

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. M. Schrappe)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**WACHSTUMSHORMONABHÄNGIGE
GENEXPRESSION
IN PERIPHEREN MONONUKLEÄREN BLUTZELLEN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

NURIA BRÄMSWIG
aus Münster, Nordrhein-Westfalen

Kiel (2010)

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Geschichte der Therapie mit Wachstumshormon	1
1.2 Biosynthese, Regulation und Wirkung des Wachstumshormons	1
1.3 Kleinwuchs und Wachstumsstörung	3
1.4 Wachstumshormontherapie	7
1.4.1 Zugelassene Indikationen zur Therapie mit Wachstumshormon	7
1.4.2 Ziel der Therapie	8
1.4.3 Nebenwirkungen der Therapie	8
1.5 Bekannte Prädiktionsmodelle	8
1.5.1 IGF-1 Generationstest	8
1.5.2 Weitere Prädiktionsmodelle	9
1.6 Biomarkeridentifikation mittels Expressionsmicroarray-Strategie	10
1.6.1 Geschichte der Microarray-Methode	10
1.6.2 Anwendungen der Microarray-Methode	10
1.7 Identifikation potentieller Biomarker der Wachstumshormonwirkung	11
1.7.1 Early Growth Response 1-Gen (EGR1)	12
1.7.2 Early Growth Response 2-Gen (EGR2)	12
1.7.3 FOS-Gen	12
1.7.4 Hämoglobin Alpha 1-Gen (HBA1)	13
1.8 Fragestellung	13
2. Patienten, Material und Methoden	15
2.1 Patienten	15
2.1.1 Ethische Aspekte	15
2.1.2 Patienten	15
2.2 Material	22
2.3 Methoden	26
2.3.1 Auxologische Daten	26
2.3.2 IGF-1 Generationstest	26
2.3.3 Vorbereitung für die Durchführung von Microarrays und RT-PCR	27

II

2.3.3.1 Gewinnung mononukleärer Zellen aus Patientenblut	27
2.3.3.2 RNA-Extraktion	27
2.3.3.3 RNA-Quantifizierung	29
2.3.4 cDNA-Microarrays	30
2.3.5 Hierarchische Clusteranalyse der Microarray Daten	35
2.3.6 Synthese von komplementärer DNA (cDNA) für RT-PCR	36
2.3.7 Real Time – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	37
2.3.8 Agarosegelelektrophorese	43
3. Ergebnisse	44
3.1 Klinische Ergebnisse	44
3.2 Microarray-Daten und hierarchische Clusteranalyse	50
3.3 RT-PCR	53
3.3.1 Agarosegelelektrophorese	53
3.3.2 RT-PCR-Daten	54
3.3.3 Korrelation der Microarray und RT-PCR Daten	55
3.4 Korrelationen	57
3.4.1 Korrelation der IGF-1 Werte mit auxologischen Daten und RT-PCR-Daten	57
3.4.2 Korrelation auxologischer Daten mit RT-PCR Daten	58
4. Diskussion	60
4.1 Methodische Aspekte	60
4.2 Funktionen der Gene	63
4.3 Auswahl der Patienten	64
4.4 Korrelationen der Datensätze	65
5. Zusammenfassung	67
6. Literaturverzeichnis	68
7. Danksagung	78
8. Curriculum vitae	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Regulation der Wachstumshormon- und IGF-1 Bildung	2
Abbildung 2: Ursachen für Kleinwuchs	3
Abbildung 3: Ursachen einer Wachstumsstörung mit/ohne Kleinwuchs	4
Abbildung 4: Hypothalamus-Hypophysen-IGF-1 Achse (Lopez-Bermejo et al., 2000)	5
Abbildung 5: Standardabweichungen (SDS) der Wachstumsraten der Patienten P1 bis P14	49
Abbildung 6: Anstieg der Unterschenkellänge (mm, Tag 1 bis Tag 5 der Therapie)	49
Abbildung 7: IGF-1 Werte der Patienten P1 bis P14	50
Abbildung 8: 8a. Microarray 8b. Ausschnittvergrößerung 8c. Hochreguliertes EGR1	51
Abbildung 9: Hierarchische Clusteranalyse von 10 cDNA-Microarrays	51
Abbildung 10: Microarray-Analyse der Gene EGR1, EGR2, FOS und HBA1	52
Abbildung 11: Agarosegelelektrophorese von EGR1, EGR2, FOS, HBA1 und SDHA	53
Abbildung 12: RT-PCR Ergebnisse der Patienten P1 bis P7	54
Abbildung 13: RT-PCR Ergebnisse der Patienten P8 bis P14	55
Abbildung 14: Korrelation der Microarray und RT-PCR Daten	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Störungen der Hypothalamus-Hypophysen-IGF-1 Achse und Labordiagnostik	6
Tabelle 2: Indikationen zur Wachstumshormontherapie	7
Tabelle 3: Kasuistiken der Patienten	17
Tabelle 4: Primersequenzen	25
Tabelle 5: RNA Nano Chip	29
Tabelle 6: Reaktionsmix der Reversen Transkription	30
Tabelle 7: Reaktionsmix der Zweitstrangsynthese	31
Tabelle 8: Reaktionsmix der In vitro Transkription	32
Tabelle 9: Pipettierschema der Markierungsreaktion	33
Tabelle 10: Pipettierschema der Microarray-Hybridisierungslösung	33
Tabelle 11: Prähybridisierungslösung	34
Tabelle 12: Waschen hybridisierter Microarrays	35
Tabelle 13: NCBI Genbank Nummern	38
Tabelle 14: Pipettierschema der RT-PCR	39
Tabelle 15: RT-PCR Programm	40
Tabelle 16: Schematischer Aufbau eines RT-PCR-Laufs	42
Tabelle 17: Auxologische Daten und IGF-1 Werte der Patienten	44
Tabelle 18: Korrelation der IGF-1 Änderungen mit auxologischen Daten	57
Tabelle 19: Korrelation der IGF-1 Werte mit RT-PCR Daten	58
Tabelle 20: Korrelation auxologischer Parameter mit RT-PCR Daten	59

