G, Zagato L, Zgaga L, Zitting P, Alavere H, Farrall M, McArdle WL, Nelis M, Peters MJ, Ripatti S, van Meurs JB, Aben KK, Ardlie KG, Beckmann JS, Beilby JP, Bergman RN, Bergmann S, Collins FS, Cusi D, den Heijer M, Eiriksdottir G, Gejman PV, Hall AS, Hamsten A, Huikuri HV, Iribarren C, Kahonen M, Kaprio J, Kathiresan S, Kiemenev L, Kocher T, Launer LJ, Lehtimäki T, Melander O, Mosley TH, Jr., Musk AW, Nieminen MS, O'Donnell CJ, Ohlsson C, Oostra B, Palmer LJ, Raitakari O, Ridker PM, Rioux JD, Rissanen A, Rivolta C, Schunkert H, Shuldiner AR, Siscovick DS, Stumvoll M, Tonjes A, Tuomilehto J, van Ommen GJ, Viikari J, Heath AC, Martin NG, Montgomery GW, Province MA, Kayser M, Arnold AM, Atwood LD, Boerwinkle E, Chanock SJ, Deloukas P, Gieger C, Gronberg H, Hall P, Hattersley AT, Hengstenberg C, Hoffman W, Lathrop GM, Salomaa V, Schreiber S, Uda M, Waterworth D, Wright AF, Assimes TL, Barroso I, Hofman A, Mohlke KL, Boomsma DI, Caulfield MJ, Cupples LA, Erdmann J, Fox CS, Gudnason V, Gyllenstein U, Harris TB, Hayes RB, Jarvelin MR, Mooser V, Munroe PB, Ouwehand WH, Penninx BW, Pramstaller PP, Quertermous T, Rudan I, Samani NJ, Spector TD, Volzke H, Watkins H, Wilson JF, Groop LC, Haritunians T, Hu FB, Kaplan RC, Metspalu A, North KE, Schlessinger D, Wareham NJ, Hunter DJ, O'Connell JR, Strachan DP, Wichmann HE, Borecki IB, van Duijn CM, Schadt EE, Thorsteinsdottir U, Peltonen L, Uitterlinden AG, Visscher PM, Chatterjee N, Loos RJ, Boehnke M, McCarthy MI, Ingelsson E, Lindgren CM, Abecasis GR, Stefansson K, Frayling TM, Hirschhorn JN (2010) *Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height*. *Nature* 7317: 832-8
83. Langston GG, Swain LD, Schwartz Z, Del Toro F, Gomez R, Boyan BD (1990) *Effect of 1,25(OH)2D3 and 24,25(OH)2D3 on calcium ion fluxes in costochondral chondrocyte cultures*. *Calcif Tissue Int* 4: 230-6
84. Lanktree MB, Guo Y, Murtaza M, Glessner JT, Bailey SD, Onland-Moret NC, Lettre G, Ongen H, Rajagopalan R, Johnson T, Shen H, Nelson CP, Klopp N, Baumert J, Padmanabhan S, Pankratz N, Pankow JS, Shah S, Taylor K, Barnard J, Peters BJ, Maloney CM, Lobbmeyer MT, Stanton A, Zafarmand MH, Romaine SP, Mehta A, van Iperen EP, Gong Y, Price TS, Smith EN, Kim CE, Li YR, Asselbergs FW, Atwood LD, Bailey KM, Bhatt D, Bauer F, Behr ER, Bhangale T, Boer JM, Boehm BO, Bradfield JP, Brown M, Braund PS, Burton PR, Carty C, Chandrupatla HR, Chen W, Connell J, Dalgeorgou C, Boer A, Drenos F, Elbers CC, Fang JC, Fox CS, Frackelton EC, Fuchs B, Furlong CE, Gibson Q, Gieger C, Goel A, Grobbee DE, Hastie C, Howard PJ, Huang GH, Johnson WC, Li Q, Kleber ME, Klein BE, Klein R, Kooperberg C, Ky B, Lacroix A, Lanken P, Lathrop M, Li M, Marshall V, Melander O, Mentch FD, Meyer NJ, Monda KL, Montpetit A, Murugesan G, Nakayama K, Nondahl D, Onipinla A, Rafelt S, Newhouse SJ, Otieno FG, Patel SR, Putt ME, Rodriguez S, Safa RN, Sawyer DB, Schreiner PJ, Simpson C, Sivapalaratnam S, Srinivasan SR, Suver C, Swergold G, Sweitzer NK, Thomas KA, Thorand B, Timpson NJ, Tischfield S, Tobin M, Tomaszewski M,

