

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung I

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

Sektion Pädiatrische Endokrinologie

Leiter: Professor Dr. M. Ranke

**Wachstumshormonrezeptorproteinpolymorphismus
und Effektivität der Wachstumshormontherapie bei
Kindern mit Ullrich – Turner – Syndrom und intrauteri-
nem Kleinwuchs**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard – Karls – Universität
zu Tübingen

**vorgelegt von
Friederike Baur
aus
Böblingen**

Dekan: Professor Dr. Ingo Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Gerhard Binder

2. Berichterstatter: Professor Dr. H.- U. Häring

Meinen Eltern in großer Dankbarkeit!

Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Binder G, **Baur F**, Schweizer R, Ranke MB

The d3-Growth Hormone (GH) Receptor Polymorphism is Associated with Increased Responsiveness to GH in Turner Syndrome and Short Small-for-Gestational-Age Children

J Clin Endocrin & Metab 91 (2): 659-664, 2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Wachstum	1
1.2	Die Wachstumshormontherapie	2
1.2.1	Das Wachstumshormon	2
1.2.2	Die Entdeckungsgeschichte des Wachstumshormons und seiner Mediatoren.....	3
1.2.3	Nebenwirkungen der Wachstumshormontherapie.....	5
1.2.4	Der Wachstumshormonrezeptor.....	5
1.2.5	Exon 3 Deletion	8
1.3	Betroffene Kinder.....	9
1.3.1	Ullrich– Turner– Syndrom.....	11
1.3.2	SGA – Kinder	12
1.4	Fragestellung	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Patientenkollektiv.....	16
2.1.1	Teilnahmevoraussetzungen und Ausschlusskriterien	16
2.1.2	UTS- Patientinnen	17
2.1.3	SGA- Patienten	18
2.1.4	Kontrollgruppe	18
2.2	Materialien und Bezugsquellen.....	18
2.2.1	Geräte	18
2.2.2	Reagenzien	19
2.3	Methoden	21
2.3.1	DNA Extraktion.....	21
2.3.2	DNA-Konzentrationsbestimmung	22
2.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.3.4	Analyse der PCR-Produkte	25
2.3.5	Erfassung der Patientendaten	27

2.3.6	Statistische Auswertung	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Verteilung der Genotypen	30
3.2	UTS- Patientinnen	31
3.2.1	Klinische Charakteristika vor Therapie	31
3.2.2	Klinische Charakteristika nach einem Jahr Therapie.....	32
3.3	SGA- Patienten	36
3.3.1	Klinische Charakteristika vor Therapie	36
3.3.2	Klinische Charakteristika nach einem Jahr Therapie.....	37
4	Diskussion	41
4.1	Relevanz	41
4.2	Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit.....	41
4.2.1	UTS – Mädchen	41
4.2.2	SGA – Kinder	43
4.3	Vergleich mit Dos Santos et al.....	44
4.4	IGF – Werte	46
4.5	Schlussfolgerung/ Ausblick.....	48
5	Zusammenfassung.....	49
6	Anhang	50
6.1	Abkürzungen	50
7	Literaturverzeichnis	52
8	Danksagung.....	59
9	Lebenslauf	60

1 Einleitung

1.1 Wachstum

Wachstum ist die Vermehrung und Vergrößerung der Körperzellen mit Zunahme der Knorpel – und Knochensubstanz im Kindes – und Jugendalter. Dies ist verbunden mit einer Zunahme des Körpergewichts und der Körperlänge (47). Das Wachstum ist multigenetisch determiniert und man kann davon ausgehen, dass die das Größenwachstum bestimmenden Gene von beiden Eltern zu gleichen Teilen vererbt werden (50).

Außerdem bestimmen viele weitere endo – und exogene Faktoren das Wachstum. Zu den physiologischen endogenen Faktoren zählen neben den genetischen Voraussetzungen die neurohumorale Regulation, das Ansprechen der Endorgane auf hormonale und metabolische Faktoren, die Resorption von Nährstoffen sowie die Umsetzung der entsprechenden Metabolite. Gesunde altersentsprechende Ernährung, sowie zahlreiche andere Milieufaktoren haben als exogene Faktoren einen Einfluss auf den Wachstumsprozess.

Der Wachstumsprozess verläuft nicht stetig, sondern unterliegt Schwankungen, die normalerweise zentralnervös ausgeglichen werden (50). Weicht die Größe des Kindes über längere Zeit vom Soll – Wert ab, so kann dies zu Kleinwuchs führen. Nach Definition spricht man von Kleinwuchs bei einer Körperlänge (im Liegen) oder einer Körpergröße (im Stehen) unterhalb der 3. Perzentile der altersentsprechenden Normpopulation (36). Allerdings kann bereits die verminderte Wachstumsgeschwindigkeit Ausdruck eines pathologischen Wachstums sein (37).

Je nach Ursache des Kleinwuchses kann therapeutisch mit einer Wachstumshormontherapie begonnen werden. Es stellte sich allerdings heraus, dass die Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit gerade unter Hochdosis rhGH-Therapie variabel und schwer vorhersehbar ist (11). Deshalb wurde versucht

mittels großer Datenbanken Einflussfaktoren für das Outcome der Therapie festzustellen.

So wurden prognostische Faktoren wie Alter, Gewicht und Dosierung (32) des Wachstumshormons herausgearbeitet (52, 53).

Die anhand dieser bisher bekannten Variablen erstellten Prediktionsmodelle erklären nur teilweise die unterschiedliche Reaktion auf die gleiche Therapie (56, 13, 49). Dies legt die Vermutung nahe, dass es noch weitere unbekannte Einflussgrößen gibt. Ein solcher Faktor genetischer Natur soll in dieser Arbeit besprochen werden.

1.2 Die Wachstumshormontherapie

1.2.1 Das Wachstumshormon

Für das normale Wachstum des kindlichen und jugendlichen Organismus ist das Wachstumshormon (Somatotropin, STH, growth hormone, GH) unentbehrlich. Dieses einkettige Peptidhormon ist aus 191 Aminosäuren ohne Zuckerreste aufgebaut (7). Es ist das Produkt des GH 1 (GH –N) – Gens, das auf dem langen Arm des Chromosoms 17 lokalisiert ist, seine Expression erfolgt fast ausschließlich in den somatotropen Zellen der Adenohypophyse. Neben dem hGH (ca. 90%) entsteht durch alternatives Spleißen eine Variante, der die Aminosäuren 32 – 46 des hGH fehlen (51).

Seine Expression und Ausschüttung wird über das zugehörige hypothalamische Releasinghormon Somatoliberin (GHRH) und das Release – Inhibiting - Hormon Somatostatin (GHRIH) reguliert.

GHRH ist ein Peptidhormon und wird hauptsächlich im N. arcuatus des Hypothalamus produziert. Es wirkt über einen G – Protein gekoppelten Zelloberflächenrezeptor, der über cAMP eine intrazelluläre Signalkaskade anregt. Diese führt zur Steigerung der Wachstumshormonproduktion und – sekretion (20).

Auch GHRIH ist ein Peptidhormon, das von den Neuronen im Bereich der anterioren, periventriculären Region des Hypothalamus produziert wird. Von dort sind regulatorische Axone zur Eminentia mediana hin gerichtet. Auch sind

auf hypothalamischer – hypophysärer Ebene weitere Rückkopplungsmechanismen eingerichtet. So steigert zum Beispiel die Sekretion von Wachstumshormon die Freisetzung von GHRH, welches wiederum die Sekretion des Hormons hemmt (51).

Die Sekretion dieser beiden Regulationshormone wiederum wird von Neurotransmittern im Hypothalamus gesteuert. Agonisten des α – und β – Rezeptors, wie auch dopaminerge und serotonerge Agonisten stimulieren die Sekretion des Wachstumshormons, während die jeweiligen Antagonisten sie hemmen. Dieses System ist bisher noch nicht vollständig verstanden (51).

Die basale Freisetzung des Wachstumshormons erfolgt pulsatil.

1.2.2 Die Entdeckungsgeschichte des Wachstumshormons und seiner Mediatoren

1956 wurde das Wachstumshormon das erste Mal isoliert und als artspezifisch erkannt (40). Salmon und Daughaday (60) fanden im folgenden Jahr heraus, dass durch das Hormon die Synthese so genannter Somatomedine vor allem in der Leber (73), aber auch in vielen anderen Geweben induziert wird.

Es gibt mehrere Somatomedine. Chemisch sind sie einkettige Polypeptide und zwei von ihnen sind die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-I (Somatomedin C) und IGF-II.

IGF zirkulieren an Bindungsproteine (IGFBP) gebunden, die ihre Halbwertszeit deutlich verlängern und bei der Bindung an die Rezeptoren eine wichtige Rolle spielen (51, 73). So dienen sie nicht nur als extrazellulärer Speicher, sondern interagieren auch mit anderen Proteinen und fungieren als Regulationssysteme (29).

IGF-II besteht aus 67 Aminosäuren (Genort Chromosom 11) und ist für das pränatale Wachstum von wesentlicher Bedeutung.

IGF-I ist ein basisches Peptid, aus 70 Aminosäuren bestehend, die eine einzelne Kette bilden (51, 67). Dem Proinsulin strukturell ähnelnd ist diese Kette über drei Disulfidbrücken verbunden. Es wird durch ein Gen auf dem langen Arm des

Chromosoms 12 kodiert (67). IGF-I bindet an einen membranständigen Rezeptor, der dem Insulinrezeptor funktionell und strukturell sehr ähnelt (7). Die IGF-I – und IGFBP3 –Serumkonzentrationen sind sowohl von der jeweiligen Wachstumshormonkonzentration anhängig, steigen so zum Beispiel unter Hochdosiswachstumshormontherapie bei wachstumshormonsensiblen Patienten im Laufe der Zeit deutlich an (55), als auch von nutritiven Faktoren, der Insulinkonzentration und der Leberleistung (63).

Das Wachstumshormon entfaltet seine Wirkung am Säulenknorpel der Epiphysenfugen, wo das wesentliche Wachstum der langen Röhrenknochen stattfindet, entweder direkt oder indirekt über IGF-I. Direkt auf die Zielzelle wirkt das Wachstumshormon als stärkstes eiweißanaboles Hormon durch die Förderung der Biosynthese und durch seine diabetogene und lipolytische Stoffwechselwirkung (7).

Raben führte 1958 die ersten erfolgreichen Behandlungsversuche mit humanem Wachstumshormon (hGH) durch (48). Damals waren durch die geringe Menge an verfügbarem Wachstumshormon und die unterschiedliche Präparation desselben die Behandlungsmöglichkeiten und damit auch der langfristige Therapieerfolg beschränkt. Eine Verbesserung des Wachstums der substituierten Kinder zeichnete sich jedoch bereits ab.

Die Messung des humanen Wachstumshormons mittels Radioimmunassays war erstmals 1963 möglich. Mit der Entdeckung der IGF – Bindungsproteine im Jahr 1975 war es möglich die Regulationsmechanismen von IGF-I besser zu verstehen. Die Biosynthese von hGH mit rekombinanter DNA – Technologie gelang erstmals 1979 in *E. coli* (21), erste klinische Versuche erfolgten 1981. Im Jahr darauf wurde die primäre Struktur des GH – Releasing-Faktors bekannt und damit seine Synthese ermöglicht. Seit 1985 erfolgt nun die Behandlung mit rekombinantem humanem Wachstumshormon (rhGH) (35). Dadurch konnte die Indikation zur GH – Therapie etwas großzügiger gestellt werden.

Die Sequenzierung des Gens des GH – Releasing Faktors gelang 1985 (41). 1988 führte man die erste Therapie mit rekombinantem IGF-I bei Patienten mit GH – Resistenz durch.

Im Laufe der folgenden Jahre konnten weitere Faktoren, die in der Signaltransduktion eine Rolle spielen, aufgedeckt werden. Auch Mutationen des Wachstumshormons, der Somatomedine und der Bindungsproteine wurden bekannt, so dass immer genauer zwischen den verschiedenen Ursachen des Symptoms Kleinwuchs unterschieden werden konnte.

1.2.3 Nebenwirkungen der Wachstumshormontherapie

Die Substitutionstherapie mit rhGH ist äußerst nebenwirkungsarm (32). Als Folge des Aufholwachstums kann es gelegentlich zu einer Epiphysiolysis capitis femoris kommen. Außerdem wurde über Einzelfälle von Pseudotumor cerebri als Folge einer vermehrten Flüssigkeitsretention während der Initialphase berichtet (51).