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
aRNA	antisense RNA
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	komplementäre DNA
CTP	Cytosintriphosphat
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic Acid
EGR1	Early Growth Response 1
EGR2	Early Growth Response 2
FOS	Transkriptionsfaktor FOS
GH	Growth Hormone (Wachstumshormon)
GHR	Growth Hormone Receptor (Wachstumshormonrezeptor)
GHRH	Growth Hormone Releasing Hormone (=Somatoliberin)
GTP	Guanosintriphosphat
HBA1	Hämoglobin Alpha 1
hGH	humanes Wachstumshormon
IGF	Insulin like Growth Factor
IGF BP	Insulin like Growth Factor Bindungsprotein
IUGR	Intrauterine Wachstumsretardierung
ISS	Idiopathic Short Stature (Idiopathischer Kleinwuchs)

VI

KEV	Konstitutionelle Entwicklungsverzögerung
KR	Knemometrierate
M-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
NaOH	Natriumhydroxid
NGFI-A	Nerve Growth Factor Induced Clone A
NSD	Neurosekretorische Dysfunktion
P	Perzentile
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
rhGH	Rekombinantes humanes Wachstumshormon
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Real Time-Polymerase Ketten Reaktion
SDHA	Succinyl Dehydrogenase Complex, Subunit A
SDS	Sodium Dodecyl Solution
SDS	Standardabweichung (Standard Deviation Score)
SGA	Small for Gestational Age (Mangelgeburt)
SSC	Standard Sodium Citrat
STH	Somatotropin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
UTP	Uridintriphosphat
UTS	Ullrich-Turner Syndrom
UV	Ultraviolett

1. Einleitung

1.1 Geschichte der Therapie mit Wachstumshormon

Die Behandlung des Kleinwuchses mit humanem Wachstumshormon ist erstmals im Jahre 1958 von Raben beschrieben worden (Raben, 1958). Das Wachstumshormon wurde von Raben aus menschlichen Hypophysen extrahiert und intramuskulär injiziert. In den folgenden Jahren wurde in zahlreichen Studien über die positiven Effekte der Wachstumshormontherapie auf das Längenwachstum und die Erwachsenengröße kleinwüchsiger Patienten mit einem Wachstumshormonmangel berichtet (Burns et al., 1981; Frasier, 1983; Prader et al., 1967).