- Verschuren WM, Wallace C, Winkelmann B, Zhang H, Zheng D, Zhang L, Zmuda JM, Clarke R, Balmforth AJ, Danesh J, Day IN, Schork NJ, de Bakker PI, Delles C, Duggan D, Hingorani AD, Hirschhorn JN, Hofker MH, Humphries SE, Kivimaki M, Lawlor DA, Kottke-Marchant K, Mega JL, Mitchell BD, Morrow DA, Palmen J, Redline S, Shields DC, Shuldiner AR, Sleiman PM, Smith GD, Farrall M, Jamshidi Y, Christiani DC, Casas JP, Hall AS, Doevendans PA, Christie JD, Berenson GS, Murray SS, Illig T, Dorn GW, 2nd, Cappola TP, Boerwinkle E, Sever P, Rader DJ, Reilly MP, Caulfield M, Talmud PJ, Topol E, Engert JC, Wang K, Dominiczak A, Hamsten A, Curtis SP, Silverstein RL, Lange LA, Sabatine MS, Trip M, Saleheen D, Peden JF, Cruickshanks KJ, Marz W, O'Connell JR, Klungel OH, Wijmenga C, Maitland-van der Zee AH, Schadt EE, Johnson JA, Jarvik GP, Papanicolaou GJ, Hugh Watkins on behalf of P, Grant SF, Munroe PB, North KE, Samani NJ, Koenig W, Gaunt TR, Anand SS, van der Schouw YT, Meena Kumari on behalf of the Whitehall IIS, the WKG, Soranzo N, Fitzgerald GA, Reiner A, Hegele RA, Hakonarson H, Keating BJ (2011) *Meta-analysis of Dense Genecentric Association Studies Reveals Common and Uncommon Variants Associated with Height*. *Am J Hum Genet* 1: 6-18
85. Laviola L, Giorgino F, Chow JC, Baquero JA, Hansen H, Ooi J, Zhu J, Riedel H, Smith RJ (1997) *The adapter protein Grb10 associates preferentially with the insulin receptor as compared with the IGF-I receptor in mouse fibroblasts*. *J Clin Invest* 5: 830-7
86. Lee JM, Davis MM, Clark SJ, Hofer TP, Kemper AR (2006) *Estimated cost-effectiveness of growth hormone therapy for idiopathic short stature*. *Arch Pediatr Adolesc Med* 3: 263-9
87. Lee KW, Cohen P (2003) *Individualized growth hormone therapy in children: advances beyond weight-based dosing*. *J Pediatr Endocrinol Metab* 625-30
88. Lehmann CL, Arons RR, Loder RT, Vitale MG (2006) *The epidemiology of slipped capital femoral epiphysis: an update*. *J Pediatr Orthop* 3: 286-90
89. Lettre G, Jackson AU, Gieger C, Schumacher FR, Berndt SI, Sanna S, Eyheramendy S, Voight BF, Butler JL, Guiducci C, Illig T, Hackett R, Heid IM, Jacobs KB, Lyssenko V, Uda M, Diabetes Genetics I, Fusion, Kora, Prostate LC, Ovarian Cancer Screening T, Nurses' Health S, SardiNia, Boehnke M, Chanock SJ, Groop LC, Hu FB, Isomaa B, Kraft P, Peltonen L, Salomaa V, Schlessinger D, Hunter DJ, Hayes RB, Abecasis GR, Wichmann HE, Mohlke KL, Hirschhorn JN (2008) *Identification of ten loci associated with height highlights new biological pathways in human growth*. *Nat Genet* 5: 584-91
90. Liu F, Roth RA (1995) *Grb-IR: a SH2-domain-containing protein that binds to the insulin receptor and inhibits its function*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 22: 10287-91
91. Löffler G, Pertrides PE, Heinrich PC, (eds) (2006) *Biochemie und Pathobiochemie*. 8th ed. Springer, Berlin Heidelberg New York
92. Lui JC, Nilsson O, Chan Y, Palmer CD, Andrade AC, Hirschhorn JN, Baron J (2012) *Synthesizing genome-wide association studies and expression microarray reveals novel genes that act in the human growth plate to modulate height*. *Hum Mol Genet* 23: 5193-201
93. Ma J, Pollak MN, Giovannucci E, Chan JM, Tao Y, Hennekens CH, Stampfer MJ (1999) *Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of*

- insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3.* J Natl Cancer Inst 7: 620-5
94. Marin G, Domene HM, Barnes KM, Blackwell BJ, Cassorla FG, Cutler GB, Jr. (1994) *The effects of estrogen priming and puberty on the growth hormone response to standardized treadmill exercise and arginine-insulin in normal girls and boys.* J Clin Endocrinol Metab 2: 537-41
 95. Mathieu C, Adorini L (2002) *The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) analogs as immunomodulatory agents.* Trends Mol Med 4: 174-9
 96. Mayatepek E, (ed) (2007) *Pädiatrie.* Urban & Fischer, München Jena
 97. Minamitani K, Takahashi Y, Minagawa M, Yasuda T, Niimi H (1998) *Difference in height associated with a translation start site polymorphism in the vitamin D receptor gene.* Pediatr Res 5: 628-32
 98. Minelli C, Thompson JR, Abrams KR, Lambert PC (2005) *Bayesian implementation of a genetic model-free approach to the meta-analysis of genetic association studies.* Stat Med 24: 3845-61
 99. Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A (2002) *Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation.* Dev Cell 3: 439-49
 100. Mohan S, Baylink DJ (2002) *IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms.* J Endocrinol 1: 19-31
 101. Molina S, Paoli M, Camacho N, Arata-Bellabarba G, Lanes R (2008) *Is testosterone and estrogen priming prior to clonidine useful in the evaluation of the growth hormone status of short peripubertal children?* J Pediatr Endocrinol Metab 3: 257-66
 102. Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K (1995) *Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens.* J Clin Endocrinol Metab 12: 3689-98
 103. National Center for Biotechnology Information (1998) Single Nucleotide Polymorphism Database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>.
 104. Nejentsev S, Godfrey L, Snook H, Rance H, Nutland S, Walker NM, Lam AC, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Undlien DE, Ronningen KS, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Newport MJ, Clayton DG, Todd JA (2004) *Comparative high-resolution analysis of linkage disequilibrium and tag single nucleotide polymorphisms between populations in the vitamin D receptor gene.* Hum Mol Genet 15: 1633-9
 105. Pantel J, Machinis K, Sobrier ML, Duquesnoy P, Goossens M, Amselem S (2000) *Species-specific alternative splice mimicry at the growth hormone receptor locus revealed by the lineage of retroelements during primate evolution.* J Biol Chem 275: 18664-9
 106. Pantel J, Legendre M, Nivot S, Morisset S, Vie-Luton MP, le Bouc Y, Epelbaum J, Amselem S (2009) *Recessive isolated growth hormone deficiency and mutations in the ghrelin receptor.* J Clin Endocrinol Metab 11: 4334-41
 107. Park P, Cohen P (2004) *The role of insulin-like growth factor I monitoring in growth hormone-treated children.* Horm Res 59-65
 108. Patel L, Clayton PE (2012) *Predicting response to growth hormone treatment.* Indian J Pediatr 2: 229-37