1.2.4 Der Wachstumshormonrezeptor

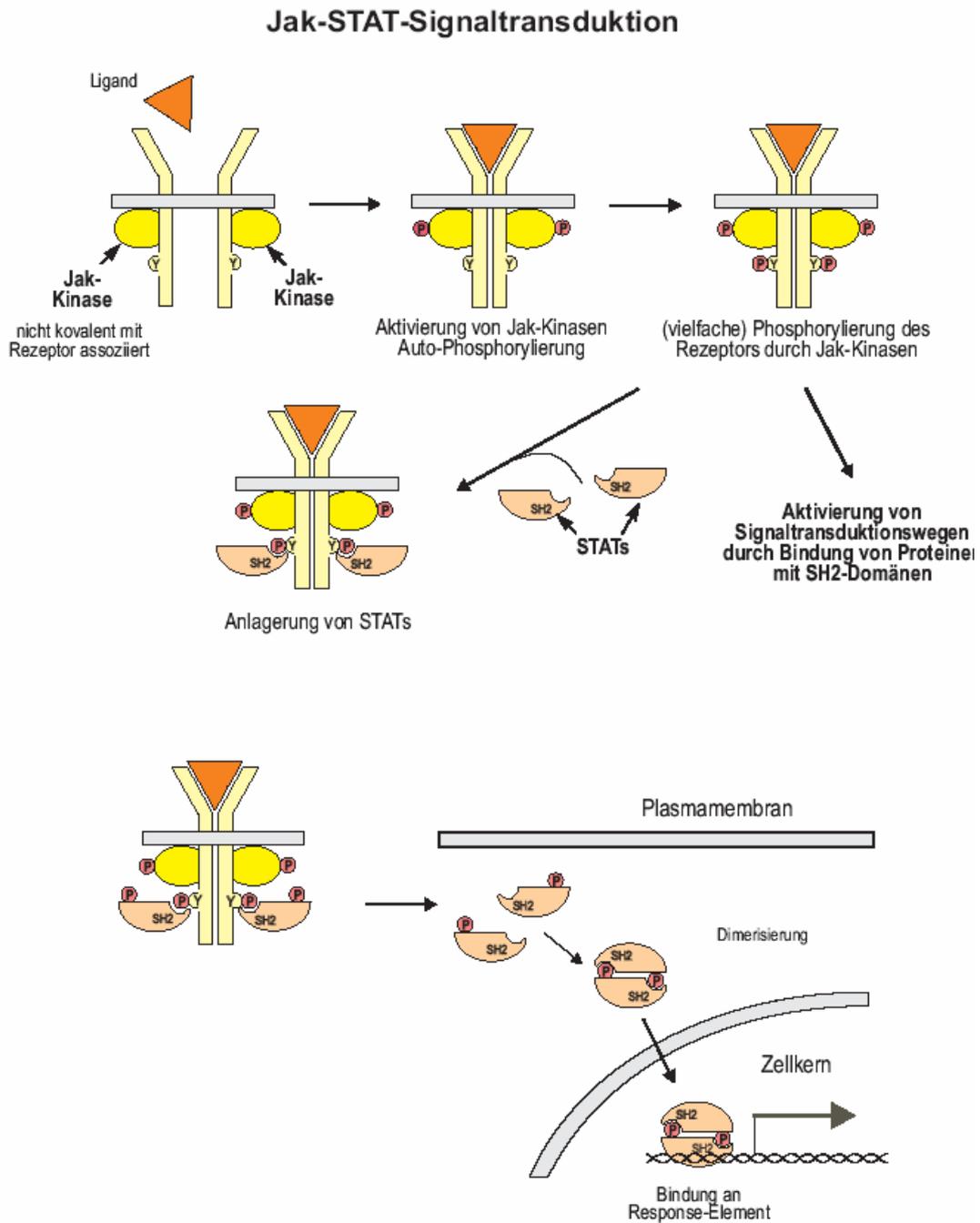
Das Wachstumshormon wirkt über einen spezifischen Rezeptor. Die Struktur des Rezeptors sowie die seiner Bindungsproteine wurde 1987 aufgedeckt (39). Das Rezeptorprotein besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranen sowie einer intrazellulären Domäne. Inzwischen ist die genaue Signalkaskade erklärt:

Bereits vor der Bindung des Hormons liegt das Rezeptormolekül als Dimer vor. Nach der Bindung des Hormons an die hochaffine Bindungsstelle der extrazellulären Domäne des Transmembranrezeptors aktiviert das GHR – Dimer als erstes die assoziierte Januskinase 2 (JAK 2). Die aktivierte Januskinase 2 phosphoryliert dann sich selbst an zusätzlichen Tyrosinen, außerdem werden zytoplasmatische Tyrosinreste des GHR und viele andere Signalmoleküle wie zum Beispiel der Transkriptionsfaktor STAT 5b phosphoryliert (69). Diese

phosphorylierten Tyrosinreste stellen dann Bindungsstellen für diverse Signaltransduktionsmoleküle, die eine Phosphotyrosinbindungsstelle besitzen, dar (8).

Diese Phosphorylierung ist Voraussetzung für die Dimerisierung des STAT 5 – Proteins (24, 26, 28). Der dimerisierte STAT 5b – Faktor transloziert in den Zellkern und bindet dort an spezifische Enhancer – Elemente. Daraufhin wird die IGF-I – Expression induziert.

Abbildung 1.1: Signalkaskade Wachstumshormonrezeptor (71)



1.2.5 Exon 3 Deletion

In den letzten Jahren wurden verschiedene Mutationen des Wachstumshormons und seines Rezeptors bekannt. Auf eine Besonderheit des Wachstumshormonrezeptors soll nun genauer eingegangen werden:

Der Rezeptor weist einen ungewöhnlichen genetischen Polymorphismus auf. Dieser Polymorphismus wird durch die Deletion des Exons 3 (d3) verursacht. Der Protein – Polymorphismus führt zu einem Verlust der Aminosäuren 7 – 28 und der Substitution der Aminosäure A6D am N – terminalen Ende der extrazellulären Rezeptordomäne (43). Die Aminosäuren 7 – 28 konnten bisher noch nicht durch Kristallographie in ihrer Struktur bestimmt werden, liegen aber nicht direkt in der Bindungszone des Wachstumshormons.

In Folge dessen wird die Bindungsaffinität des Wachstumshormons zum Rezeptor durch den Polymorphismus in vitro nicht verändert (61, 68). Es wird vermutet, dass diese wahrscheinlich sehr flexible Region eine Rolle bei den Konformationsveränderungen während der Aktivierung des Rezeptordimers durch das Wachstumshormon spielt (16). Allerdings kommen auch viele andere Möglichkeiten in Frage: Auswirkungen auf das RNA – Spleißen, die Proteininstabilität, die Glykosylierung genauso wie der Transport zur Zellmembran.

Die Prävalenz des d3 – Wachstumshormonrezeptorallels beträgt zwischen 25 und 32% mit einer Homozygotenfrequenz von 9 – 14% (43, 16).

Die Anwesenheit einer einzelnen Kopie des d3 – Wachstumshormonrezeptors erscheint ausreichend für ein normales Wachstumsverhalten (44).

1.3 Betroffene Kinder

Eine große Zahl von Erkrankungen weist als Haupt – oder Nebensymptom Kleinwuchs auf. Bei pathologischen Wachstumsstörungen bestehen primär angelegte oder sekundär erworbene Veränderungen der Wachstumsregulation und / oder des wachsenden Gewebes (50).

Die systematische Gliederung des Kleinwuchses in primäre und sekundäre Störungen des Wachstums ist in der folgenden Übersicht dargestellt (50):

Abbildung 1.2: Systematische Gliederung des Kleinwuchses.

- Primärer Kleinwuchs
 - Normvarianten
 - Familiärer Kleinwuchs
 - Konstitutionelle Entwicklungsverzögerung
 - Skelettdysplasien
 - Knochenstoffwechselstörungen (Mukopolysaccharidosen, Mukolipidosen)
 - Chromosomale Anomalien (Ullrich-Turner-Syndrom, M. Down) Intrauteriner Kleinwuchs (fetale Infektionen, Alkohol, Nikotin)
 - Kleinwuchssyndrome (Silver – Russel-Syndrom)
- Sekundärer Kleinwuchs
 - Mangel – und Fehlernährung
 - Chronische Organerkrankungen
 - Niereninsuffizienz
 - Leberzirrhose
 - Darmerkrankungen (Zöliakie)
 - zyanotische Herzfehler
 - Rheumatischer Formenkreis
 - Metabolische Störungen des Kohlenhydrat-, Eiweiß – und Fettstoffwechsels
 - Hormonelle Störungen (Wachstumshormonmangel, Hypothyreose, Glukokortikoidexzeß)
 - Psychosoziale Deprivation (15)

Betrachtet man nun die Kinder, die trotz ausreichender Wachstumshormonkonzentration kleinwüchsig sind, so liegt bei diesen Patienten die Störung vornehmlich im IGF-I – produzierendem Gewebe oder im Endorgan. Abbildung 1.3 gibt eine Übersicht über mögliche Ursachen.

Abbildung 1.3: Ursachen des Kleinwuchses

- Störungen in den IGF-I – produzierenden Geweben (IGF – Mangel)
 - angeborene GH – Resistenz
 - fehlende bzw defekte GH – Rezeptoren
 - Postrezeptorendefekt
 - Defekte in der IGF-I Synthese
 - erworbene GH – Resistenz
 - zirkulierende Antikörper gegen GH oder GH – Rezeptoren
 - Unterernährung
 - Leberkrankheiten
 - IGF-I – Mangel bei Hypothyreose
- Störung im Endorgan (Knorpel/Knochen)
 - angeborene Störung
 - IGF-I Resistenz im Knorpel oder Knochen
 - Störung der Epiphysenfuge
 - nicht – endokrine Skeletterkrankungen
 - Chromosomenaberrationen
 - erworbene Störungen
 - Glukokortikoid – induzierte Wachstumshemmung (72)

Von diesen den Kleinwuchs als Symptom aufweisenden Erkrankungen wurden in dieser Doktorarbeit zwei kleine, klar definierte Gruppen (Ullrich –Turner-Syndrom, SGA – Kinder („small for gestational age“)) genauer untersucht, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch vielfältige, andere Einflussfaktoren möglichst klein zu halten. Diese beiden Gruppen haben beide keinen Wachstumshormonmangel, profitieren aber trotzdem von einer Hochdosis rhGH – Therapie (14, 12, 57).

1.3.1 Ullrich– Turner– Syndrom

Viele Chromosomenstörungen führen zu einem primären Kleinwuchs. Eine häufige Form ist das Ullrich – Turner – Syndrom (UTS). Dieses Syndrom wurde erstmals 1930 von dem Münchner Kinderarzt O. Ullrich beschrieben. Unabhängig davon berichtete der amerikanische Arzt Henry H. Turner 1938 von Mädchen, die durch ihre geringe Körpergröße, das Fehlen normaler weiblicher Entwicklung und durch spezifische Merkmale wie Pterygium colli und Cubitus valgus auffielen. Dieser Symptomenkomplex wird auch heute noch unter dem Namen Ullrich – Turner – Syndrom zusammengefasst. Weitere Symptome sind ein breiter, schildförmiger Thorax, hypoplastische, weit auseinander stehende Mammillen und dysplastische, tief sitzende Ohren (36). Fehlbildungen innerer Organe sind vor allem Hufeisennieren und Aortenisthmusstenose. Es kann zur charakteristischen Fazies mit Ptosis, ausgeprägter Infraorbitalfalte, nach unten gerichteten Mundwinkeln und einem tief sitzenden Haaransatz kommen. Selten liegt eine Minderbegabung vor (25, 7, 33).

Der pathologische Karyotyp 45,X wurde 1959 von Ford et al. entdeckt (18). Fast ebenso häufig wie der klassische Karyotyp sind Fälle mit Mosaik 45,X/46,XX und Formen mit Deletion eines Armes von X oder X – Iso – oder Ringchromosomen. Bei diesen Mädchen reicht der Phänotyp vom Vollbild des UTS bis hin zum fast normalen weiblichen Habitus mit spontaner Pubertätsentwicklung und möglicher Fertilität (7, 36).

Leitsymptom ist fast immer der Kleinwuchs, wenn die Diagnose nicht schon im Neugeborenenalter wegen der Lymphödeme an Hand – und Fußrücken gestellt wurde. Der Kleinwuchs der Mädchen beruht nicht auf einem Wachstumshormonmangel, sondern auf einer primär verminderten endogenen Wachstumspotenz der langen Röhrenknochen, die IGF-I Werte sind im niedrig normalen Bereich (7, 25). Er kann in vier Phasen unterteilt werden. Phase eins beschreibt das retardierte intrauterine Wachstum. Postpartal schließt sich eine Zeit der relativen Kompensation des Wachstumsrückstandes bis zu einem Knochenalter von zwei Jahren an (2). In der dritten Phase kommt es zu einer gravierenden

Verzögerung des Wachstums. Der normalerweise mit der Pubertät einsetzende Wachstumsschub (ca. zehntes Lebensjahr) bleibt aus. Die Mädchen wachsen unbehandelt prolongiert bis etwa zum 20. Lebensjahr (Norm: 16. Lebensjahr).

Die symptomatische Therapie besteht einerseits aus einer möglichst frühzeitig einsetzenden Hochdosistherapie mit rhGH, andererseits muss vor dem 14. Lebensjahr mit der zunächst langsam steigenden Östrogensubstitution begonnen werden. Nach Übergang auf eine zyklische Östrogen/Gestagen – Dauertherapie kommt es zur regelmäßigen Menstruation und weiterer pubertärer Reifung (7). Ziele der Substitutionstherapie sind eine normale Körperhöhe im Kindesalter, zeitgerechtes, normales Pubertätswachstum und Pubertätsentwicklung sowie eine Endgröße, die bei über 150cm liegt.

1.3.2 SGA – Kinder

Die Einteilung Neugeborener nach dem Geburtsgewicht bezogen auf das Gestationsalter ermöglicht die Unterscheidung von hypotrophen, eutrophen und hypertrophen Neugeborenen (6):

Hypotrophes Neugeborenes („small for gestational age“, SGA)	Geburtsgewicht < 3. Perzentile
Eutrophes Neugeborenes („appropriate for gestational age“, AGA)	Geburtsgewicht 3. - 97. Perzentile
Hypertrophes Neugeborenes („large for gestational age“, LGA)	Geburtsgewicht > 97. Perzentile

An dieser Stelle soll nun auf die Gruppe der SGA- Kinder genauer eingegangen werden. Der intrauterine Kleinwuchs kann durch eine Vielzahl von Faktoren bedingt sein (70). Eine Übersicht gibt Abbildung 1.4 (50):

Abbildung 1.4: Ursachen für SGA- Kinder.

- Mütterliche Störungen:
 - Erkrankungen der Mutter
 - Eklampsie
 - schwere, chronische Krankheiten
 - Uterusanomalien
 - Umweltfaktoren
 - Rauchen
 - Alkohol
 - Drogen
 - sozioökonomische Konflikte
- Fetale Störungen
 - chromosomale Aberrationen
 - anatomische Entwicklungsdefekte
 - pränatal manifeste Skelettdysplasien
 - syndromatische Störungen
- Plazentare Störungen
- Infektionen

Zu den syndromatischen Störungen gehören verschiedene Formen des so genannten intrauterinen Kleinwuchses. Diese Kinder sind bei Geburt proportioniert klein und bleiben klein (50). Eine spezifische Diagnose kann im Verlauf anhand verschiedener morphologischer Stigmata gestellt werden. Auch wenn es mit zunehmendem Alter eher möglich wird, die Ursache des Kleinwuchses herauszufinden, so bleibt doch oft anstelle einer exakten Diagnose der beschreibende Terminus des Kleinwuchses stehen.