Unter der Therapie mit humanem hypophysären Wachstumshormon wurden erstmals im Jahre 1985 mehrere Fälle einer Creutzfeldt-Jakob Erkrankung publiziert (Brown, 1988; Frasier, 1997; Powell-Jackson et al., 1985). Aus diesem Grunde wurde die Behandlung mit humanem hypophysären Wachstumshormon nicht weiter fortgeführt.

Mitte der achtziger Jahre konnte ein rekombinantes humanes Wachstumshormon (recombinant human Growth Hormone, rhGH) entwickelt werden, das seither das humane hypophysäre Wachstumshormon ersetzt hat. Die damit praktisch unbegrenzte Verfügbarkeit eines gentechnisch hergestellten Wachstumshormons ermöglichte es, den Effekt der Wachstumshormontherapie auf andere Therapieindikationen und Patientengruppen zu überprüfen und das Behandlungsspektrum der Wachstumshormontherapie erheblich auszudehnen (Hindmarsh & Dattani, 2006).

Seit Beginn der Wachstumshormontherapie ist es Thema vieler Arbeitsgruppen, einen prädiktiven Marker zu finden, der eine Aussage über die Langzeitprognose und Effektivität der Wachstumshormontherapie ermöglicht.

1.2 Biosynthese, Regulation und Wirkung des Wachstumshormons

Das Wachstumshormon (growth hormone, GH), auch Somatotropin (STH) genannt, wird in den somatotropen Zellen der Adenohypophyse synthetisiert. Die Sekretion des Wachstumshormons ist pulsatil. Die höchsten Konzentrationen werden nachts während des Schlafs gemessen.

Das Wachstumshormon ist ein anaboles Hormon, das in der Zelle zu einer erhöhten Proteinsynthese führt. Zusätzlich stimuliert es sowohl die Lipolyse als auch die Glykogenolyse. In der Leber führt Wachstumshormon zur Bildung von IGF-1 und IGF-2

(Insulin-like Growth Factor, auch Somatomedine genannt), die im Blut an spezifische Proteine gebunden sind (IGF-Bindungsproteine, IGF-BP 1-6).

Sowohl die Synthese als auch die Sekretion des Wachstumshormons werden durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Die Synthese und die pulsatile Sekretion wird durch das im Hypothalamus gebildete „growth hormone releasing hormone (GHRH)“ gefördert. Das hypothalamische Somatostatin wirkt hingegen inhibierend auf die Sekretion von Somatotropin. Östrogene und Androgene, ein niedriger Plasmaglucoosespiegel, Aminosäuren im Plasma, vor allem Arginin, und körperliche Arbeit und Stress stimulieren die Sekretion von Somatotropin.

Die hypothalamisch-hypophysäre Achse der Wachstumshormonsekretion wird zusätzlich durch negative Rückkopplungsmechanismen reguliert. Dabei inhibieren GHRH und Somatostatin sich gegenseitig und auch ihre jeweils eigene Sekretionen. Somatotropin inhibiert die Sekretion von GHRH und stimuliert die Sekretion von Somatostatin. Das in der Leber gebildete IGF-1 inhibiert die Sekretion von Somatostatin (Goldenberg & Barkan, 2007).