109. Postel-Vinay MC, Finidori J (1995) *Growth hormone receptor: structure and signal transduction*. Eur J Endocrinol 6: 654-9
110. Preece MA, Tanner JM, Whitehouse RH, Cameron N (1976) *Dose dependence of growth response to human growth hormone in growth hormone deficiency*. J Clin Endocrinol Metab 3: 477-83
111. Preece MA, Pan H, Ratcliffe SG (1992) *Auxological aspects of male and female puberty*. Acta Paediatr Suppl 11-3; discussion 14
112. Raben MS (1958) *Treatment of a pituitary dwarf with human growth hormone*. J Clin Endocrinol Metab 8: 901-3
113. Ranke MB, Lindberg A, Chatelain P, Wilton P, Cutfield W, Albertsson-Wikland K, Price DA (1999) *Derivation and validation of a mathematical model for predicting the response to exogenous recombinant human growth hormone (GH) in prepubertal children with idiopathic GH deficiency*. KIGS International Board. Kabi Pharmacia International Growth Study. J Clin Endocrinol Metab 4: 1174-83
114. Ranke MB, Lindberg A, Cowell CT, Wikland KA, Reiter EO, Wilton P, Price DA, Board KI (2003) *Prediction of response to growth hormone treatment in short children born small for gestational age: analysis of data from KIGS (Pharmacia International Growth Database)*. J Clin Endocrinol Metab 1: 125-31
115. Ranke MB, Lindberg A (2009) *Predicting growth in response to growth hormone treatment*. Growth Horm IGF Res 1: 1-11
116. Ranke MB, Lindberg A, Board KI (2010) *Observed and predicted growth responses in prepubertal children with growth disorders: guidance of growth hormone treatment by empirical variables*. J Clin Endocrinol Metab 3: 1229-37
117. Ranke MB, Lindberg A, Mullis PE, Geffner ME, Tanaka T, Cutfield WS, Tauber M, Dunger D (2013) *Towards optimal treatment with growth hormone in short children and adolescents: evidence and theses*. Horm Res Paediatr 2: 51-67
118. Rassow J, Hauser K, Netzer R, Deutzmann R, (eds) (2006) *Duale Reihe: Biochemie*. 1st ed. Thieme, Stuttgart
119. Reiter EO, Price DA, Wilton P, Albertsson-Wikland K, Ranke MB (2006) *Effect of growth hormone (GH) treatment on the near-final height of 1258 patients with idiopathic GH deficiency: analysis of a large international database*. J Clin Endocrinol Metab 6: 2047-54
120. Renehan AG, Solomon M, Zwahlen M, Morjaria R, Whatmore A, Audi L, Binder G, Blum W, Bougneres P, Santos CD, Carrascosa A, Hokken-Koelega A, Jorge A, Mullis PE, Tauber M, Patel L, Clayton PE (2012) *Growth hormone receptor polymorphism and growth hormone therapy response in children: a Bayesian meta-analysis*. Am J Epidemiol 9: 867-77
121. Richmond E, Rogol AD (2010) *Current indications for growth hormone therapy for children and adolescents*. Endocr Dev 92-108
122. Riedl S, Hughes I, Harris M, Leong GM, Beilby J, Sly P, Choong CS (2012) *GH secretagogue receptor gene polymorphisms are associated with stature throughout childhood*. Eur J Endocrinol 6: 1079-85
123. Rogol AD, Cohen P, Weng W, Kappelgaard AM, Germak JA (2013) *Prepubertal children with growth hormone deficiency treated for four years with growth hormone experience dose-dependent increase in height, but not in the rate of puberty initiation*. Horm Res Paediatr 1: 28-37

124. Rosenfeld RG, Buckway C, Selva K, Pratt KL, Guevara-Aguirre J (2004) *Insulin-like growth factor (IGF) parameters and tools for efficacy: the IGF-I generation test in children*. Horm Res 37-43
125. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody MC, Linton L, Lander ES, Altshuler D, International SNPMPWG (2001) *A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms*. Nature 6822: 928-33
126. Savendahl L, Maes M, Albertsson-Wikland K, Borgstrom B, Carel JC, Henrard S, Speybroeck N, Thomas M, Zandwijken G, Hokken-Koelega A (2012) *Long-term mortality and causes of death in isolated GHD, ISS, and SGA patients treated with recombinant growth hormone during childhood in Belgium, The Netherlands, and Sweden: preliminary report of 3 countries participating in the EU SAGhE study*. J Clin Endocrinol Metab 2: E213-7
127. Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI, Chen H, Roix JJ, Kathiresan S, Hirschhorn JN, Daly MJ, Hughes TE, Groop L, Altshuler D, Almgren P, Florez JC, Meyer J, Ardlie K, Bengtsson Bostrom K, Isomaa B, Lettre G, Lindblad U, Lyon HN, Melander O, Newton-Cheh C, Nilsson P, Orho-Melander M, Rastam L, Speliotes EK, Taskinen MR, Tuomi T, Guiducci C, Berglund A, Carlson J, Gianniny L, Hackett R, Hall L, Holmkvist J, Laurila E, Sjogren M, Sterner M, Surti A, Svensson M, Svensson M, Tewhey R, Blumenstiel B, Parkin M, Defelice M, Barry R, Brodeur W, Camarata J, Chia N, Fava M, Gibbons J, Handsaker B, Healy C, Nguyen K, Gates C, Sougnez C, Gage D, Nizzari M, Gabriel SB, Chirn GW, Ma Q, Parikh H, Richardson D, Ricke D, Purcell S (2007) *Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels*. Science 5829: 1331-6
128. Schuit SC, van Meurs JB, Bergink AP, van der Klift M, Fang Y, Leusink G, Hofman A, van Leeuwen JP, Uitterlinden AG, Pols HA (2004) *Height in pre- and postmenopausal women is influenced by estrogen receptor alpha gene polymorphisms*. J Clin Endocrinol Metab 1: 303-9
129. Schwartz Z, Schlader DL, Ramirez V, Kennedy MB, Boyan BD (1989) *Effects of vitamin D metabolites on collagen production and cell proliferation of growth zone and resting zone cartilage cells in vitro*. J Bone Miner Res 2: 199-207
130. Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G, Strait J, Najjar S, Nagaraja R, Orru M, Usala G, Dei M, Lai S, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Ehret GB, Fink AA, Weder AB, Cooper RS, Galan P, Chakravarti A, Schlessinger D, Cao A, Lakatta E, Abecasis GR (2007) *Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits*. PLoS Genet 7: e115
131. Shah A, Stanhope R, Matthew D (1992) *Hazards of pharmacological tests of growth hormone secretion in childhood*. BMJ 6820: 173-4
132. Shendure J, Mitra RD, Varma C, Church GM (2004) *Advanced sequencing technologies: methods and goals*. Nat Rev Genet 5: 335-44