Die Pathogenese der intrauterinen Wachstumsstörungen ist in den meisten Fällen unbekannt. Die Mehrzahl der bei Geburt kleineren Kinder kann das Wachstumsdefizit bis zum 4. Lebensjahr wieder aufholen – v.a. die durch mütterliche, plazentare und exogene Faktoren beeinträchtigen Kinder (50). Die Endlänge liegt schließlich im familiären Zielbereich (36). Die Kinder, bei denen das Aufholwachstum ausbleibt, können mit Wachstumshormonen therapiert

(36, 2) werden. Die Ergebnisse einer solchen Hormontherapie sind variabel, doch oft besser als die der ebenfalls hormontherapierten UTS – Kinder.

1.4 Fragestellung

Eine vor kurzem veröffentlichte Studie von Dos Santos et al. berichtete über eine Verbindung zwischen der Deletion des Exons 3 des WHR und dem vermehrten Ansprechen kleiner Kinder ohne Wachstumshormonmangel auf die Hochdosis rhGH – Therapie (16). Ausgelöst wurde diese durch vorangegangene Arbeiten, in der die mögliche Relevanz der Deletion des Exons 3 des Wachstumshormonrezeptors bezüglich der GH – Signalkaskade untersucht wurde. Das Bindungsverhalten des Wachstumshormons beziehungsweise des rekombinanten Wachstumshormons an die zwei Isoformen des Rezeptors wurde dabei genauer betrachtet (Lit. 41, Lit.21, Lit.42).

Dos Santos et al. untersuchte die Kinder, um klinische Auswirkungen des Rezeptorproteinpolymorphismuses festzustellen. Die kleinen Kinder, die genotypisiert wurden, gehörten zwei verschiedenen Krankheitsbildern an. Die eine Gruppe bestand aus SGA –, die andere aus ISS – Kindern (idiopathic short stature). Die Gruppe der ISS – Kinder hatte zwar im Gegensatz zu den SGA – Kindern eine normale Geburtsgröße, wies dann aber eine verminderte Wachstumsrate auf (38, 27, 11).

Diese Kinder wurden nun in zwei Kohorten aufgeteilt. Kohorte 1 bestand aus 76 Kindern, davon 51 ISS – Patienten, Kohorte 2 bestand aus 96 Kindern mit 61 ISS – Kindern. Untersucht wurde nacheinander in beiden Kohorten die Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit abhängig vom d3 – Genotyp in den ersten zwei Jahren der rhGH – Therapie. Es ergab sich eine deutliche Abhängigkeit ($P < 10^{-5}$ im ersten Jahr, $P < 0.001$ im zweiten Jahr) der Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit vom Genotyp. Dabei war die Reaktion auf das Wachstumshormon der Kinder größer, die mindestens ein d3 – Allel trugen.

Nachdem die Dos Santos-Gruppe in ihrer SGA/ISS – Studie eine 1,7 – 2 mal höhere Größenzunahme für die d3/fl und d3/d3 Genotypen ermittelt hatte, ver-

suchte sie nun in vitro heraus zu finden, in wie weit die Deletion des Exons 3 die Funktion des Rezeptors beeinflusst.

Es wurden in vitro Untersuchungen an HEK Fibroblasten durchgeführt, welche mit Vektoren für d3 – GHR, fl – GHR sowie einem Reporter, der ein LHRE (lactogenic response element) zusammen mit einem Luciferase – Gen enthielt, transfiziert wurden (27, 62). Die beobachtete Luciferase – Aktivität, durch GH stimuliert, zeigte eine ~ 30% höheren Signaltransduktion bei den d3 – Isoform – Zellen im Vergleich zu den fl – Isoform – Zellen (16).

Da diese neuen Erkenntnisse dazu beitragen könnten, die Pharmakotherapie mit rhGH zu individualisieren (66), soll im Rahmen dieser Doktorarbeit dieser Mechanismus an zwei klar definierten Gruppen erneut getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

2.1.1 Teilnahmevoraussetzungen und Ausschlusskriterien

Untersucht wurden 113 Kinder, die in den letzten 18 Jahren in der endokrino-logischen Abteilung der Universitäts – Kinderklinik Tübingen eine Wachstums-hormontherapie mit rekombinantem humanem Wachstumshormon (rhGH) er-halten hatten. Es wurden speziell zwei Gruppen genauer analysiert: UTS-Mädchen und SGA – Kinder.

Die klinischen Daten wurden aus den Patientenakten entnommen. Das sponta-ne Wachstum des Kindes vor der Therapie wurde über einen Zeitraum von mindestens neun Monaten dokumentiert und die elterliche Größe bei allen Pa-tienten gemessen. Drei Kinder waren adoptiert, so dass bei ihnen diese Anga-ben fehlen. Größe, Gewicht und die geschlechtsabhängige mittlere Größe der Eltern wurden in SDS Werte nach Prader et al. (46) umgerechnet. Für das Ge-wicht wurden die Referenz-Werte nach Freeman et al. (19) herangezogen.

Der Gößenzuwachs (delta height) entspricht der Differenz der Größe nach zwölf Monaten Therapie und der zu Beginn der Therapie. Genauso berechnet wurde der Gewichtszuwachs (delta weight). Die Zunahme der Größenwachstumsge-schwindigkeit (delta height velocity) ergab sich aus der Differenz der Geschwin-digkeit gemessen während der Therapie und der Geschwindigkeit bei Start der Therapie.

Die Therapie an sich wurde mit einer mittlere Dosis von 38 µg/kg pro Tag (+/-8) bei Turner- Kindern und 56 µg/kg pro Tag bei SGA – Kindern durchgeführt.

Die meisten der untersuchten Kinder kamen aus Deutschland, drei waren aus der Türkei, zwei griechischer und einer italienischer Abstammung.

Als allgemeine Ausschlusskriterien galten:

- Beginn der Pubertät am Anfang oder während des ersten Jahres der Therapie; Der Eintritt der Pubertät wurde definiert als Thelarche bei den Mädchen und ein testikuläres Volumen > 3 ml bei Jungen.
- Patienten, die älter als 14 und jünger als 3,5 Jahre waren;
- Oxandrolon-Therapie
- ein Wachstumshormon – Spitzenwert < 8 ng/ml im Serum bei zwei unabhängigen Untersuchungen;

Die Eltern / Pflegeeltern aller Patienten waren mit der Teilnahme an der Studie einverstanden. Der Antrag wurde der Ethikkommission vorgelegt und genehmigt.

2.1.2 UTS- Patientinnen

Dem Turner-Syndrom zugerechnet wurden Patientinnen mit einem fehlenden oder aberranten X-Chromosom. Insgesamt wurden die Daten von 53 Mädchen mit Turner – Syndrom untersucht. Die Verteilung der verschiedenen Karyotypen ist in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 2.1: Verteilung der UTS – Karyotypen.

Karyotyp	n=
45,X	27
45,X/46,Xi(Xq)	9
45,X/46,XX	6
45,X/46,XdelXq	4
46,Xi(Xq)	3
45,X/46,XdelXp	1
45,X/46,XrX	1
45,X/47,XXX	1

Die Mädchen waren zu Beginn der Therapie im Schnitt 8,89 Jahre alt. Die weiteren klinischen Charakteristika sind in Tabelle 3.2 im Ergebnisteil zusammengefasst.

2.1.3 SGA- Patienten

In dieser Gruppe wurden Kinder untersucht, die zu klein für ihr entsprechendes Gestationsalter waren (small for gestational age, SGA). Zu klein wurde definiert als eine Geburtslänge und / oder ein Geburtsgewicht, welche mindestens zwei SD – Werte unter dem Durchschnitt lagen nach Niclasson et al. (42). Außerdem musste die Größe bei Therapiestart nach Prader et al. (46) unter - 2 SDS liegen.

Es wurden die Daten von 60 SGA Kindern untersucht. Davon waren 38 Jungen und 22 Mädchen. Ihr Altersdurchschnitt lag bei 7,12 Jahren. Die mittlere Geburtslänge betrug - 2,96 SDS (+/- 1,27) und das durchschnittliche Geburtsgewicht betrug - 2,91 SDS (+/- 1,25). Die weiteren klinischen Charakteristika sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

2.1.4 Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe wurden weitere 62 Patienten analysiert und die Häufigkeit der einzelnen Genotypen bestimmt. Diese Kinder waren weder UTS – noch SGA – Patienten und hatten keine Wachstumshormontherapie erhalten.

2.2 Materialien und Bezugsquellen

2.2.1 Geräte

<u>Gerätenamen</u>	<u>Hersteller</u>
Latexhandschuhe	Kimberley – Clark
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Einmal-Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipetten:	Gilsen
P2, P20, P100, P200, P1000	
P0,5-10	
Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf

DNA-Extraktion:

Wasserbad	Memmert
Zentrifugen:	
Rotixa 50RS	Hettich Zentrifugen
Centrifuge 5415 C	Eppendorf
Spectrophotometer Gene Quant II	Pharmacia Biotech
Präzisionsküvetten	Hellma
Mikrowelle	Panasonic

PCR:

Clean bench Hera safe	Heraeus instruments
0,2 ml Thermo 8-Strip-tubes and domed cups	peqlab, Biotechnologie GmbH
Gene amp PCR System 9700	PE Applied Biosystems

Gelelektrophorese und Dokumentation:

Spannungsgerät power-pac 200	BIO-RAD
Schüttler KL2	Bühler Laborgeräte Tübingen
UV-Fluoreszenztisch 312nm	H.Saur, Laborbedarf Reutlingen
Polaroid (Kamera)	DUNCO
Geldokumentationssystem	Cybertech CS1

2.2.2 Reagenzien

Bezeichnung

Hersteller

Aqua bidest	
Ethanol PA zur Analyse	MERCK

DNA Extraktion:

NucleoSpin Blood XL	Machery-Nagel
Buffer BQ1	
Buffer BQ2 (konz.)	
Buffer BE	
Proteinase K (lyophilizid)	
Proteinase Buffer	
Columns	
Collection tubes	
Elution tubes (50 ml)	

PCR:

Taq PCR Core Kit:	Qiagen
QIAGEN PCR Buffer 10x	
Taq-DNA-Polymerase	
dNTP mix (10 mM each)	Promega
Primer:	
G1, G2, G3	GenBank™ accession number AF 155912 Synthese von MWG

Gelelektrophorese und Dokumentation:

Agarose 11404	SERWA
6x Ladepuffer	peqlab, Biotechnologie GmbH
100bp DNA-Leiter Plus	peqlab, Biotechnologie GmbH
10x TBE Puffer pH 8,0;1l:	
108g TRIS	
70,9g Borsäure	
7,44g EDTA-	Universitätsapotheke
Dinatrium-Dihydat	
Ethidium bromid	MERCK

2.3 Methoden

Den Patienten wurden im Rahmen der Routinekontrolle jeweils zusätzliche 10 ml Blut peripher abgenommen und bei – 20 °Celsius aufbewahrt. Aus dem wiederaufgetauten Blut wurde mit Hilfe des NucleoSpin Blood XL die DNA aus den Lymphozyten extrahiert und durch die Polymerase – Ketten – Reaktion spezifisch vervielfältigt. Die Gel – Elektrophorese diente zur Auftrennung der verschiedenen Fragmentlängen. Anhand der Verteilung der Fragmentlängen konnte der Genotyp jedes Patienten ermittelt werden.

Nachdem sowohl die Laborarbeit als auch die klinische Datensammlung unabhängig voneinander fertig gestellt worden waren, konnten die Ergebnisse miteinander verknüpft werden, um eine mögliche Verknüpfung des Genotyps und des Wachstumsverhaltens festzustellen.

2.3.1 DNA Extraktion

Durch die Inkubation (bei 56 °C für 15 min) der Blutprobe (5 ml) in einer Lösung aus Proteinase K (500 µl) und einer großen Anzahl chaotroper Ionen (5 ml Puffer BQ 1) wurde die Lysierung der Blutprobe erreicht.

In dieses Gemisch wurde nun Ethanol (5 ml, 96-100%) beigefügt um ideale Voraussetzungen für die Bindung der DNA an die Waschzettel der korrespondierenden NucleoSpin Blutbande zu schaffen. Für die Bindung an sich musste das Gemisch erst auf Raumtemperatur abkühlen, dann wurde es umgefüllt und 3 min bei 4000 x g zentrifugiert. Danach wurde das Filtrat in ein frisches Röhrchen geleert und erneut für 3 min bei 400 x g zentrifugiert. Der Bindungsprozess ist reversibel und spezifisch für Aminosäuren.

Die nun folgenden Waschschrte entfernten effizient eventuell vorliegende Kontaminationen. Die Waschung erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde dem Filtrat 7,5 ml Puffer BQ 2 beigefügt und das Gemisch 2 min bei 4000 x g zentrifugiert. Der zweite Schritt erfolgte wiederum mit 7,5 ml Puffer BQ 2, zentrifugiert wurde

10 min bei 4000 x g. Bei dieser verlängerten Zentrifugation wurde gleichzeitig die Silikonmembran getrocknet.

Um die hochgereinigte DNA herauszulösen wurde das gewaschene Filtrat in ein neues Röhrchen umgefüllt. Dann wurden 600 µl des auf 70 °C vorgewärmten Lösungspuffers BE beigemischt und bei Raumtemperatur 2 min inkubiert. Danach wurde noch einmal 2 min bei 40 x g zentrifugiert. So erhielt man am Ende der Extraktion 600 µl hochgereinigte DNA in leicht alkalischem Lösungspuffer.