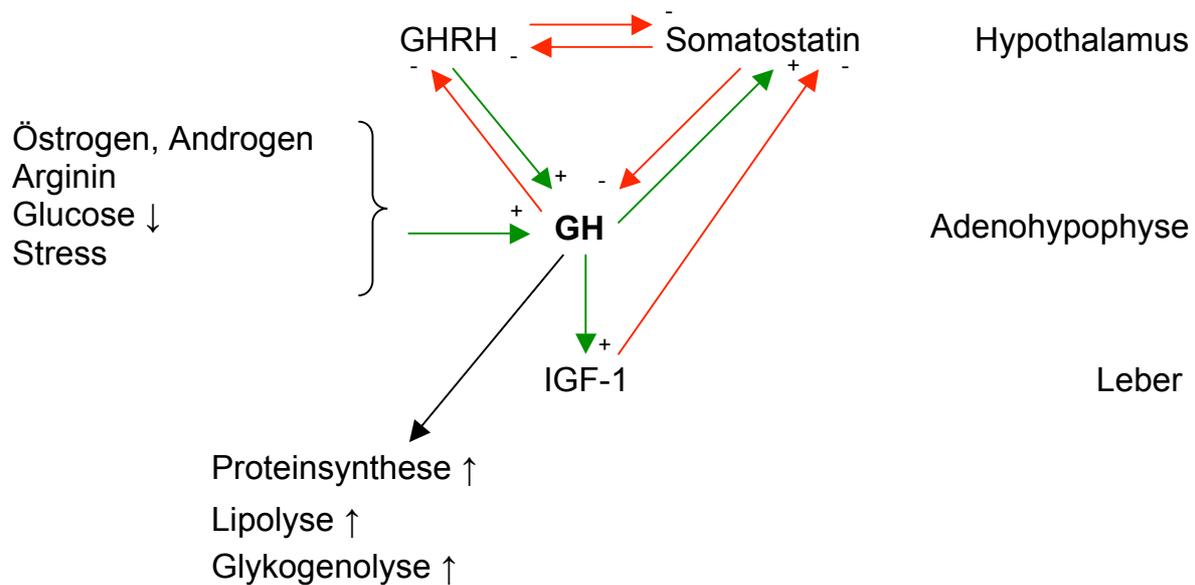


Abbildung 1: Regulation der Wachstumshormon- und IGF-1 Bildung

1.3 Kleinwuchs und Wachstumsstörung

Kleinwuchs

Eine normale Körperlänge,-höhe liegt vor, wenn die Körperhöhe des Kindes die definierten Grenzen der zweifachen positiven oder zweifachen negativen Standardabweichung der mittleren Körperhöhe einhält. Kleinwuchs ist definiert als eine Körperlänge,-höhe kleiner -2 SD für das chronologische Alter, das Geschlecht und die ethnische Herkunft des Kindes, des Jugendlichen oder des Erwachsenen. Die verschiedenen Ursachen des Kleinwuchses können als Normvarianten der Körperhöhe oder als Pathologie der Körperhöhe auftreten und sind in einer Übersicht in Abbildung 2 dargestellt.

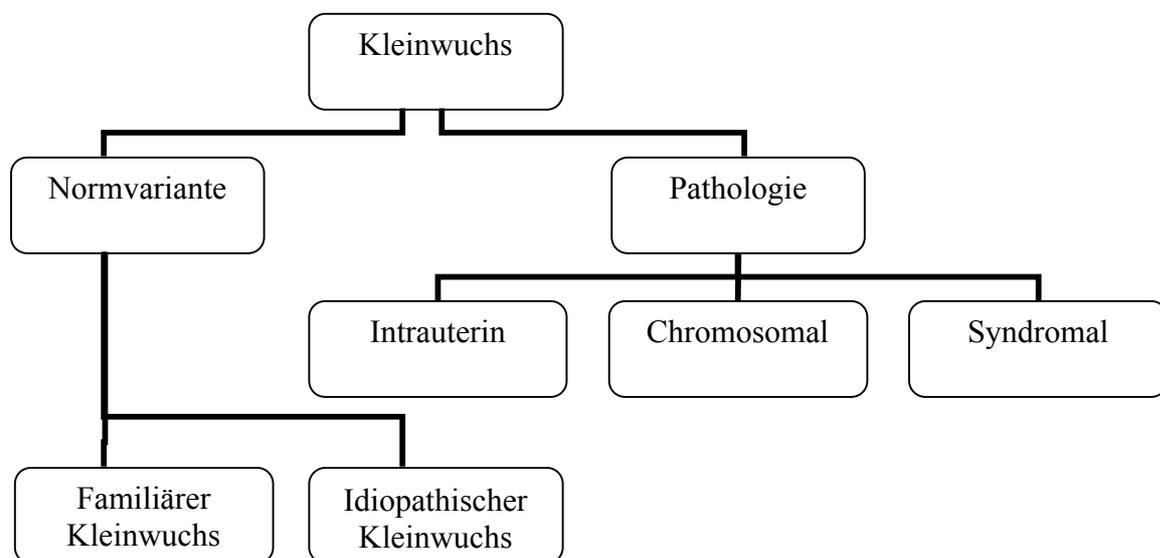


Abbildung 2: Ursachen für Kleinwuchs

Der familiäre und der idiopathische Kleinwuchs sind Normvarianten der Körperhöhe. Die Körperhöhe liegt unterhalb der dritten Perzentile, das Wachstum dieser Kinder verläuft perzentilenparallel.