133. Siklar Z, Berberoglu M, Legendre M, Amselem S, Evliyaoglu O, Hacıhamdioglu B, Savas Erdeve S, Ocal G (2010) *Two siblings with isolated GH deficiency due to loss-of-function mutation in the GHRHR gene: successful treatment with growth hormone despite late admission and severe growth retardation*. J Clin Res Pediatr Endocrinol 4: 164-7
134. Sjogren K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V, LeRoith D, Tornell J, Isaksson OG, Jansson JO, Ohlsson C (1999) *Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A 12: 7088-92
135. Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS (1994) *Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man*. N Engl J Med 16: 1056-61
136. Sobrier ML, Duquesnoy P, Duriez B, Amselem S, Goossens M (1993) *Expression and binding properties of two isoforms of the human growth hormone receptor*. FEBS Lett 1-2: 16-20
137. Speckmann E-J, Hescheler J, Köhling R, (eds) (2013) *Physiologie*. 1st ed. Urban & Fischer, München Jena
138. St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP (1999) *Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation*. Genes Dev 16: 2072-86
139. Stevens A, Hanson D, Whatmore A, Destenaves B, Chatelain P, Clayton P (2013) *Human growth is associated with distinct patterns of gene expression in evolutionarily conserved networks*. BMC Genomics 547
140. Stevens A, Clayton P, Tato L, Yoo HW, Rodriguez-Arno MD, Skorodok J, Ambler GR, Zignani M, Zieschang J, Della Corte G, Destenaves B, Champigneulle A, Raelson J, Chatelain P (2014) *Pharmacogenomics of insulin-like growth factor-I generation during GH treatment in children with GH deficiency or Turner syndrome*. Pharmacogenomics J 1: 54-62
141. Suttrop N, Dietel M, Zeitz M, (eds) (2013) *Harrisons Innere Medizin*. 18th ed. Lehmanns Media, Berlin
142. Swain LD, Schwartz Z, Caulfield K, Brooks BP, Boyan BD (1993) *Nongenomic regulation of chondrocyte membrane fluidity by 1,25-(OH)2D3 and 24,25-(OH)2D3 is dependent on cell maturation*. Bone 4: 609-17
143. Tanner JM, Whitehouse RH, Hughes PC, Vince FP (1971) *Effect of human growth hormone treatment for 1 to 7 years on growth of 100 children, with growth hormone deficiency, low birthweight, inherited smallness, Turner's syndrome, and other complaints*. Arch Dis Child 250: 745-82
144. Tanner JM, Whitehouse RH, Marshall WA, Hearnly MJR, Goldstein H (1975) *Assessment of skeletal maturity and prediction of adult height (TW2 Method)*. Academic Press
145. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP (2004) *Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms*. Gene 2: 143-56
146. van der Eerden BC, Karperien M, Wit JM (2003) *Systemic and local regulation of the growth plate*. Endocr Rev 6: 782-801
147. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M,

- Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X (2001) *The sequence of the human genome*. Science 5507: 1304-51
148. Vidal O, Lindberg MK, Hollberg K, Baylink DJ, Andersson G, Lubahn DB, Mohan S, Gustafsson JA, Ohlsson C (2000) *Estrogen receptor specificity in the regulation of skeletal growth and maturation in male mice*. Proc Natl Acad Sci U S A 10: 5474-9
149. Vosahlo J, Zidek T, Lebl J, Riedl S, Frisch H (2004) *Validation of a mathematical model predicting the response to growth hormone treatment in prepubertal children with idiopathic growth hormone deficiency*. Horm Res 3: 143-7
150. Wang HJ, Geller F, Dempfle A, Schauble N, Friedel S, Lichtner P, Fontenla-Horro F, Wudy S, Hagemann S, Gortner L, Huse K, Remschmidt H, Bettecken T, Meitinger T, Schafer H, Hebebrand J, Hinney A (2004) *Ghrelin receptor gene: identification of several sequence variants in extremely obese children and*