2.3.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte spektrophotometrisch anhand der unterschiedlichen Absorptionsmaxima von DNA und Proteinen. Das Absorptionsmaximum der DNA liegt bei 260 nm, während das der Proteine bei 280 nm liegt. Als Reinheitsgrad der DNA bezeichnet man den Quotienten der beiden Absorptionsmaxima, wobei ein Wert zwischen 1,7 und 2,0 als optimal eingeschätzt wird. Liegt er unter 1,7, ist die Probe mit Proteinbestandteilen verunreinigt.

Zur photometrischen Messung wurden 50 µl der DNA-Pufferlösung zu 950 µl H₂O in eine Küvette gegeben. Die Extinktion wurde bei 260 nm und bei 280 nm gemessen. Zusätzlich wurde die 260/280 nm-Ratio bestimmt.

Die DNA-Menge wird wie folgt berechnet:

DNA-Konzentration (µg/µl): $A_{260} \times a \times b$;

a = 20 (Verdünnungsfaktor);

b = 0,05 µg/µl (molekularer Extinktionskoeffizient für Säuger – Doppelstrang – DNA)

2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Grundlagen der enzymatischen DNA – Amplifikation

Die Klonierung (spezifische Vermehrung) und Analyse bestimmter Genabschnitte wurde durch die Einführung der PCR möglich gemacht.

Benötigte Reagenzien:

- Oligonukleotid-Primer komplementär zu bekannten Sequenzen von sense- und antisense- Strang der zu amplifizierenden DNA, die diese auf gegenüberliegenden Strängen zwischen sich einschließen.
- Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)
- hitzestabile TAQ – DNA-Polymerase
- Reaktionspuffer
- die zu bestimmende DNA

Die DNA – Synthese erfolgt dem Zyklus entsprechend in drei Schritten. Nach der Hitzedenaturierung, das heißt der Zerlegung der Doppelstrang – DNA in Einzelstränge, wird durch Abkühlung des Reaktionsgemisches (Renaturierung) die Anlagerung der Primer an die komplementären DNA – Sequenzen erreicht (Annealing). Im letzten Schritt werden dann die dNTPs durch die Taq – Polymerase an die Primer angefügt. Die Reihenfolge der Anlagerung der unterschiedlichen dNTPs wird durch den vorliegenden DNA – Einzelstrang vorgegeben (Polymerisation der Extension) (17).

Dieser Zyklus wird 25 – 40 mal wiederholt, so dass nach n Zyklen $2^{(n)}$ Stränge pro DNA-Ausgangsstrang zur Verfügung stehen. Um die PCR überhaupt ausführen zu können, benötigt man die 5` - 3` - Aktivität der DNA – Polymerasen. Diese finden am freien 3` - Ende eines Doppelstranges einen Startpunkt, von dem aus die Synthese des neuen Komplementärstranges gestartet werden kann.

Lange Zeit stellte die hohe Temperatur, die zur Trennung des neuen Stranges benötigt wurde, ein großes Problem dar, da dadurch die Polymerase inaktiviert wurde. Erst mit Entdeckung der Taq-Polymerase (nach *Thermophilus aquadiscus*, einem thermophilen Bakterium), die bei 72 °C ihre maximale Effizienz ent-

wickelt, konnte die PCR in großem Stil angewandt werden. Selbst bei Temperaturen von 95 ° C, die zur Denaturierung benötigt werden, kommt es zu keiner Aktivitätsminderung (30, 59, 64, 31).

Durchführung der PCR

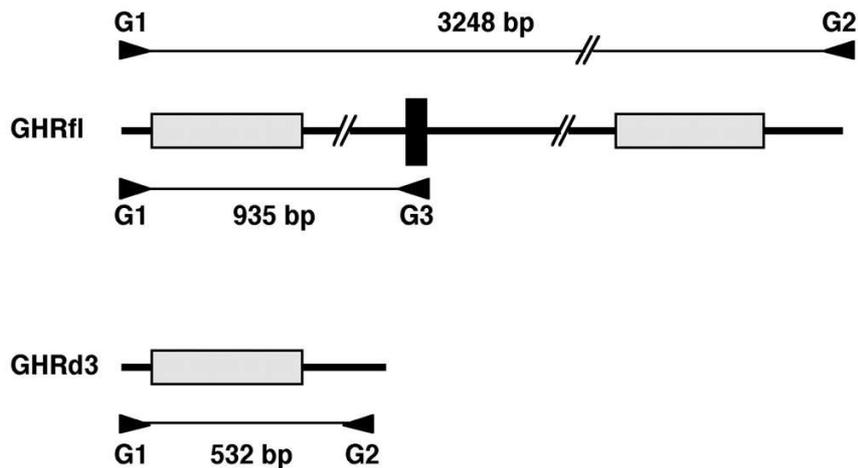
Um den GHR – Exon 3 – Bereich zu genotypisieren, wurde der von Pantel et al. (43) publizierte PCR multiplex assay verwandt. Der Reaktionsansatz von 50 µl enthielt dabei 0,6 µl 300 µmolarer dNTPs, 1 µl der Taq-Polymerase, 10,4 µl destilliertes Wasser, jeweils 10 µl der drei 5 µmolaren Primer G1, G2, G3 und 5 µl des 10 x Puffers. Diesem Ansatz wurden 3 µl der 100 µmolaren DNA-Probe beigefügt.

Zur Prophylaxe vor Kontamination mit Fremd – DNA wurde während des Pipetierens an der clean bench mit Laborhandschuhen, eigens dafür vorgesehenen Pipetten und Einmalpipettenspitzen gearbeitet. Auch wurden die Fertigstellung des Reaktionsgemisches und das Hinzufügen der DNA an getrennten Arbeitsplätzen durchgeführt. In jeder PCR – Reihe wurde eine Negativkontrolle mitamplifiziert, die nur den Reaktionsansatz enthielt.

Um die Häufigkeit der GHRd3 – und GHRfl – Allelverteilung herauszuarbeiten, wurde ein von Pantel et al entwickelter PCR multiplex assay verwandt (43). Bei dieser PCR macht man sich die Tatsache zu Nutzen, dass das Exon 3 beidseits von retroviralen, sich wiederholenden Abschnitten (long terminal repeat fragments, LTR – Fragmente) flankiert wird (siehe Abbildung 2.1). So beinhaltet das GHRfl – Allel sowohl das Exon 3 (schwarzer Kasten), als auch die beiden LTR – Elemente (grauer Kasten). Das GHRd3 – Allel dagegen hat nur ein LTR – Fragment.

Es wurden drei Primer benutzt (G1, G2, G3): Ein gegenläufiger Primer G3, der im Exon 3 lokalisiert ist, und ein Primer – Paar G1 und G2, welches sowohl das einzelne LTR – Fragment auf dem GHRd3 – Allel klammert, als auch die zwei repetitiven Elemente des GHRfl – Allels. Unter spezifischen, experimentellen Bedingungen (s.u.) ließ sich so mit den Primern G1 und G2 das GHRd3 – Allel und mit den Primern G1 und G3 das GHRfl – Allel amplifizieren.

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des multiplex assays zur Differenzierung des fl – Allels vom d3 – Allel. Der schwarze Kasten entspricht dem Exon 3, die grauen Kästen den repetitiven Elementen. Die Pfeile zeigen die Leserichtung der unterschiedlichen Primer G1, G2 und G3 an.



G1, G2, G3 = Primer
 Bp = Basenpaare

Amplifikations – Programm:

Hot start;
 Initialen Denaturierung: 94° C, 5 min;
 Programm über 35 Zyklen: 94° C, 30s; 60° C, 30s;
 72° C, 90s ;
 Terminale Extension: 72° C, 7 min;

2.3.4 Analyse der PCR-Produkte

Agarosegel – Elektrophorese

Bei der vorliegenden Untersuchung wurde ein 1% Agarose – Gel verwandt. dafür wurden 0,5g Agarose mit 50 ml Puffer angesetzt. Als Puffer diente 10x TBE pH 8,0 (108g TRIS, 70,9 g Borsäure und 7,44 g EDTA-Dinatrium-Dihydat auf 1000

ml), der mit destilliertem Wasser auf 1x TBE verdünnt wurde. Das Gemisch wurde erhitzt und danach in Form gegossen.

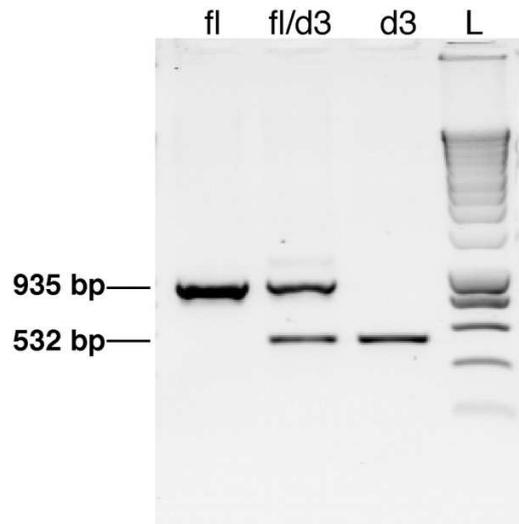
Dann wurden in die Geltaschen jeweils 10 µl des PCR-Produktes pipettiert. Zu jeder Probe wurde 1 µl des 6x Ladepuffers beigefügt. Als Längenstandard diente die peqGOLD 100 bp DNA-Leiter plus (0,5 mg DNA/ml). 100 µl dieser Leiter wurden mit 100 µl 6x Ladepuffer und 400 µl H₂O 1:6 verdünnt. Von dieser Mischung wurden 10 µl in die erste Geltasche pipettiert. Dann wurde Gleichstrom einer Spannung von 160 Volt über den Zeitraum von 50 Minuten angelegt. Nach dieser Zeit hatten sich die unterschiedlich langen Genfragmente aufgetrennt.

Ethidiumbromidfärbung

Das Gel wurde 10 min mit Ethidiumbromid angefärbt und auf einem Fluoreszenz-Tisch, der die angefärbten, amplifizierten PCR – Produkte mittels UV-Licht (312 nm) sichtbar werden lässt, mit einer Polaroid-Kamera fotografiert. Durch die genau definierte DNA-Leiter konnte jedes Fragment einer spezifischen bp – Bande zugeordnet werden.

Durch die unterschiedlichen Längen konnte eine Aussage über die Sequenz des zu untersuchenden Genabschnittes gemacht werden. So entspricht eine Länge von 532 bp einem Genfragment mit Deletion im Exon 3 (d3) und eine Länge von 935 bp dem Vorliegen eines kompletten (full length, fl) Rezeptors (siehe Abbildung 2.2). Treten bei einer Person beide Fragmentlängen auf, so ist diese heterozygot für den Abschnitt. Mit Hilfe der so dokumentierten Werte konnte jedem Patienten ein Genotyp zugeordnet werden.

Abbildung 2.2: Dokumentation der Ergebnisse durch Gelelektrophorese. Bande des fl – Rezeptors bei 935 bp, Bande des d3 – Rezeptors bei 532 bp.



bp = Basenpaare
L = definierter DNA – Leiter

2.3.5 Erfassung der Patientendaten

Wachstums – Prädiktion

Für jedes Kind wurde eine Wachstumsvorhersage nach Ranke et al. (52, 53) für das erste Jahr der Wachstumshormontherapie berechnet. Die prognostisch wichtigsten Faktoren dieses Vorhersagemodells sind die Dosis des humanen rekombinanten Wachstumshormons (rhGH), das Alter und Gewicht bei Start der Therapie (angegeben in SDS nach Freeman et al. (53)), sowie die geschlechtsangepasste mittlere Größe der Eltern (MPH) bei den SGA – Kindern bzw. der Abstand zur MPH bei den Turner – Mädchen (angegeben in Größen SDS nach Tanner et al. (19, 65)).

Die Gleichung der Wachstumsvorhersage für das Turner – Syndrom lautet:

$$\begin{aligned} &\text{Wachstum im ersten Therapiejahr (cm)} \\ &= 8,1 + [2,2 \times \text{rhGH Dosis (In; IU/kg pro Woche) }] \\ &\quad + [-0,3 \times \text{Alter zu Therapiebeginn(in Jahren)}] \\ &\quad + [0,4 \times \text{Körpergewicht SDS zu Therapiebeginn}] \\ &\quad + [-0,2 \times (\text{Größen SDS} - \text{MPH SDS})] \\ &\quad + [0,1 \times \text{Anzahl der Injektionen pro Woche}] \\ &\quad + [1,6 \times (\text{Oxandrolon} = 1; \text{kein Oxandrolon} = 0)] \end{aligned}$$

Die Gleichung der Wachstumsvorhersage für SGA – Kinder lautet:

$$\begin{aligned} &\text{Wachstum im ersten Therapiejahr (cm)} \\ &= 9,4 + [56,51 \times \text{rhGH Dosis (mg/kg proTag)}] \\ &\quad + [-0,31 \times \text{Alter zu Therapiebeginn (in Jahren)}] \\ &\quad + [0,3 \times \text{Körpergewicht SDS zu Therapiebeginn}] \\ &\quad + [0,11 \times \text{MPH SDS}] \end{aligned}$$

Die individuelle Abweichung von der Vorhersage wurde dann durch die Standardabweichung aller Abweichungen geteilt. Dieser beträgt 1,26 cm für das Turner Syndrom und 1,30 cm für die SGA – Formel (52, 53).

Das Ergebnis entspricht den Studentized Residuals. Beträgt der Wert eines Studentized Residuals 0, bedeutet dies, dass die Vorhersage genau erfüllt wurde. Positive Werte ergeben sich, wenn das Wachstum die Vorhersage überschreitet, negative Werte, wenn das Wachstum hinter der Vorhersage zurückbleibt.

Hormonkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration des humanen Wachstumshormons im Serum wurde mit Hilfe eines polyklonalen RIAs im Haus bestimmt und nach den WH International Reference Preparation 88/624 (1 mg = 3 IU) kalibriert. Die untere Nachweisgrenze

lag bei 0,1 µg/l. Der mittlere Variationskoeffizient innerhalb eines Assays betrug 6,9 %, der zwischen den Assays 9,5 % (23).