Pathologische Ursachen des Kleinwuchses können in intrauterine, chromosomale und syndromale Ursachen gegliedert werden. Skelettale Ursachen eines Kleinwuchses sind in der Regel mit körperlichen Dysproportionen verbunden.

Ein intrauteriner Kleinwuchs kann fetal, maternal oder plazentar bedingt sein. Fetale Ursachen können kongenitale Infektionen oder chromosomale Störungen sein. Maternale Ursachen treten als Folge eines Alkohol-/Nikotinabusus oder chronischer Erkrankungen der Mutter in Erscheinung. Als plazentare Ursache muss die Plazentainsuffizienz genannt werden. Stellvertretend für die Vielzahl der chromosomalen Ursachen sollen das Down-Syndrom und das Ullrich-Turner Syndrom aufgeführt werden. Unter den Syndromen, die mit einem

Kleinwuchs einhergehen, werden am häufigsten das Silver-Russell-Syndrom, das Noonan-Syndrom und das Williams-Beuren-Syndrom erwähnt.

Wachstumsstörung

Normales Wachstum ist perzentilenparalleles Wachstum. Eine normale Wachstumsgeschwindigkeit liegt vor, wenn das Kind eine Wachstumsgeschwindigkeit zwischen $-1SD$ und $+1SD$ einhält. Als Wachstumsstörung bezeichnet man ein perzentilenflüchtiges Wachstum, die Wachstumsgeschwindigkeit ist kleiner $-1SD$. Eine Wachstumsstörung kann mit oder ohne Kleinwuchs auftreten.

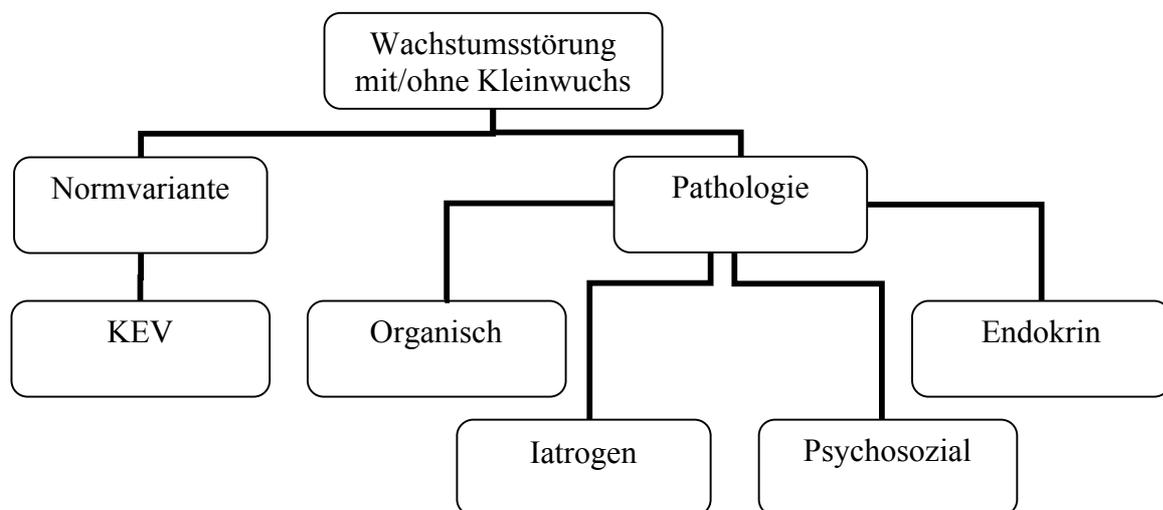


Abbildung 3: Ursachen einer Wachstumsstörung mit/ohne Kleinwuchs

Eine sehr häufige Normvariante des Wachstums ist die konstitutionelle Verzögerung von Wachstum und Pubertät oder die konstitutionelle Entwicklungsverzögerung (KEV).