- adolescents, healthy normal-weight and underweight students, and children with short normal stature.* J Clin Endocrinol Metab 1: 157-62
151. Wang L, McLeod HL, Weinshilboum RM (2011) *Genomics and drug response.* N Engl J Med 12: 1144-53
 152. Wassenaar MJ, Dekkers OM, Pereira AM, Wit JM, Smit JW, Biermasz NR, Romijn JA (2009) *Impact of the exon 3-deleted growth hormone (GH) receptor polymorphism on baseline height and the growth response to recombinant human GH therapy in GH-deficient (GHD) and non-GHD children with short stature: a systematic review and meta-analysis.* J Clin Endocrinol Metab 10: 3721-30
 153. Watkins-Chow DE, Camper SA (1998) *How many homeobox genes does it take to make a pituitary gland?* Trends Genet 7: 284-90
 154. Wellcome Trust Case Control Consortium (2007) *Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls.* Nature 7145: 661-78
 155. Welsch U, Deller T, (eds) (2010) *Sobotta Lehrbuch Histologie.* 3rd ed. Urban & Fischer, München Jena
 156. Wilton P, Mattsson AF, Darendeliler F (2010) *Growth hormone treatment in children is not associated with an increase in the incidence of cancer: experience from KIGS (Pfizer International Growth Database).* J Pediatr 2: 265-70
 157. Wit JM (2002) *Growth hormone therapy.* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 3: 483-503
 158. Wit JM (2007) *Optimizing growth hormone therapy in growth hormone deficient children: what to do in the absence of hard evidence? Commentary on Rachmiel et al.: Final height in children with idiopathic growth hormone deficiency treated with a fixed dose of recombinant growth hormone (Horm Res 2007;68:236-243).* Horm Res 5: 244-7
 159. Wit JM, Ranke MB, Albertsson-Wikland K, Carrascosa A, Rosenfeld RG, Van Buuren S, Kristrom B, Schoenau E, Audi L, Hokken-Koelega AC, Bang P, Jung H, Blum WF, Silverman LA, Cohen P, Cianfarani S, Deal C, Clayton PE, de Graaff L, Dahlgren J, Kleintjens J, Roelants M (2013) *Personalized approach to growth hormone treatment: clinical use of growth prediction models.* Horm Res Paediatr 5: 257-70
 160. Xu J, Bleecker ER, Jongepier H, Howard TD, Koppelman GH, Postma DS, Meyers DA (2002) *Major recessive gene(s) with considerable residual polygenic effect regulating adult height: confirmation of genomewide scan results for chromosomes 6, 9, and 12.* Am J Hum Genet 3: 646-50
 161. Yakar S, Liu JL, Le Roith D (2000) *The growth hormone/insulin-like growth factor-I system: implications for organ growth and development.* Pediatr Nephrol 7: 544-9
 162. Yu H, Spitz MR, Mistry J, Gu J, Hong WK, Wu X (1999) *Plasma levels of insulin-like growth factor-I and lung cancer risk: a case-control analysis.* J Natl Cancer Inst 2: 151-6
 163. Zenker M, Horn D, Wiczorek D, Allanson J, Pauli S, van der Burgt I, Doerr HG, Gaspar H, Hofbeck M, Gillessen-Kaesbach G, Koch A, Meinecke P, Mundlos S, Nowka A, Rauch A, Reif S, von Schnakenburg C, Seidel H, Wehner LE, Zweier C, Bauhuber S, Matejas V, Kratz CP, Thomas C, Kutsche K (2007) *SOS1 is the*

-
- second most common Noonan gene but plays no major role in cardio-facio-cutaneous syndrome. J Med Genet 10: 651-6*
164. Zenker M (2009) *Genetic and pathogenetic aspects of Noonan syndrome and related disorders. Horm Res 57-63*
165. Zenker M (2011) *Clinical manifestations of mutations in RAS and related intracellular signal transduction factors. Curr Opin Pediatr 4: 443-51*

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Differentialdiagnosen des Kleinwuchses 7

Abb. 2: Perzentilenkurven für Körperhöhe und -gewicht für Mädchen und Jungen
im Alter von 0-18 Jahren nach Brandt 1986 (57) 9

Abb. 3: Perzentilenkurven für die Wachstumsgeschwindigkeit für Mädchen und
Jungen im Alter von 0-18 Jahren nach Brandt 1986 (57) 9

Abb. 4: Flussdiagramm zum Ablauf der Diagnostik des
Wachstumshormonmangels im Kindes- und Jugendalter (10) 14

Abb. 5: Konzept der rhGH-Therapie nach Krüström und Wikland (77)..... 16

Abb. 6: Regulation der Wachstumshormonkaskade..... 22

Abb. 7: Beeinflussung der Osteoblasten-Osteoklasten-Arbeitseinheit durch die
Hormone Vitamin D und Östrogene (12)..... 25

Abb. 8: Funktion der CDK-Zyclin-Dimere bzw. CDK-Inhibitorproteine (CKIs) im
Zellzyklus (118) 26

Abb. 9: Steuerung des G1-S-Übergangs (118)..... 27

Abb. 10: Wachstumsgeschwindigkeit (cm/Jahr) in Abhängigkeit von der
Wachstumshormondosis (mg/kgKG/Tag) (114)..... 29

Abb. 11: Formel zur Berechnung des gesuchten DNA-Volumens..... 42

Abb. 12: DNA Platte A mit Patienten DNA WS3 bis WS120..... 43

Abb. 13: DNA Platte B mit Patienten DNA WS121 bis WS227 43

Abb. 14: Beispiel für die Detektion eines SNP mit Hilfe der HRM Methode 45

Abb. 15: Theorie der HRM Methode (entnommen aus: LightCycler 480 Gene
Scanning Software Anleitung)..... 46

Abb. 16: Nicht-normalisierte Schmelzkurven und Detektion negativer DNA Proben..... 47

Abb. 17: Normalisierte Schmelzkurven..... 47

Abb. 18: Normalisierte Schmelzkurven nach Temperaturverlagerung 48

Abb. 19: Differenzplot 49

Abb. 20: Formel zur Berechnung des gesuchten Primervolumens..... 50

Abb. 21: Bilder der Gelelektrophorese mit den Ergebnissen der Primertestung 52

Abb. 22: Beladung der LightCycler 480 Mutiwell Plate 96 zur HRM-Primer-Testung.... 53