Die Serumkonzentration von IGF-I und IGFBP 3 wurden beide mittels des RIAs, beschrieben bei Blum et al., bestimmt (10, 9). Der mittlere Variationskoeffizient innerhalb und zwischen den RIAs lag bei den IGF-I Werten bei kleiner 10 %. Für die IGFBP 3 Werte lag er innerhalb der Assays bei 4,1 %, zwischen den Assays bei 9,7%. Die alters- und geschlechtsabhängigen IGF-I – und IGFBP 3 – Werte der Kinder wurden in SDS angegeben. Die Differenzen der Serumkonzentrationen nach zwölf Monaten und zu Beginn der Therapie wurden berechnet.

2.3.6 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Student – t – Tests.

Soweit nichts anderes angegeben sind die Ergebnisse in den Tabellen als Mittelwert dargestellt. Die Standardabweichung des Mittelwerts ist in Klammern beigefügt.

P – Werte < 0.05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Verteilung der Genotypen

Die mit Hilfe der PCR vervielfältigte DNA wurde auf einem Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in die erwarteten Längen von 935 beziehungsweise 532 Basenpaaren. Dies ermöglichte eine genaue Unterscheidung des kompletten Wachstumshormonrezeptors (935 BP) von dem durch die Deletion des Exons 3 verkürzten Wachstumshormonrezeptors (532 BP). So konnte jedem Patienten einer der möglichen Genotypen fl/fl, d3/fl, d3/d3 zugeordnet werden.

Die Verteilung der Genotypen bei den 176 getesteten Kindern differierte nicht signifikant zwischen den UTS – Mädchen, den SGA – Kindern und den Kontrollen (siehe Tabelle 3.1). Die Allelhäufigkeit betrug für den kompletten Rezeptor 66% und für den verkürzten Rezeptor 33%.

Tabelle 3.1 : Verteilung der Genotypen des humanen Wachstumshormonrezeptors am Exon 3 Locus; angegeben in Prozent.

		fl/fl	d3/fl	d3/d3
Turner Syndrom	n= 53	50	30	20
SGA	n= 60	48	38	14
Kontrollen	n= 62	45	40	15
Gesamt	n= 175	48	36	16

3.2 UTS- Patientinnen

3.2.1 Klinische Charakteristika vor Therapie

Tabelle 3.2 : Anthropometrische Daten der UTS – Mädchen vor Beginn der Wachstumshormontherapie.

GHR Genotyp	gesamtes Patientengut	fl/fl	d3/fl	d3/d3	
n	53	27	15	11	
Alter	a	8.89 (3.09)	9.08 (2.91)	8.89 (3.41)	8.40 (3.30)
Größe	SDS	3.21 (1.02)	-3.12 (1.14)	-3.10 (0.89)	-3.58 (0.85)
HV	cm/a	4.19 (1.31)	4.34 (1.48)	4.17 (1.22)	3.88 (0.98)
MPH	SDS	0.36 (1.27)	0.72 (1.07)	0.13 (1.48)	-0.16 (1.26)*
Gewicht	SDS	-1.66 (1.34)	-1.42 (1.38)	-1.72 (1.04)	-2.15 (1.55)

HV = Height velocity = Wachstumsgeschwindigkeit

MPH = midparental height = Mittlere Größe der Eltern

*P = 0.037 (d3/d3 versus fl/fl)

Tabelle 3.2 zeigt die Wachstumsparameter der UTS – Mädchen vor Beginn der Therapie mit rekombinantem humanem Wachstumshormon. Zwischen den drei Gruppen gab es bei der Größe der Kinder, sowie bei der spontanen Wachstumsgeschwindigkeit keine signifikanten Unterschiede.

Lediglich die geschlechtsangepasste mittlere Größe der Eltern (MPH) war in der d3/d3 – Gruppe (Mittelwert - 0.16) im Vergleich zur fl/fl – Gruppe (Mittelwert 0.72) deutlich geringer (P = 0.037).

Tabelle 3.3 : IGF – Werte der UTS- Mädchen vor Beginn der Wachstumshormontherapie.

GHR Genotyp		gesamtes Patientengut	fl/fl	d3/fl	d3/d3
IGF-1	SDS	-1.36 (1.10)	-1.45 (1.02)	-1.11 (1.09)	-1.55 (1.56)
IGFBP-3	SDS	0.12 (1.12)	-0.08 (1.01)	0.53 (1.22)	-0.03 (1.33)

Die IGF-I – und IGFBP 3 – Werte (angegeben in SDS) vor Beginn der Wachstumshormontherapie, welche in der Tabelle 3.3 dargestellt sind, zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

3.2.2 Klinische Charakteristika nach einem Jahr Therapie

Tabelle 3.4: Anthropometrische Daten der UTS-Mädchen nach einem Jahr der Wachstumshormontherapie.

GHR Genotyp		gesamtes Patientengut	fl/fl	d3/fl	d3/d3
rhGH Dosis	µg/kg*d	38 (8)	39 (8)	37 (9)	39 (8)
ΔGröße	SDS	0.49 (0.38)	0.47 (0.37)	0.50 (0.41)	0.55 (0.38)
ΔHV	cm/a	3.35 (1.64)	2.84 (1.54)	3.35 (1.45)	4.59 (1.54)* 1,2,3
Stud. Residuals	SDS	-0.03 (1.05)	-0.42 (0.90)	0.07 (1.08)	0.75 (0.95)*4,5
ΔGewicht	SDS	0.24 (0.48)	0.11 (0.55)	0.36 (0.29)	0.41 (0.44)

rhGH = rekombinantes humanes Wachstumshormon

HV = Height velocity = Wachstumsgeschwindigkeit

*1 P = 0.0031 (d3/d3 versus fl/fl)

*2 P = 0.048 (d3/ d3 versus d3/fl)

*3 P = 0.019 (d3/d3 + d3/fl versus fl/fl)

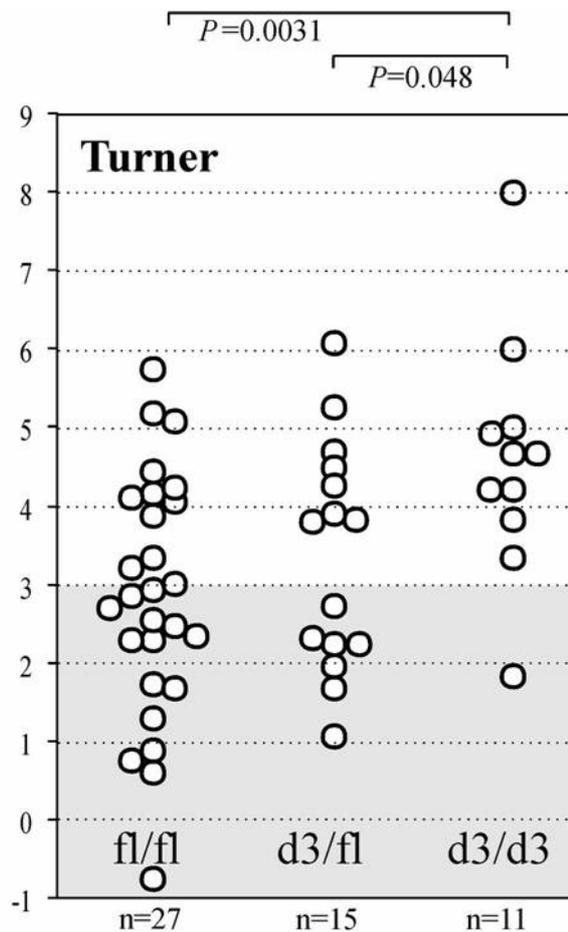
*4 P = 0.0012 (d3/d3 versus fl/fl)

*5 P = 0.007 (d3/d3 + d3/fl versus fl/fl)

Die Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit unter Hormontherapie war in der d3/d3 – Gruppe deutlich höher als in der fl/fl – bzw der fl/d3 – Gruppe ($P = 0.0031$ für d3/d3 versus fl/fl; $P = 0.048$ für d3/d3 versus d3/fl) (vergleiche Abbildung 3.1).

Eine Signifikanz ($P = 0,019$) ergab sich außerdem beim Vergleich der beiden Gruppen mit d3 – Allel (d3/d3 und d3/fl) mit der homozygoten fl – Gruppe.

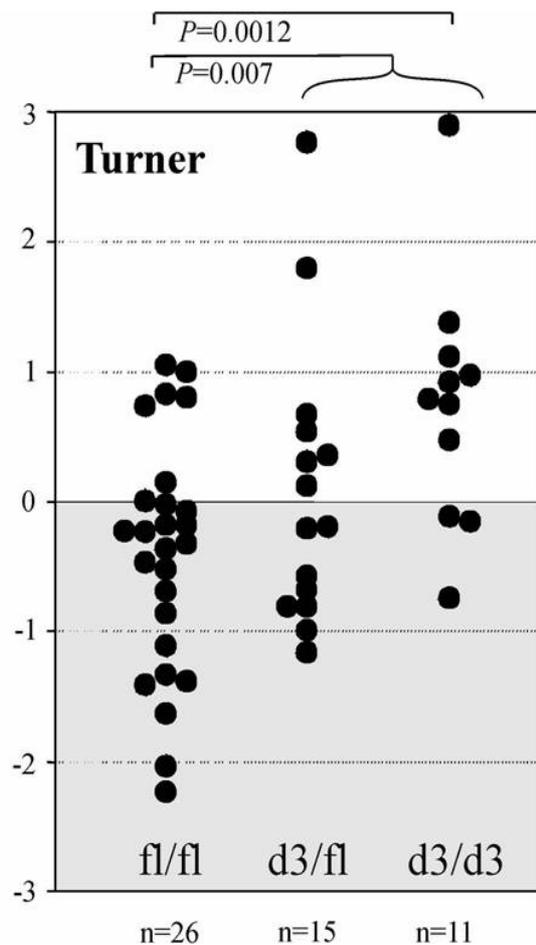
Abbildung 3.1: Auswirkung der Hochdosis rhGH – Therapie. Die Y- Achse entspricht der Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit, jeder Kreis repräsentiert einen Patienten.



Betrachtet man nun die mit der in 2.2.5 aufgeführten Wachstums – Prediktion (Lit.1) errechneten Studentized Residuals, erkennt man einen deutlichen Unterschied zwischen den Gruppen. Die Werte lagen in der d3/d3 – Gruppe (0.75) deutlich höher als in der fl/fl – Gruppe (- 0.42) ($P = 0.0012$). Außerdem wurde die Wachstumsprognose bei sieben der elf d3/d3 – Mädchen um mehr als 0.5 überschritten.

Dieser Unterschied wurde auch dann signifikant, als alle Mädchen mit einem d3 – Wachstumshormonrezeptorallel (d3/d3 und d3/fl) (0.36) mit der fl/fl – Gruppe (- 0.42) verglichen wurden ($P = 0.007$) (vergleiche Abbildung 3.2).

Abbildung 3.2: Auswirkung der Hochdosis rhGH- Therapie. Die Y- Achse gibt die Studentized Residuals an, jeder Kreis repräsentiert einen Patienten.



Der Gewichts- und der Größenzuwachs während der Wachstumshormontherapie erreicht dagegen keine signifikante Differenz zwischen den drei Genotypen.

Tabelle 3.5 : IGF – Werte der UTS – Mädchen nach einem Jahr der Wachstumshormontherapie

GHR Genotyp			gesamtes Patientengut	fl/fl	d3/fl	d3/d3
Δ IGF-	1	SDS	1.71 (1.02)	1.71 (1.21)	1.66 (0.99)	1.80 (0.46)
Δ IGFBP-	3	SDS	1.19 (1.09)	1.25 (1.19)	0.86 (1.07)	1.50 (0.81)

Die Steigerung der IGF-I – und IGFBP 3 – Werte der UTS – Mädchen (angegeben in SDS) weisen nach einjähriger Therapie keine signifikante Differenz zwischen den verschiedenen Genotypen auf.

3.3 SGA- Patienten

3.3.1 Klinische Charakteristika vor Therapie

Tabelle 3.6 : Anthropometrische Daten der SGA – Kinder vor Beginn der Wachstumshormontherapie.

GHR Genotyp		gesamtes Patientengut	fl/fl	d3/fl	d3/d3
n		60	29	23	8
Geschlecht	m/w	38/22	17/12	17/6	4/4
Alter	a	7.12 (2.28)	6.91 (2.24)	7.55 (2.56)	6.64 (1.50)
Geburtslänge	cm	38.2 (12.4)	40.4 (8.9)	35.4 (15.1)	43.0 (2.9)
Geburtslänge	SDS	-2.96 (1.27)	-2.88 (1.37)	-3.25 (1.25)	-2.52 (0.87)
Geburtsgewicht	g	1821 (657)	1900 (710)	1694 (627)	1899 (550)
Geburtsgewicht	SDS	-2.91 (1.25)	-2.66 (1.31)	-3.28 (1.22)	-2.75 (0.96)
Größe	SDS	-3.41 (0.94)	-3.58 (1.06)	-3.22 (0.84)	-3.33 (0.71)
HV	cm/a	5.24 (1.25)	5.28 (1.21)	5.09 (1.34)	5.53 (1.22)
MPH	SDS	0.08 (1.03)	0.06 (1.11)	0.27 (0.97)	-0.38 (0.64)
Gewicht	SDS	-3.87 (1.71)	-3.97 (2.02)	-3.74 (1.36)	-3.85 (1.55)

HV = Height velocity = Wachstumsgeschwindigkeit

MPH = midparental height = Mittlere Größe der Eltern

Es ergab sich zwischen den einzelnen Genotypen keine signifikante Differenz für Größe, spontane Wachstumsgeschwindigkeit und geschlechtsangepasste mittlere Größe der Eltern.

Tabelle 3.7 : IGF – Werte der SGA – Kinder vor Beginn der Wachstumshormontherapie.