Die pathologischen Ursachen sind vielfältig und können jedes Organsystem wie die Niere, den Gastrointestinaltrakt, die Lunge, das Herz etc. betreffen. Auch psychosoziale Probleme können zu einer Wachstumsstörung mit Kleinwuchs führen. Eine Wachstumsstörung kann auch iatrogen durch eine Schädelbestrahlung besonders der Hypothalamus-Hypophysenregion, eine Bestrahlung der Wirbelsäule oder durch eine hochdosierte Langzeit-Glukokortikoidtherapie induziert werden.

Endokrine Störungen wie die Hypothyreose oder der Hyperkortisolismus zum Beispiel im Rahmen eines Cushing Syndroms können ebenfalls pathologisches Wachstum verursachen. Die „klassische“ Ursache eines pathologischen Wachstumsverlaufes sind der Wachstumshormonmangel oder andere Störungen der Hypothalamus-Hypophysen-IGF-1 Achse, die in Abbildung 4 dargestellt sind. Dazu gehören Veränderungen im Bereich der

Rezeptoren des GHRH, des GH und des IGF-I sowie der Transkriptionsfaktoren oder der IGF-I Synthese.

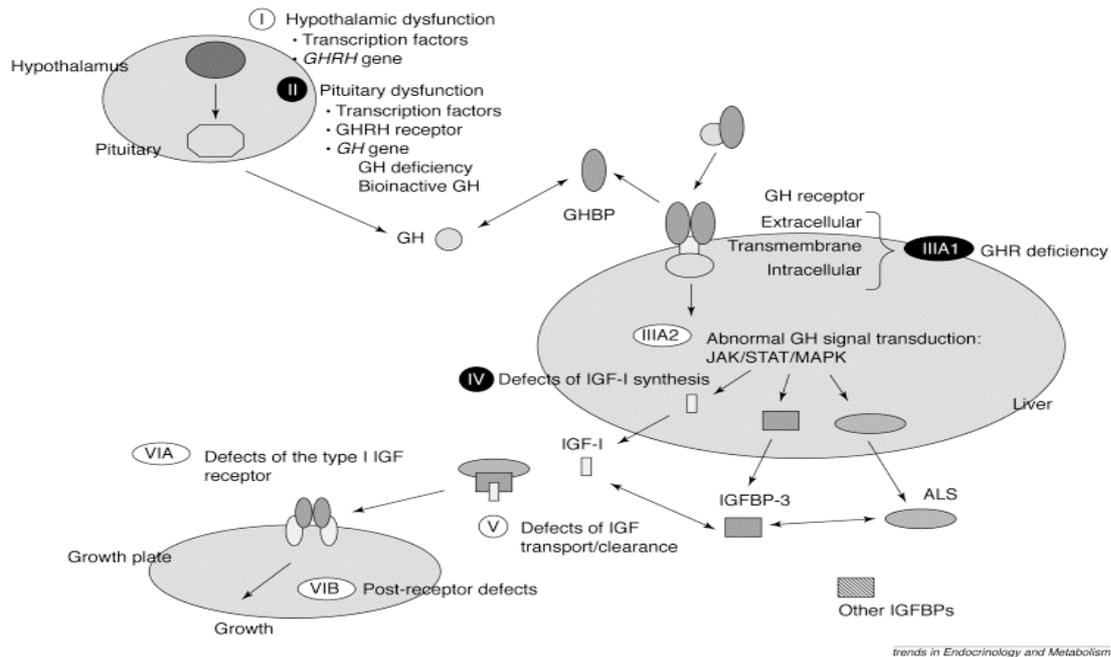


Abbildung 4: Hypothalamus-Hypophysen-IGF-1 Achse (Lopez-Bermejo et al., 2000)

Der hypothalamisch-hypophysäre Wachstumshormonmangel kann angeboren sein oder durch ein perinatales oder postnatales Trauma, durch Infektionen oder Tumoren des ZNS wie z.B. das Craniopharyngeom erworben werden (Dattani & Preece, 2004).