Abb. 23: HRM-Primer-Testung mit SNP rs3110697	54
Abb. 24: Zusammenfassung der einzelnen Schritte einer DNA-Sequenzierung (entnommen aus: Applied Biosystems® Genetic Analyzers Manuals)	57
Abb. 25: Ablauf der PCR Aufreinigung mittels Agencourt AMPure XP PCR Purification Systems von Beckman Coulter (AMPureXP Protokoll)	59
Abb. 26: Micro Amp Fast 96 Well Platte mit PCR Produkten der Proben WS3 bis WS70.....	60
Abb. 27: Micro Amp Fast 96 Well Platte mit PCR Produkten der Proben WS73 bis WS120.....	60
Abb. 28: Micro Amp Fast 96 Well Platte mit PCR Produkten der Proben WS121 bis WS192a	61
Abb. 29: Micro Amp Fast 96 Well Platte mit PCR Produkten der Proben WS193a bis WS227	61
Abb. 30: Ablauf der Aufreinigung der Produkte der Sequenzierreaktion mittels Agencourt CleanSEQ – Dye Terminator Removal von Beckman Coulter in drei Schritten (Agencourt CleanSEQ Protokoll)	62
Abb. 31: Ausschnitt der Basensequenzen dreier DNA Proben nach erfolgter Sequenzierung durch einen automatischen Sequenzierer	63
Abb. 32: Schema zur Auswertung des Genotyps der DNA Proben	66
Abb. 33: Q-Q-Diagramm des loR zur Testung auf Normalverteilung für das SNP- Projekt	68
Abb. 34: Histogramm mit Normalverteilungskurve für die Variable loR für das SNP-Projekt.....	68
Abb. 35: SOS1 Gen rs2888586 Vergleich der Mittelwerte des loR	71
Abb. 36: SOS1 Gen rs2888586 Boxplots mit Median und 25. bzw. 75.Perzentile des loR.....	71
Abb. 37: CDK4 Gen rs2069502 Vergleich der Mittelwerte des loR	74
Abb. 38: CDK4 Gen rs2069502 Boxplots mit Median und 25. bzw. 75.Perzentile des loR.....	75
Abb. 39: IGF1R Gen rs2871865 Vergleich der Mittelwerte des loR	80
Abb. 40: GHSR Gen rs572169 Vergleich der Mittelwerte des loR	81

Abb. 41: GHR Exon 3 Deletion Vergleich der Mittelwerte des IoR	83
Abb. 42: GHR Exon 3 Deletion Boxplots mit Median und 25. bzw. 75.Perzentile des IoR.....	83
Abb. 43: Formel zur Berechnung der PHV	90
Abb. 44: Formel zur Berechnung des IoR (70)	90
Abb. 45: SOS1 abhängige Aktivierung von RAS (165).....	94
Abb. 46: SOS1 Gen rs2888586 DNA Platte A Differenzplot und Basensequenz	110
Abb. 47: SOS1 Gen rs2888586 DNA Platte B Differenzplot und Basensequenz	111
Abb. 48: GAB1 Gen rs300919 DNA Platte A Differenzplot und Basensequenz	112
Abb. 49: GAB1 Gen rs300919 DNA Platte A Schmelzkurven	113
Abb. 50: GAB1 Gen rs300919 DNA Platte B Differenzplot und Basensequenz	114
Abb. 51: GAB1 Gen rs300919 DNA Platte B Schmelzkurven	115
Abb. 52: GAB1 Gen rs300919 Vergleich der Differenzplots beider DNA Platten in Abhängigkeit von der per Zufall ausgewählten Referenzkurve	116
Abb. 53: IGFBP3 Gen rs3110697 DNA Platte A Differenzplot und Basensequenz.....	117
Abb. 54: IGFBP3 Gen rs3110697 DNA Platte A Schmelzkurven	118
Abb. 55: IGFBP3 Gen rs3110697 DNA Platte B Differenzplot und Basensequenz.....	118
Abb. 56: IGFBP3 Gen rs3110697 DNA Platte B Schmelzkurven	119
Abb. 57: IGFBP3 Gen rs3110697 Vergleich der Differenzplots beider DNA Platten in Abhängigkeit von der per Zufall ausgewählten Referenzkurve	120
Abb. 58: Grb10 Gen rs933360 DNA Platte A Differenzplot und Basensequenz.....	121
Abb. 59: Grb10 Gen rs933360 DNA Platte B Differenzplot und Basensequenz.....	122
Abb. 60: Grb10 Gen rs933360 DNA Platte B Schmelzkurven	122
Abb. 61: GHRHR Gen rs2267723 DNA Platte A Differenzplot und Basensequenz	123
Abb. 62: GHRHR Gen rs2267723 DNA Platte A Schmelzkurven.....	124
Abb. 63: GHRHR Gen rs2267723 DNA Platte B Differenzplot und Basensequenz	124
Abb. 64: GHRHR Gen rs2267723 DNA Platte B Schmelzkurven.....	125
Abb. 65: VDR Gen rs228570 DNA Platte A Differenzplot und Basensequenz	126
Abb. 66: VDR Gen rs2228570 DNA Platte A Schmelzkurven	126
Abb. 67: VDR Gen rs228570 DNA Platte B Differenzplot und Basensequenz	127
Abb. 68: VDR Gen rs2228570 DNA Platte B Schmelzkurven	127