GHR Genotyp		gesamtes Patientengut	fl/fl	d3/fl	d3/d3
IGF-1	SDS	-0.96 (1.35)	-1.18 (1.52)	-0.79 (1.15)	-0.63 (1.26)
IGFBP-3	SDS	0.59 (1.12)	0.54 (1.23)	0.56 (1.08)	0.82 (0.88)

Die IGF-I – und IGFBP 3 – Werte der SGA – Kinder vor Beginn der Wachstumshormontherapie, aufgezeigt in Tabelle 3.7, weisen keine relevanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auf.

3.3.2 Klinische Charakteristika nach einem Jahr Therapie

Tabelle 3.8 : Anthropometrische Daten der SGA – Kinder nach einem Jahr Therapie – im Gesamten und aufgeteilt nach dem Wachstumshormonrezeptorgenotyp.

GHR Genotyp		gesamtes Patientengut	fl/fl	d3/fl	d3/d3
rhGh Dosis	µg/kg*d	56 (11)	56 (13)	57 (9)	52 (11)
ΔGröße	SDS	0.86 (0.35)	0.82 (0.31)	0.88 (0.39)	0.98 (0.34)
ΔHV	cm/a	3.84 (1.73)	3.44 (1.62)	4.34 (1.85)	3.88 (1.56)
Stud. Residuals	SDS	-0.05 (1.06)	-0.36 (1.11)	0.27 (1.03)	0.26 (0.66)*1,2
ΔGewicht	SDS	0.91 (0.59)	0.80 (0.55)	1.00 (0.69)	1.05 (0.38)

rhGH = rekombinantes humanes Wachstumshormon

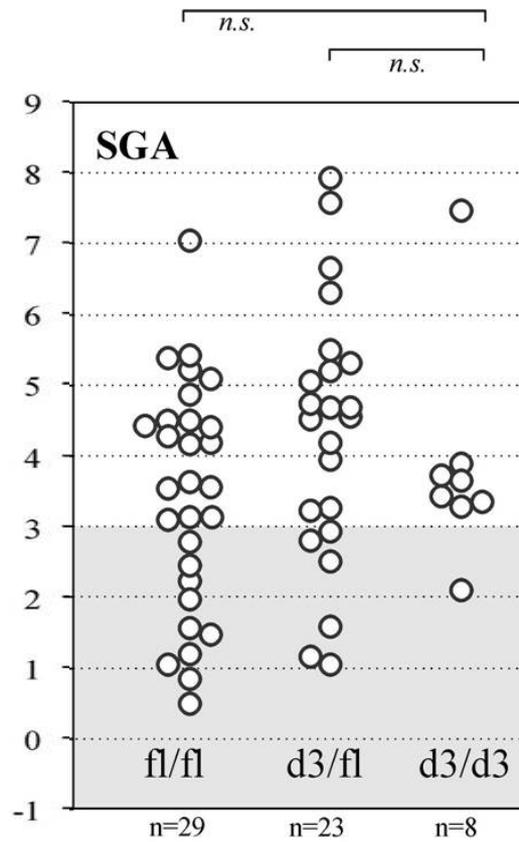
HV = Height velocity = Wachstumsgeschwindigkeit

*1 P = 0.023 (d3/d3 + d3/fl versus fl/fl)

*2 P = 0.047 (d3/fl versus fl/fl)

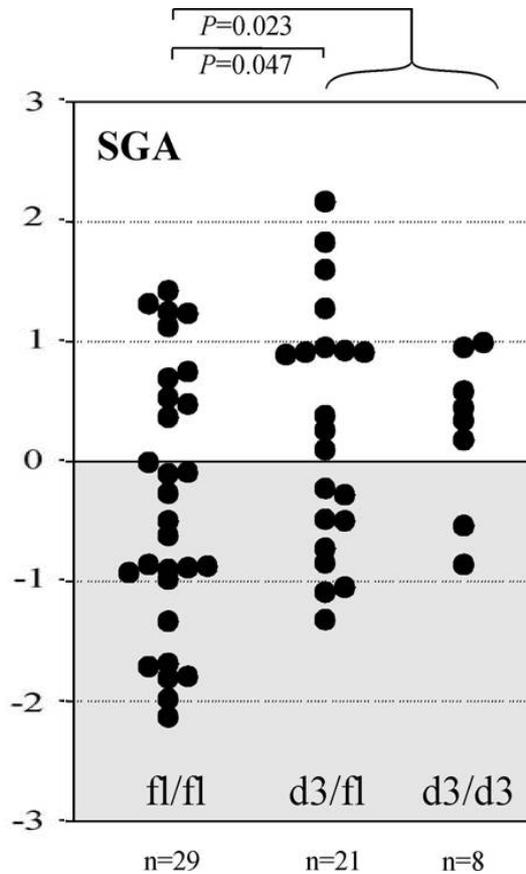
Die mittlere Wachstumsgeschwindigkeitszunahme wies zwar in den Gruppen d3/fl und fl/fl höhere Werte auf, erreicht aber mit einem $P = 0.067$ keine statistische Signifikanz (vergleiche Abbildung 3.3).

Abbildung 3.3: Auswirkungen der Hochdosis rhGH – Therapie. Die Y- Achse entspricht der Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit, die Kreise repräsentieren jeweils einen Patienten.



Nimmt man die Gruppen d3/d3 und d3/fl zusammen, so erhält man deutlich höhere Studentized Residuals (0.27) als in der fl/fl – Gruppe (- 0.36) ($P = 0.023$). Ebenfalls signifikant ist der Vergleich d3/fl und fl/fl ($P = 0.047$) (vergleiche Abbildung 3.4). Für die kleine Gruppe der d3/d3 – Kinder konnte gegenüber den fl/fl – Kindern keine Signifikanz festgestellt werden.

Abbildung 3.4 Auswirkung der Hochdosis rhGH- Therapie. Die Y- Achse gibt die Studentized Residuals an, jeder Kreis repräsentiert einen Patienten.



Der Gewichts- und Größenzuwachs nach einem Jahr der Wachstumshormontherapie war – genau wie bei den UTS-Mädchen – zwischen den drei Genotypen nicht so unterschiedlich, dass sich daraus eine Signifikanz ergeben hätte.

Tabelle 3.9 : IGF – Werte der SGA- Kinder nach einem Jahr Therapie – im Gesamten und aufgeteilt nach dem Wachstumshormonrezeptorgenotyp.

GHR Genotyp			gesamtes Patientengut	fl/fl	d3/fl	d3/d3
ΔIGF-	1	SDS	1.89 (1.07)	2.12 (1.15)	1.72 (0.98)	1.53 (0.93)
ΔIGFBP-	3	SDS	1.38 (0.95)	1.41 (1.03)	1.30 (0.94)	1.52 (0.80)

In der Differenz der IGF – Werte nach einem Jahr der Therapie minus der Werte vor Therapie ergab sich in den einzelnen Gruppen der drei Genotypen kein signifikanter Unterschied.

4 Diskussion

4.1 Relevanz

Der effektive Größenzuwachs kleiner Kinder unter Hochdosis rhGH – Therapie wird durch verschiedene Faktoren bestimmt, die die Wachstumshormonsensitivität beeinflussen. Dazu gehören einerseits verschiedene Genloci, die mit der GH – IGF-I – Signalkaskade in Verbindung stehen und andererseits die Reaktion der epiphysären Wachstumsplatte (58, 8). Das genaue Verständnis der Pharmakogenetik des Wachstumshormons soll dazu beitragen, die Polymorphismen dieser Genloci mit dem jeweils unterschiedlichen therapeutischen Ansprechen auf das Wachstumshormon in Verbindung bringen zu können. Darüber hinaus sollte es unter idealen Bedingungen die Vorhersage des Benefits, entstehend durch die Wachstumshormontherapie, verbessern (66). In dieser Arbeit wurde durch die pharmakogenetischen Daten deutlich die Relevanz des Wachstumshormonrezeptorgenotyps gezeigt, auch wenn diese gruppen-spezifisch erscheint.

4.2 Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit

4.2.1 UTS – Mädchen

Die Mädchen mit Turner Syndrom sind eine spezifische Untergruppe kleiner Kinder, die einen hauptsächlich Kleinstwuchs des Skeletts in Verbindung mit Gonadendysgenese aufweisen (54). In dieser Gruppe wurden bisher noch keine Studien bezüglich der Einflussnahme des Rezeptorproteinpolymorphismus auf das Outcome der rhGH – Therapie durchgeführt. Sie ist deshalb besonders interessant, weil ihr im Gegensatz zu der SGA – und ISS – Gruppe eine homogene Ursache als Grund für den Kleinstwuchs zugeordnet werden kann. Somit sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass weitere Faktoren für eine unterschiedliche Reaktion auf die Hormontherapie verantwortlich sein können.

Bei dieser homogenen Gruppe lässt sich der unterschiedliche Effekt des von Wachstumshormons am stärksten beobachten. So zeigten die Mädchen, welche homozygot für die d3 – GHR Variante waren, die größte Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit (4,59 cm/a). Verglichen damit, wies die heterozygote Gruppe ein mittleres Wachstum unter GH – Therapie auf (3,35 cm/a), während die fl/fl – Gruppe deutlich hinter den beiden anderen zurück blieb (2,84 cm/a). Insgesamt lässt sich der zusätzliche Größenzuwachs der d3 – Gruppe mit 1,5 cm im ersten Jahr der Wachstumshormontherapie abschätzen.

Betrachtet man nicht die Unterschiede der Wachstumsgeschwindigkeit, sondern errechnet man für die einzelnen Mädchen eine Wachstumsprognose und vergleicht diese nach dem ersten Jahr mit der tatsächlich erreichten Größe, zeichnen sich noch deutlichere Unterschiede ab. In diese Wachstumsprognose ging das Alter, die rhGH – Dosis, die Größe, das Gewicht der Kinder und die geschlechtsangepasste mittlere Größe der Eltern mit ein (52). Die unterschiedlichen Wachstumshormonrezeptorgenotypen sind in diesen Daten nicht repräsentiert.

Die d3 – Gruppe überschritt ihre Prognose deutlich (+ 0,75). Die heterozygote Gruppe ergab ein mittleres Ergebnis (0,07) und die fl – Gruppe blieb klar hinter dem erwarteten Wert zurück (- 0,42). Dieses Resultat zeigt, dass der fl/d3 – Genotyp ein wichtiger Faktor ist, der das Outcome der Therapie beim Ullrich – Turner – Syndrom entscheidend mitbeeinflusst.

Diese Ergebnisse weisen deutlich darauf hin, dass die Reaktion auf Wachstumshormone abhängig von der Anzahl der vorliegenden d3 GHR – Allele ist. Außerdem besteht eine Übereinstimmung mit Ergebnissen von in vitro Untersuchungen, in denen Wachstumshormonrezeptoren vom d3 – Genotyp eine höhere Bioaktivität aufweisen als die fl – Rezeptoren (s.u.) (16).

4.2.2 SGA – Kinder

Als zweite Gruppe wurden SGA – Kinder getestet. Diese Kinder zeigten zwar auch einen Trend zur vermehrten Antwort auf eine Hochdosis – Wachstumshormontherapie bei Vorliegen eines d3 – GHR – Allels, allerdings ist der Effekt nicht so deutlich wie bei den Turner – Mädchen.

Der mittlere Wachstumsgeschwindigkeitszuwachs der d3 – GHR – Träger war größer als der der fl – Gruppe. Am höchsten war die Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit bei der heterozygoten Gruppe (4,34 cm/a), der Wert erreicht allerdings keine Signifikanz.

Ein deutlicherer Unterschied zwischen den Genotypen trat auf, berechnete man mit Hilfe der Prediktionsmodelle (52) die Studentized Residuals. Vergleicht man die erwarteten Größen mit den tatsächlichen, sieht man einen signifikanten Unterschied zwischen den Trägern eines (d3/fl vs fl/fl: $P = 0,047$) oder zweier d3 – GHR – Allele (d3/d3 + d3/fl vs fl/fl: $P = 0,023$) und der homozygoten fl – Gruppe. Die fl – Gruppe blieb deutlich hinter den errechneten Größen zurück (-0,36 SDS), während die beiden anderen Gruppen eine Überschreitung der erwarteten Größe um 0,26 SDS und 0,27 SDS aufzeigten. Betrachtet man allerdings die zwei d3 – Allel – Träger beinhalteten Gruppen, so ergibt sich hier nicht der erwartete Unterschiede zwischen der d3 – homozygoten und der heterozygoten Gruppe. Vielmehr kamen beide Gruppen auf ein nahezu gleiches Ergebnis. Grund dafür könnte die geringe Anzahl an d3/d3 – Kindern sein.

Insgesamt betrachtet liegt der Schluss nahe, dass das d3 – Allel eine deutlich stärkere Reaktion auf das Wachstumshormon entwickelt. Allerdings, waren die Unterschiede zwischen der berechneten und der tatsächlichen Größen nur etwa halb so groß wie bei den Turner – Mädchen.

Die Ursachen des intrauterinen Kleinwuchses sind vielfältig (siehe Abbildung 1.3) (34, 1). Nicht immer kann dem Kleinwuchs die einzelne Krankheitsursache zugeordnet werden. Dies führt dazu, dass die SGA – Gruppe an sich heterogener ist als die UTS – Gruppe und damit mehr unbekannte Variablen bleiben, die

einen Einfluss auf die Größenentwicklung unter Wachstumshormontherapie haben könnten.

Dies könnte eine mögliche Ursache für das nicht ganz so eindeutige Ergebnis der Gruppe sein.

Die Größenzunahme während einer Hochdosis rhGH – Therapie könnte außerdem von unterschiedlichen spezifischen Mechanismen, welche mit dem SGA – Kleinwuchs in Verbindung stehen, abhängig sein. Zum Beispiel könnte dieser Größenzuwachs bei primären IGF – 1 Mangel nur gering oder überhaupt nicht vorhanden, bei IGF – 1 Resistenz, wie zum Beispiel bei Defekten der epiphysären Wachstumsplatte, dafür stärker ausgeprägt sein.