Von dem hypothalamisch-hypophysären Wachstumshormonmangel müssen andere Störungen der Wachstumshormonsekretion wie die neurosekretorische Dysfunktion (NSD) abgegrenzt werden. Die neurosekretorische Dysfunktion ist durch eine unzureichende Spontansekretion des Wachstumshormons bei normaler Ausschüttung des Wachstumshormons in den Wachstumshormon-Stimulationstests gekennzeichnet (Spiliotis et al., 1984). Störungen der GHRH-GH-IGF-1-Achse können die Rezeptoren des GHRH betreffen, den Wachstumshormonrezeptor (GH-Rezeptordefekt) oder das Wachstumshormon selbst (bioinaktives Wachstumshormon) sowie die Synthese des IGF-1 (IGF-1 Mangel) oder den IGF-I Rezeptor.

Eine Körperhöhe unter $-2,0$ SD und/oder ein perzentilenflüchtiges Wachstum (Wachstumsgeschwindigkeit unter -1 SD) sollten Anlass zu einer weiteren ausführlichen Diagnostik sein. Nach dem Ausschluss anderer organischer Ursachen und psychosozialer Belastungssituationen werden zur initialen Abklärung des Wachstumshormonmangels das

IGF-1 und IGF BP-3 bestimmt. Bei pathologischem Ausfall dieser Serumparameter sind weitere Untersuchungen zur Abklärung eines Wachstumshormonmangels notwendig.

Die weiterführende Diagnostik beinhaltet die Durchführung von Wachstumshormonstimulationstests mit einer Reihe unterschiedlicher Substanzen wie Arginin, Insulin, Clonidin und L-Dopa. Zusätzlich kann, vor allen Dingen zur Diagnostik der neurosekretorischen Dysfunktion, die Spontansekretion des Wachstumshormons über unterschiedliche Zeitintervalle von 6-8, 12 oder 24 Stunden gemessen werden (Bierich et al., 1989; Bierich et al., 1985).

Die Tabelle 1 zeigt verschiedene Störungen der Hypothalamus-Hypophysen-IGF-1 Achse mit den Ergebnissen der Labordiagnostik.

Tabelle 1: Störungen der Hypothalamus-Hypophysen-IGF-1 Achse und Labordiagnostik

Ätiologie	GH	IGF-1/ IGF-BP3	GH-Sekretion (Stimulationstests)	GH-Spontan- Sekretion (Nachtprofil)
Hypothalamischer/ Hypophysärer GH- Mangel	niedrig	niedrig	niedrig	niedrig
NSD	niedrig	niedrig	normal	niedrig
Bioinaktives GH	normal-hoch	niedrig	normal	normal
IGF-1 Mangel	hoch	niedrig	hoch	hoch

Sehr häufig sind Wachstumsstörungen mit einer Retardierung des Handskeletalters verbunden, so dass auch ein Röntgenbild der linken Hand unter Einschluss des distalen Endes von Radius und Ulna zur Beurteilung des Knochenalters nach Greulich-Pyle oder Tanner-Whitehouse angefertigt wird.

Zur Abklärung eines intrakraniellen Prozesses wie zum Beispiel eines Craniopharyngeoms oder einer Entwicklungsstörung der Hypophyse wie zum Beispiel einer Aplasie oder Hypoplasie des Hypophysenvorderlappens, einer Ektopie des Hypophysenhinterlappens oder einer Unterbrechung des Hypophysenstiels wird eine Magnetresonanztomographie des Schädels durchgeführt (Dattani & Preece, 2004).

Die Diagnostik eines Wachstumshormonmangels ist schwierig. Nachuntersuchungen zeigen, dass bei einem Teil der Patienten mit der Diagnose eines idiopathischen Wachstumshormonmangels und normaler oder kleiner Hypophyse nach Beendigung der Wachstumshormontherapie eine normale Wachstumshormonsekretion beobachtet wird (Maghnie et al., 1999).

1.4 Wachstumshormontherapie

Vor Beginn einer Wachstumshormontherapie ist die Therapieindikation sorgfältig zu prüfen. Neben der wirtschaftlichen Komponente, den hohen Therapiekosten, ist vor allem zu berücksichtigen, dass die Patienten einer jahrelangen Therapie mit täglichen Injektionen unterzogen werden.