Abb. 69: ESR1 Gen rs2347867 DNA Platte A Differenzplot und Basensequenz	128
Abb. 70: ESR1 Gen rs2347867 DNA Platte A Schmelzkurven.....	128
Abb. 71: ESR1 Gen rs2347867 DNA Platte B Differenzplot und Basensequenz	129
Abb. 72: ESR1 Gen rs2347867 DNA Platte B Schmelzkurven.....	130
Abb. 73: CDK4 Gen rs2069502 DNA Platte A Differenzplot und Basensequenz	131
Abb. 74: CDK4 Gen rs2069502 DNA Platte A Schmelzkurven	132
Abb. 75: CDK4 Gen rs2069502 DNA Platte B Differenzplot und Basensequenz	132
Abb. 76: CDK4 Gen rs2069502 DNA Platte B Schmelzkurven	133
Abb. 77: 2%ige Agarosegele der DNA Proben WS3 bis WS51	134
Abb. 78: 2%ige Agarosegele der DNA Proben WS54 bis WS107	135
Abb. 79: 2%ige Agarosegele der DNA Proben WS121 bis WS175.....	135
Abb. 80: 2%ige Agarosegele der DNA Proben WS176 bis WS218.....	136
Abb. 81: 2%ige Agarosegele der DNA Proben WS113 bis WS120 bzw. DNA Proben WS219 bis WS227.....	136
Abb. 82: 2%ige Agarosegele mit der Wiederholung der DNA Proben (*) die im ersten PCR Durchlauf keine qualitativ hochwertigen Banden lieferten	137

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Regulation der GH-Sekretion	19
Tab. 2: Halbwertszeiten und Häufigkeiten von IGF1, IGF1-IGFBP3-Komplex und IGF1-IGFBP3-ALS-Komplex im Blut	20
Tab. 3: Auflistung der 13 untersuchten SNPs mit zugehörigem Gen, RefSNP Allel, Major Allel und Wirkungsort	31
Tab. 4: Anzahl an weiblichen und männlichen Patienten für das SNP-Projekt	38
Tab. 5: Angaben zum durchschnittlichen Alter bei Therapiebeginn, rhGh Dosierung ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$) und maximal erreichter GH-Konzentration (ng/ml) in den Stimulationstests für das SNP-Projekt	38
Tab. 6: Anzahl an weiblichen und männlichen Patienten für das GHRd3 Projekt.....	39
Tab. 7: Angaben zum durchschnittlichen Alter bei Therapiebeginn, rhGh Dosierung ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$) und maximal erreichter GH-Konzentration (ng/ml) in den Stimulationstests für das GHRd3 Projekt.....	39
Tab. 8: Erforderliche Agarosekonzentration bzw. Menge an TBE-Puffer zur Darstellung von unterschiedlich langen DNA-Fragmenten	41
Tab. 9: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die PCR.....	50
Tab. 10: PCR-Protokoll nach Erlangen 65	51
Tab. 11: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die HRM Methode	53
Tab. 12: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die HRM Methode	55
Tab. 13: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die PCR.....	58
Tab. 14: Protokoll des Cyclersprogramms	60
Tab. 15: Reaktionsansatz für die Sequenzierung	61
Tab. 16: Vorlage der DNA bzw. der Primer für die PCR-Primertesting.....	64
Tab. 17: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die PCR.....	64
Tab. 18: Modifiziertes PCR-Protokoll nach Pantel et al.	65
Tab. 19: Zusammensetzung des Reaktionsansatz für die PCR.....	65
Tab. 20: Kolmogorov-Smirnov-Test zur Überprüfung auf Normalverteilung des loR.....	67
Tab. 21: Shapiro-Wilk-Test zur Überprüfung auf Normalverteilung des loR.....	68
Tab. 22: SOS1 Gen rs2888586 Deskriptive Statistik des loR.....	72

Tab. 23: SOS1 Gen rs2888586 Einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Mittelwerte des IoR.....	72
Tab. 24: SOS1 Gen rs2888586 Levene-Test zur Überprüfung der Homogenität der Varianzen	72
Tab. 25: SOS1 Gen rs2888586 PostHoc-Test zum Mehrfachgruppenvergleich.....	73
Tab. 26: SOS1 Gen rs2888586 Deskriptive Statistik des IoR	73
Tab. 27: SOS1 Gen rs2888586 Levene-Test und t-Test für unabhängige Stichproben zum Vergleich der Mittelwerte des IoR zwischen homozygoter Mutante und homozygoten Wildtypen	74
Tab. 28: CDK4 Gen rs2069502 Deskriptive Statistik des IoR.....	75
Tab. 29: CDK4 Gen rs2069502 Einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Mittelwerte des IoR.....	76
Tab. 30: CDK4 Gen rs2069502 Levene-Test zur Überprüfung der Homogenität der Varianzen	76
Tab. 31: CDK4 Gen rs2069502 PostHoc-Test zum Mehrfachgruppenvergleich.....	76
Tab. 32: CDK4 Gen rs2069502 Deskriptive Statistik des IoR	77
Tab. 33: CDK4 Gen rs2069502 Levene-Test und t-Test für unabhängige Stichproben zum Vergleich der Mittelwerte des IoR zwischen homozygoter Mutanten und homozygoten Wildtypen	77
Tab. 34: CDK4 Gen rs2069502 Deskriptive Statistik des IoR	78
Tab. 35: CDK4 Gen rs2069502 Levene-Test und t-Test für unabhängige Stichproben zum Vergleich der Mittelwerte des IoR zwischen homozygoten und heterozygoten Mutanten.....	78
Tab. 36: Verteilung der Genotypen und p-Werte der einfaktoriellen ANOVA für neun weitere SNPs.....	79
Tab. 37: Verteilung der Genotypen für die SNPs rs2871865 und rs572169	79
Tab. 38: GHSR Gen rs5721 Deskriptive Statistik des IoR	81
Tab. 39: GHSR Gen rs572169 Levene-Test und t-Test für unabhängige Stichproben zum Vergleich der Mittelwerte des IoR zwischen homozygoten Mutanten mit homozygoten Wildtypen und heterozygoten Mutanten	82