4.3 Vergleich mit Dos Santos et al.

Möchte man nun die Ergebnisse unserer Arbeit mit denen der Dos Santos – Arbeitsgruppe vergleichen, muss der unterschiedliche Gruppenaufbau berücksichtigt werden. So lassen sich die ISS/SGA – Kinder nicht mit unserer UTS – Mädchen vergleichen. Auch die Kohorte 2 der Dos Santos – Gruppe kann wegen der deutlich niedrigeren Menge an verabreichtem Wachstumshormon nicht zum Vergleich mit unserer SGA – Kindern herangezogen werden.

Betrachtet man nun die Ergebnisse unserer SGA – Gruppe, im Vergleich mit der ISS/SGA – Kohorte 1 so ergeben sich deutliche Unterschiede. Während in unserer Arbeit die Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit im ersten Therapiejahr für die ganze Gruppe unabhängig vom WHR – Genotyp bei 3,84 cm/a lag, ergab sich bei der Dos Santos – Kohorte 1 fast derselbe Wert (3,64 cm/a) nur für die fl/fl – Kinder und für die ganze Kohorte ein Wert von 5,49 cm/a.

Geht man dann genauer auf die einzelnen Genotypen der Kohorte 1 der Dos Santos – Gruppe und unserer SGA – Gruppe ein, sieht man bei der SGA/ISS – Gruppe eine Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit abhängig von der Anzahl der vorliegenden d3 – Allele: Der homozygote d3 – Genotyp wächst am

besten (6,54 cm/a Kohorte 1), dann die heterozygote Gruppe (6,30 cm/a Kohorte 1) und am langsamsten die fl – Gruppe (3,64 cm/a Kohorte 1).

Bei unserer reinen SGA – Gruppe dagegen wuchs die heterozygote Gruppe am besten (4,34 cm/a), dann die homozygote d3 – Gruppe mit 3,88 cm /a und wie bei der Dos Santos – Gruppe die fl – Gruppe mit 3,44cm/a am Schluss.

Insgesamt wuchsen unsere Kinder deutlich weniger schnell als die Dos Santos-Kinder. So wurden in unserer Arbeit nur fünf SGA – Kinder beobachtet, die eine Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit von 6,30 cm/a zeigten, während die Dos Santos – Gruppe diesen Wert als mittlere Zunahme in der d3/fl – und d3/d3 – Gruppe der Kohorte 1 angab.

Überlegt man sich nun, wie es zu diesen deutlichen Unterschieden kommt, ist es wichtig, die zwei Studiengruppen genauer zu vergleichen. Die entscheidenden Faktoren sind hierbei die Art und Dosierung der Therapie, sowie die Patienten.

Die Therapie erfolgte in beiden Gruppen mit rhGH und die Dosierung des Wachstumshormons der Kohorte 1 (51 µg/kg/d) der Dos Santos – Studie entsprach annähernd der Dosierung unserer Kinder (56 µg/kg/d). Die Kohorte 2 (34 µg/kg/d) dagegen bekam wesentlich weniger Wachstumshormon.

Betrachtet man nun die untersuchten Kinder, so ist der wohl wichtigste Unterschied die verschiedene Zusammensetzung der Gruppen. So waren lediglich 37% der Dos Santos Kinder kleine SGA – Kinder und der Hauptteil ISS – Patienten.

Zusätzlich lag das Alter zu Beginn der Therapie in der Kohorte 1 (6,17) ein Jahr unter dem unserer SGA – Gruppe (7,12).

In den angeführten Unterschieden könnte zumindest teilweise die Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse liegen. Durch die Zusammensetzung der Dos Santos – Gruppe aus zwei verschiedenen an sich schon eher heterogenen Krankheitsbildern, steigt die Wahrscheinlichkeit der Einwirkung äußerer Faktoren auf das Wachstum. Auch ist ein Vergleich der Gruppen durch den geringen Anteil an SGA – Kindern bei Dos Santos eher schwierig.

Je jünger die Kinder sind, desto eher besteht außerdem die Gefahr, dass man noch in die Periode des infantilen Wachstums hineinkommt und dadurch die Werte verfälscht.

Hinzu kommt, dass die Gruppe der Dos Santos – Kinder schon vor Therapie nicht so schlecht gewachsen ist wie unsere Gruppe.

4.4 IGF – Werte

Wie bereits erwähnt wurden schon verschiedene Versuche unternommen, die genauen funktionellen Veränderungen, die durch die Deletion auftreten, herauszufinden (68, 61, 5, 16). Ein weiterer Ansatzpunkt, der Erklärungen bieten könnte, ist die Bestimmung der IGF-I – Werte.

Das Wachstumshormon wirkt nach Bindung an seinen Rezeptor über die Aktivierung des JAK – STAT – Pfades. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der Expression des IGF-I und anderer wachstumshormonabhängiger Faktoren.

Betrachtet man unsere beiden Patientenkollektive getrennt voneinander, so weiß man heute, dass SGA – Kinder zwar keinen Wachstumshormonmangel haben, eine im Verhältnis zum IGF-I erniedrigte IGFBP 3 – Konzentration ist jedoch bekannt (3). Eine Ursache für diese Phänomen wurde noch nicht gefunden.

Untersuchungen der IGF – Konzentrationen bei Turner – Mädchen haben ergeben, dass diese Kinder ohne Wachstumshormontherapie einen niedrig – normalen IGF-I – Wert und eine hochnormale IGFBP 3 – Konzentration aufweisen. Unter Wachstumshormontherapie steigen beide Werte an, wobei die IGF-I – Konzentration einen deutlicheren Zuwachs verzeichnen kann (22).

Wenn man nun bedenkt, dass die d3 – Isoform bei in vitro Untersuchungen eine höhere Bioaktivität aufweist als die fl – Isoform (16), besteht die Wahrscheinlichkeit, dass dies über eine erhöhte Expression des IGF-I geschieht. Aus diesem Grund wurden diese Werte bei unseren zwei Gruppen zusammen mit dem die Halbwertszeit des IGF-I verlängerndem Bindungsprotein IGFBP 3 vor und nach einem Jahr der Therapie bestimmt.

Interessanterweise spiegeln sich die signifikanten Unterschiede in der Größenzunahme assoziiert mit dem GHR – Genotyp nicht in den IGF-I – und IGFBP 3 – Werten wider.

Ein Vergleich dieser Werte mit Ergebnissen der Dos Santos – Gruppe wäre zur Erklärung der Ergebnisse wünschenswert gewesen, doch wird in diesem Artikel lediglich die IGF-I Konzentration vor Therapiestart angegeben. Diese war in beiden Kohorten, sowie in unseren beiden Gruppen vor Therapie erniedrigt (4).

Eine mögliche Ursache dafür, dass die IGF-I – Spiegel nicht das unterschiedliche Ansprechen auf die Wachstumshormontherapie widerspiegeln, mag sein, dass IGF-I – unabhängig die rhGH – Effekte wirksam waren.

Weiterhin reflektieren die Serumhormonkonzentrationen die para – und autokrine Sekretion von IGF-I nicht oder unzureichend (45). So berichtet Yakar et al (73) von Tierexperimenten, in denen bei Mäusen die IGF-I – Produktion in der Leber verhindert wurde. Dadurch kam es zu einem deutlichen Abfall der IGF – Konzentration, allerdings ohne die zu erwartete Stagnation des Wachstums. Yakar et al führt dies auf die bisher zu wenig beachteten para – und autokrine Wirkung des Hormons zurück.

Auch wenn in den letzten Jahren deutliche Fortschritte im Bereich der IGF – Forschung gemacht wurden, so bleibt doch immer noch eine Unsicherheit in der Interpretation zirkulierender IGF – Konzentrationen.

4.5 Schlussfolgerung/ Ausblick

Auch wenn die Deletion des Exons 3 in die multifaktorielle Genese der Wachstumsstörungen mit einzubeziehen ist, so liegt der Nutzen, der aus den neuen Erkenntnissen gewonnen werden kann doch nicht auf der diagnostischen Ebene, denn die untersuchten Kinder wiesen vor der Therapie keine GHR – Genotyp spezifischen Unterschiede im Größenwachstum auf. Vielmehr liegt der Gewinn auf der therapeutischen Seite. Die Genotypisierung der kleinwüchsigen Kinder bezüglich des d3 – Proteinpolymorphismuses könnte in Zukunft eine Hilfe für das bessere Verständnis der rhGH – Effekte auf das Wachstum sein.

Dadurch könnte die Integration des GHR – Genotyps in die Diagnostik des Wachstumshormonmangels zur Ermittlung der optimalen Dosis und damit zu einer deutlichen Individualisierung der rhGh – Therapie führen. Dies würde helfen, unnötige Nebenwirkungen und Kosten zu verhindern.

Interessant wäre in diesem Fall noch die Ermittlung der Endgrößen der hier untersuchten Kinder um eine Wirkung über das erste Jahr der Therapie hinaus nachzuweisen. Auch ein Miteinfließenlassen des Genotyps in die Prediktionsmodelle zur Berechnung der möglichen Endgröße erscheint sinnvoll. Natürlich bedürften die Ergebnisse der neuen Prediktionsmodelle erst noch der Überprüfung, doch ist grundsätzlich der Versuch, Modelle zu erstellen, die das Wachstum unter Therapie möglichst genau angeben, wichtig, um in Zukunft die Therapieindikation, sowie die Wachstumshormondosis kritischer wählen zu können. Dadurch könnte eine unnötige oder ineffiziente Wachstumshormontherapie und die damit verbundenen Kosten den Kindern und dem Gesundheitssystem erspart bleiben.

5 Zusammenfassung

Der Proteinpolymorphismus des Wachstumshormonrezeptors, verursacht durch die Deletion des Exons 3, wurde vor kurzem mit einem unterschiedlichen Ansprechen kleiner Kinder ohne Wachstumshormonmangel auf eine Hochdosis Wachstumshormontherapie in Verbindung gebracht (16).

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Verbindung an zwei genau definierten Patientenkollektiven überprüft. Untersucht wurden in einer retrospektiven Studie einerseits Turner – Mädchen (n=53), definiert über den Karyotyp, andererseits kleine SGA – Kinder, die bei Geburt und bei Start der Therapie mindestens zwei SD- Werte unter dem Durchschnitt lagen.

Für alle Kinder wurde eine Wachstums – Prädiktion (52, 53) berechnet, die GHR – Exon 3 Genotypisierung erfolgte mittels eines PCR multiplex assays (43) und die Wachstumshormonkonzentrationen wurden mittels RIA bestimmt.

Die Hochdosis – Wachstumshormontherapie erfolgte mit einer mittleren rhGH Dosis von 38 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{d}$ bei den Turner – Mädchen, bzw 56 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{d}$ bei den SGA – Kindern.

Vor Beginn der Therapie gab es keine signifikanten Unterschiede in Körperhöhe, Wachstumsgeschwindigkeit, IGF-I – und IGFBP 3 – Konzentration zwischen den drei Genotypen. Nach einem Jahr der Therapie zeigten die d3/d3 – und d3/fl – Turner – Mädchen nicht nur eine signifikant höherer Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit ($p=0,019$), sondern überschritten auch signifikant ihre Wachstums – Prediktion ($p=0,007$). Bezüglich Größe, Gewicht und IGF – Werte ergab sich keine Signifikanz. In der SGA – Gruppe wuchsen die Träger eines d3 – Allels deutlich schneller als vorhergesagt ($p=0,023$), bei den restlichen Berechnungen wurde keine Signifikanz erreicht.

Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung einer Verbindung zwischen dem d3 – GHR Genotyp und einem vermehrten Ansprechen auf eine Hochdosis – Wachstumshormontherapie. Die Ausprägung dieser Assoziation scheint allerdings je nach Ursache des Kleinwuchses zu variieren.

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinacid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
EDTA	Ethyldiaminessigsäure
g	Gravitationskonstante
GH	growth hormone
GHR	growth hormone receptor
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
HV	height velocity
IGF	insulin growth-like factor
IGFBP 3	IGF binding protein 3
ISS	Idiopathic short stature
L	DNA – Leiter
LHRE	lactogenic response element

LTR	long terminal repeat
M	Molar ^{oo}
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPH	midparental height
nm	Nanometer
P	p-Wert
PCR	Polymerase Chain Reaktion
rhGH	recombinant humane growth hormone
RIA	Radioimmunoassay
s	Sekunden
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	standard deviation score
SGA	small for gestational age
Taq- Polymerase	Thermophilus aquadicus
TRIS	Trisdoxymethylethylendiamin
UTS	Ullrich-Turner-Syndrom

7 Literaturverzeichnis

1. **Abuzzahab MJ, Schneider A, Godard A, Grigorescu F, Lautier C, Keller E, Kiess W, Klammt J, Kratzsch J, Osgood D, Pfaffle R, Raile K, Seidel B, Smith RJ, Chernausk SD** (2003) Intrauterine growth Retardation (IUGR) Study group 2003 IGF-1 receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Engl J Med* 349 (23):2211-2222
2. **Albertsson-Wikland K, Karlberg J** (1997) Postnatal growth of children born small for gestational age. *Acta Paediatr Suppl* 423:193-195
3. **Ali O, Cohen P** (2003) Insulin-like growth factors and their binding proteins in children born small for gestational age: implication for growth hormone therapy. *Horm Res* 60 Suppl 3:115-123
4. **Amendt P, Hesse V, Rohde W** (1992) Somatomedin- C/ IGF- I, insulin and prolactin levels in Ullrich- Turner's- syndrome. *Exp Clin Endocrinol* 99(2):73-76
5. **Bass SH, Mulkerrin MG, Wells JA** (1991) A systematic mutational analysis of hormone- binding determinants in the human growth hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4498-4502
6. **Bauer K** (2004) Definitionen. In: Speer CP, Gahr M: Pädiatrie Springer Berlin Heidelberg New York Tokyo :172-173
7. **Betke K, Känzer W, Schaub J** (1991) Lehrbuch der Kinderheilkunde. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
8. **Binder G, Neuer K, Ranke MB, Wittekindt N** (2005) PTPN11 mutations are associated with Gh resistance in individuals with Noonan syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 Jun 28; (Epub ahead of print)
9. **Blum WF and Schweizer R** (2003) Insulin-like growth factors and their binding proteins. In: Ranke MB (ed): Diagnostics of endocrine function in children and adolescents. Basel, Karger:166-199
10. **Blum WF, Albertsson-Wikland K, Rosberg S, Ranke MB** (1993) Serum levels of insulin-like growth Factor 1 (IGF-1) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 76:1610-1616
11. **Bryant J, Cave C, Milne R** (2003) Recombinant growth hormone for idiopathic short stature in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* CD004440

12. **Carel JC, Mathivon L, Gendrel C, Ducret JP, Chaussain JL** (1998) Near normalization of final height with adapted doses of growth hormone in Turner's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 83(5):1462-1466
13. **Chatelain P, Job JC, Blanchard J, Ducret JP, Oliver M, Sagnard L, Vanderschueren-Lodeweyckx M** (1994) Dose-dependent catch-up growth after 2 years of growth hormone treatment in intrauterine growth-retarded children. *Belgian and French Pediatric Clinics and Sanofi-Choay (France)*. *J Clin Endocrinol Metab* 78(6):1454-1460
14. **de Zegher F, Albertsson-Wikland K, Wilton P, Chatelain P, Jonsson B, Lofstrom A, Butenandt O, Chaussain JL** (1996) Growth hormone treatment of short children born small for gestational age: metanalysis of four independent, randomized, controlled, multicentre studies. *Acta Paediatr Suppl* 417:27-31
15. **Doecker B, Simic-Schleicher A, Hauffa BP, Andler W** (1999) Psychosozialer Kleinwuchs maskiert als Wachstumshormonmangel. *Klin Paediatr* 211: 394-395
16. **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* 36:720-724
17. **Eisenstein BI** (1990) The Polymerase Chain Reaction. *N Engl J Med* 322:178-182
18. **Ford CE, Jones KW, Polani PE, De Almeida JC, Briggs JH** (1959) A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1(7075):711-713
19. **Freeman JV, Cole TJ, Chinn S, Jones PR, White EM, Preece MA** (1995) Cross sectional Stature and weight reference curves for the UK1990. *Arch Dis Child* 73:17-24
20. **Girard G, Mullis P** (1997) Hypothalamus- Hypophysen- System. In: Stolecke H (Hrsg): *Endokrinologie des Kindes- und Jugendalters*. Springer Berlin Heidelberg New York Tokyo:27-48
21. **Goeddel DV, Heyneker HL, Hozumi T, Arentzen R, Itakura K, Yansura DG, Ross MJ, Miozzari G, Crea R, Seeburg PH** (1979) Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature* 281(5732):544-548
22. **Haeusler G, Frisch H, Schmitt P, Blumel P, Plochl E, Zachmann M, Waldhor T** (1995) Treatment of patients with Ullrich-Turner syndrome with conventional doses of growth hormone and the combination with testosterone-

- ne or oxandrolone: effect on growth, IGF –1 and IGFBP-3 concentrations. Eur J Pediatr 154(6):437-444
23. **Hauffmann BP, Lehmann N, Bettendorf M, Mehls O, Dorr HG, Partsch CJ, Schwarz HP, Stahnke N, Steinkamp H, Said E, Sander S, Ranke MB; KIGS /IGLU Study Group** (2004) Central reassessment of GH concentrations measured at local treatment centers in children with impaired growth: consequences for patient management. Eur J Endocrinol 150:291-297
24. **Heinrich PC, Behrmann I, Muller- Newen G, Schaper F, Graeve L** (1998) Interleukine- 6- type cytokine signalling through the gp 130/Jak/STAT pathway. Biochem J 334 (2):297-314
25. **Hesse V** (1982) Endokrinologie des Kindes- und Jugendalters. VEB Georg Thieme Leipzig
26. **Hibi M, Nakajima K, Hirano T** (1996) IL- 6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. J Mol Med 74 (1):1-12
27. **Hintz RL, Attie KM, Baptista J, Roche A** (1999) Effect of growth hormone treatment on adult height of children with idiopathic short stature. Gentech Collaborative Group. N Engl J Med 340:502-507
28. **Hirano T** (1998) Interleukin 6 and its receptor: ten years later. Int Rev Immunol 16 (3-4):249-284
29. **Holly J, Perks C** (2006) The role of insulin-like growth factor binding proteins. Neuroendocrinology 83(3-4):154-160
30. **Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA** (1988) DNA sequencing with Thermus aquadicus DNA polymerase chain reaction- amplified DNA. Proc Natl Acad Sci USA 85:9436-9440
31. **Janssen OE** (1992) Polymerase Ketten Reaktion, Grundlagen und Anwendung. kememail April 1992:8-17
32. **Job JC, Chaussain JL, Job B, Ducret JP, Maes M, Olivier M, Ponte C, Rochiccioli P, Vanderschueren-Lodeweyckx M, Chatelain P** (1996). Follow-up of three years of treatment with growth hormone and of one post-treatment year, in children with severe growth retardation of intrauterine onset. Pediatr. Res 39 (2): 354-359
33. **Job JC, Chicaud J, Chibaudel B** (1993) Follow-up of adolescents with Turner syndrome. Arch Fr Pediatr 50(6):463-467
34. **Johnston LB, Savage MO** (2004) Should recombinant human growth hormone therapy be used in short small for gestational age children. Arch Dis Child 8:740-744

35. **Kaplan SL, Underwood LE, August GP, Bell JJ, Blethen SL, Blizzard RM, Brown DR, Foley TP, Hintz RL, Hobwood NJ** (1986) Clinical studies with rekombinant-DNA-derived methionyl human growth hormone in growth hormone deficient children. *Lancet* 1(8483):697-700
36. **Koletzko B** (2003) *Kinderheilkunde und Jugendmedizin*. Springer Berlin Heidelberg New York Tokyo
37. **Kruse K** (Hrsg) (1996) *Pädiatrische Endokrinologie*. Thieme Stuttgart
38. **Lesage C, Walker J, Landier F, Chatelain P, Bougneres PF** (1991) Near normalization of adolescent height with growth hormone therapy in very short children without growth hormone deficiency. *J Pediatr* 119:29-34
39. **Leung DW, Spencer SA, Cachianes G, Hammonds RD, Collins C, Henzel WJ, Barnard R, Waters NJ, Wood WL** (1987) Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature* 330(6148):537-543
40. **Li CH, Papkoff H** (1956) Preparation and properties of growth hormone from human and monkey pituitary glands. *Science* 124(3235):1293-1294
41. **Mayo KE, Cerelli GM, Lebo RV, Bruce BD, Rosenfeld MG, Evans RM** (1985) Gene encoding human growth hormone-releasing factor precursor: structure, sequence, and chromosomal assignment. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(1):63-67
42. **Niklasson A, Ericson A, Fryer JG, Karlberg J, Lawrence C, Karlberg P** (1991) An update of the Swedish reference standards for weight, length, and head circumference at birth for given gestational age (1977-1981). *Acta Paediatr Scand* 80:756-762
43. **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* 275:18664-18669
44. **Pantel J, Grulich-Henn J, Bettendorf M, Strasburger CJ, Heinrich U, Amselem S** (2003) Heterozygous nonsense mutation in exon 3 of the growth hormone receptor (GHR) in severe GH insensitivity (Laron syndrome) and the issue of the origin and function of the GHRd3 isoform. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1705-1710
45. **Pozo J, Martos-Moreno GA, Barrios V, Argente J** (2005) The IGF system in childhood: physiology and clinical implications. *J Endocrinol Invest* 28 Suppl 5:38-42
46. **Prader A, Larg RH, Molinari L, Issler C** (1989) Physical growth of Swiss children from birth to 20 years of age. First Zurich longitudinal study of growth and development. *Helv Paediatr Acta Suppl* 52:1-125

47. **Pschyrembel** Klinisches Wörterbuch 258. Auflage (1998). Walter de Gruyter Verlag Berlin New York: 1679
48. **Raben AS** (1958) Treatment of a pituitary dwarf with human growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 18(8):901-903
49. **Ranke MB** (1996) Disease-specific standards in congenital syndromes. *Horm Res* 45 Suppl 2:35-41
50. **Ranke MB** (2002) Wachstumsstörungen. In: Leutzke MJ, Schaub J, Schulte FJ, Spranger J: *Pädagogische Grundlagen und Praxis*. Springer Berlin Heidelberg new york Tokyo:578-582
51. **Ranke MB, Binder G, Wollmann HA** (2002) Krankheiten von Hypophyse und Hypothalamus. In: Leutzke MJ, Schaub J, Schulte FJ, Spranger J: *Pädagogische Grundlagen und Praxis*. Springer Berlin Heidelberg New York Tokyo:502-507
52. **Ranke MB, Lindberg A, Chatelain P, Wilton P, Cutfield W, Albertsson-Wikland K, Price DA** (2000) Prediction of long-term response to recombinant human growth hormone in Turner syndrome: development and validation of mathematical models. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4212-4218
53. **Ranke MB, Lindberg A, Cowell CT, Wikland KA, Reiter EO, Wilton P, Price DA** (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* 88:125-131
54. **Ranke MB, Saenger P** (2001) Turner's syndrome. *Lancet* 358 (9278):309-314
55. **Ranke MB, Traunecker R, Martin DD, Schweizer R, Schwarze CP, Wollmann HA, Binder G** (2005) IGF-1 and IGF binding protein-3 levels during initial Gh dosage step-up are indicators of GH sensitivity in GH-deficient children and short children born small for gestational age. *Horm Res* 64(2):68-76
56. **Rosenbloom AL** (1999) A mathematical model for prediction growth response to growth hormone replacement therapy – a useful clinical tool or an intellectual exercise? *J Clin Endocrin Metab* 84:1172-1173
57. **Rosenfeld RG, Frane J, Attie KM, Brasel JA, Burstein S, Cara JF, Chernausk S, Gotlin RW, Kuntze J, Lippe BM et al** (1992) Six-year results of a randomized, prospective trial of human growth hormone and oxandrolone in Turner syndrome. *J Pediatr* 121(1): 49-55
58. **Rosenfeld RG, HWA V** (2004) New molecular mechanisms of GH resistance. *Eur J Endocrinol* 151 Suppl 1:S11-15

59. **Saika RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA** (1988) Primer- directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239 487-491
60. **Salmon WD Jr, Daughaday WH** (1957) A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* 49(6):825-836
61. **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* 319:16-20
62. **Sotiropoulos A et al** (1996) Differential activation of Stat3 and Stat5 by distinct regions of the growth hormone receptor. *Mol Endocrinol* 10:998-1009
63. **Speer CP, Gahr M** (Hrsg)(2004) Pädiatrie. Springer Berlin Heidelberg New York Tokyo
64. **Stürzl M, Roth WK, Viehweger P, Hofscheider HP** (1991) Taq DNA Polymerase- Synthesized Single- Stranded DNA Hybridization Probes and their Application in Northern Blotting and in situ Hybridization. In : Rolfs A, Schuhmacher HC, Marx P PCR Topics, usage of Polymerase Chain Reaction in Genetic and Infectious Diseases. Springer Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hongkong Barcelona:41-46
65. **Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M** (1966) Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965.II. *Arch Dis Child* 41:613-635
66. **Thomas FJ, Mcleod HL, Watters JW** (2004) Pharmacogenomics: the influence of genomic variation on drug response. *Curr Top Med Chem* 4:1399-1409
67. **Tricoli JV, Rall LB, Scott J, Bell GI, Shows TB** (1984) Localization of insulin-like growth factor genes to human chromosomes 11 and 12. *Nature* 310(5980):784-786
68. **Urbanek M, Russell JE, Cooke NE, Liebhaber SA** (1993) Functional characterization of the alternatively spliced, placental human growth hormone receptor. *J Biol Chem* 268:19025-19032
69. **Wölfle J, Cha DJ, Massart- Schlesinger MB, Moyano P, Rotwein P** (2005) Molecular physiology, pathology and regulation of the growth hormone/ insulin-like growth factor-I system. *Pediatr Nephrol* 20:295-302
70. **Wollmann HA** (1998) Intrauterine growth restriction: definition and etiology. *Horm Res (Suppl 2)*:1-6
71. www.biologie.uni-regensburg.de/Biochemie/Deutzmann/Hormon_SS/Zyto-kinRezeptoren_web.pdf

72. www.megru.unizh.ch/j3/module/endokrinologie/

73. **Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D**
(1999) Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(13):7324-7329

8 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen, die mir bei der vorliegenden Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen, ganz herzlich bedanken!

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. G Binder für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bedanken. Während der ganzen Zeit habe ich mich sehr gut aufgehoben gefühlt.

Mein Dank geht an alle Mitarbeiter des Hormonlabors der Universitätsklinik Tübingen. Vor allem bei Christina Urban möchte ich mich für die ausgesprochen nette Zusammenarbeit und die tatkräftige, humorvolle Unterstützung im Labor bedanken.

Bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglichten und mir immer zur Seite standen.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin Martina Guthoff, die mich mit unerschöpflicher Geduld und vielen Ratschlägen bei der Fertigstellung dieser Arbeit tatkräftig unterstützte. Danke Martina!

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Friederike Baur
Geburtstag: 11.08.1979
Geburtsort: Böblingen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1985- 1989 Grundschole Pfalzgrafenweiler
1989- 1998 Kepler- Gymnasium Freudenstadt
06/1998 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

04/2001- 04/2003 Studium der Medizin an der Ludwig- Maximilian-
Universität in München
04/2003 Ärztliche Vorprüfung
04/2003- 03/2004 Studium der Medizin an der Technischen
Universität in München
Seit 04/2004 Studium der Medizin an der Eberhard- Karls-
Universität in Tübingen
02/2006- 01/2007 Praktisches Jahr, Universitätsklinikum Tübingen
26.04.2007 Staatsexamen