Tab. 40: GHR Exon 3 Deletion Deskriptive Statistik des IoR	84
Tab. 41: GHR Exon 3 Deletion Einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Mittelwerte des IoR.....	84
Tab. 42: GHR Exon 3 Deletion Levene-Test zur Überprüfung der Homogenität der Varianzen	84
Tab. 43: GHR Exon 3 Deletion PostHoc-Test zum Mehrfachgruppenvergleich.....	85
Tab. 44: GHR Exon 3 Deletion Deskriptive Statistik des IoR	85
Tab. 45: GHR Exon 3 Deletion Levene-Test und t-Test für unabhängige Stichproben zum Vergleich der Mittelwerte des IoR zwischen homozygoter Mutanten (d3) und homozygoten Wildtypen (fl)	86
Tab. 46: GHR Exon 3 Deletion Deskriptive Statistik des IoR	86
Tab. 47: GHR Exon 3 Deletion Levene-Test und t-Test für unabhängige Stichproben zum Vergleich der Mittelwerte des IoR zwischen homozygoter (d3) und heterozygoter Mutante (d3/fl).....	87
Tab. 48: Auflistung der von Ranke et al. untersuchten Wirkungsvariablen (113)	89

10 PUBLIKATIONEN

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind als Poster und im Rahmen eines Kurzvortrages bei der ESPE 2015 (European Society for Paediatric Endocrinology) in Barcelona vorgestellt worden. Das Poster wurde für den Presidential Poster Award nominiert.

Jung AM, Hoffmann P, Monz D, Lissewski C, Schanze D, Wagenpfeil S, Zenker M, Rohrer TR

Influence of genetic variation on the response to recombinant human growth hormone treatment in children with GH deficiency: An analysis of 13 single nucleotide polymorphisms and the GH receptor exon 3 deletion. *Horm Res Paediatr* 2015; 84 (suppl 1): 100-101

Außerdem ist ein Manuskript zur Publikation der Ergebnisse in „Clinical Endocrinology“ in Arbeit.

Jung AM, Monz D, Hoffmann P, Lissewski C, Schanze D, Wagenpfeil S, Zenker M, Rohrer TR

Genetic polymorphisms as predictive markers of response to growth hormone therapy in paediatric growth hormone deficiency.

11 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Tilman R. Rohrer meinen besonderen Dank, für die Überlassung dieses spannenden und aktuellen Themas, aussprechen. Seine unermüdlichen Bemühungen, mir die Thematik plausibel zugänglich zu machen und die raschen Korrekturen und konsekutiven Diskussionen, ermöglichten es mir die Arbeit zügig voran zu bringen.

Mein Dank gebührt zudem meiner Betreuerin Dr. med. Eva Stierkorb die mir bei jedem noch so kleinen Schritt mit Rat und Tat zur Seite stand, und mir in schwierigen Situationen die notwendigen Anstöße gegeben hat. Die Zusammenarbeit stellte für mich sowohl fachlich als auch persönlich eine große Bereicherung dar.

Dem gesamten Team um Herrn Prof. Dr. Rohrer danke ich für Ihre vielseitigen Anregungen und bereitwillige Hilfe bei organisatorischen Problemen.

Den Ärztinnen und Krankenschwestern für die Aufklärung der Patienten und die Sicherstellung der notwendigen Blutproben.

Frau Edith Behrens und Frau Tina Leßmeister-Bastian für die zuverlässige Beschaffung von Hintergrundinformationen und Ihre stets freundliche und aufmunternde Art.

Den experimentellen Teil der Arbeit durfte ich an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg in dem von Herrn Prof. Dr. med. Martin Zenker geleiteten Institut für Humangenetik durchführen.

Ich danke ganz besonders Herrn Prof. Dr. med. Zenker für die Ermöglichung der Durchführung der labortechnischen Verfahren, der Bereitstellung der notwendigen Substanzen und Geräte und Seinem gesamten Team für den herzlichen Empfang und die ausgesprochen guten Arbeitsbedingungen.

Dem Leiter des humangenetischen Labors Herrn Dr. rer. nat. Denny Schanze danke ich für die zuverlässige und professionelle Organisation des Projekts. Seine Denkanstöße, Tipps und Ideen erlaubten mir eine erfolgreiche Durchführung der Experimente.

Meiner dortigen Betreuerin Dr. rer. nat. Christina Lissewski danke ich für Ihre großzügige Hilfe und Geduld beim Erlernen der Methoden und der Auswertung der Ergebnisse.

Meinen Dank möchte ich außerdem an die Personen richten, ohne deren Mithilfe die Fertigstellung dieser Arbeit nicht gelungen wäre:

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Stefan Wagenpfeil für seine Hilfestellungen bei Fragen der Statistik.

Ich danke Herrn Norbert Nunold für alles rund um den Computer.

Ich danke Herrn Dr. rer. nat. Dominik Monz für seine Bemühungen meiner Arbeit den letzten Feinschliff zu geben und verbliebene Unklarheiten zu beseitigen.

Ich danke Herrn Johannes Heymann für seine geduldige Unterstützung bei der Formatierung der Tabellen und sein gutes Auge für Symmetrie und Form.

Ich danke Frau Evelyn Weiß und Herrn Daniel Jablonsky für ihre Nachhilfe in Grammatik und Zeichensetzung.

Mein inniger Dank gilt meinen Eltern – Christiane Cuq und Andreas Jung – deren bedingungsloser Liebe und uneingeschränkter Hilfe ich mir immer absolut sicher sein kann.

Zuletzt danke ich meinem Lebensgefährten Torben Rixecker von ganzem Herzen für seine liebevolle und gelassene Unterstützung. Seine Bereitschaft geduldig zuzuhören und auch schwierige Phasen gemeinsam zu bewältigen war von unschätzbarem Wert für mich.