Die mangelnde Anerkennung und die Unterschätzung von kleinwüchsigen Kindern und der daraus resultierende psychosoziale Stress für das Kind und die Familie ist Bestandteil vieler Untersuchungen. Neue Studien zeigen, dass nicht der Kleinwuchs an sich sondern das gleichzeitige Auftreten anderer Krankheitsmerkmale (physische Auffälligkeiten etc.) eine negative Auswirkung auf die psychologische Adaptation und die Lebensqualität der Kinder haben (Sandberg & Voss, 2002). Dies ist ein weiteres Zeichen dafür, dass Therapieindikationen genau gestellt werden müssen.

1.4.1 Zugelassene Indikationen zur Therapie mit Wachstumshormon

Die zugelassenen klinischen Indikationen für eine Wachstumshormontherapie sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst (Hindmarsh & Dattani, 2006; Quigley, 2007).

Tabelle 2: Indikationen zur Wachstumshormontherapie

Diagnosen
Hypophysärer Wachstumshormonmangel
Hypothalamischer Wachstumshormonmangel
Chronische Niereninsuffizienz
Ullrich-Turner Syndrom
Kleinwuchs bei Mangelgeburt (Small for Gestational Age, SGA)
SHOX-Mutation
Idiopathic Short Stature (ISS) (nur USA)
Prader-Willi Syndrom
Noonan Syndrom (nur USA)

1.4.2 Ziel der Therapie

Ziel einer Wachstumshormontherapie ist das Erreichen einer Erwachsenengröße im unteren Norm- oder familiären Zielgrößenbereich.

1.4.3 Nebenwirkungen der Therapie

Unter einer Substitutionstherapie mit Wachstumshormon sind Nebenwirkungen der Therapie in der Regel nicht zu erwarten, da das fehlende Hormon durch physiologische Gaben des Wachstumshormons ersetzt wird.

Bei Kindern mit einer normalen Wachstumshormonsekretion wie zum Beispiel Mädchen mit einem Ullrich-Turner Syndrom wird die Wachstumshormontherapie mit „supraphysiologischen“ Dosen des Wachstumshormons durchgeführt. Periphere Ödeme und ein Pseudotumor cerebri werden unter dieser Dosierung etwas häufiger beobachtet. Während der Therapie mit höher dosiertem Wachstumshormon ist die Insulinsekretion im Sinne eines Hyperinsulinismus gestört, ein Befund, der sich nach Absetzen des Wachstumshormons aber wieder normalisiert (Van Pareren et al., 2002). Längerfristige Nachuntersuchungen werden zeigen müssen, ob die Inzidenz für einen Diabetes mellitus Typ II erhöht ist. Ein erhöhtes Risiko von Tumorerkrankungen wie zum Beispiel dem Hodgkin-Lymphom und dem Kolon-Karzinom wird immer wieder diskutiert, ist aber bisher nicht eindeutig nachgewiesen (Hindmarsh & Dattani, 2006).

1.5 Bekannte Prädiktionsmodelle

1.5.1 IGF-1 Generationstest

Der IGF-1 Generationstest wurde in den achtziger Jahren eingeführt und dient seitdem als prognostischer Test für ein Ansprechen auf die Wachstumshormontherapie (Rudman et al., 1981; Schwarze et al., 1999). Die klinische Bedeutung des IGF-1 Generationstests wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

In einer Studie wurden 37 Patienten nach der Durchführung von GH-Stimulationstests je nach Höhe des GH-Peaks in drei Gruppen eingeteilt. In dem darauf folgenden IGF-1 Generationstest konnte kein signifikanter Unterschied im Anstieg von IGF-1 oder IGF-BP3 zwischen den drei Patientengruppen festgestellt werden. Die Patienten mit einem „GH

insensitivity syndrome“ konnten mit dem IGF-1 Generationstest nicht klar identifiziert werden (Cotterill et al., 1998).

Seitdem wird versucht, neue Marker der Wachstumshormonwirkung zu finden, die das Ansprechen auf die Wachstumshormontherapie vorhersagen können.

1.5.2 Weitere Prädiktionsmodelle

Ranke et al. (1999) haben zwei mathematische Modelle aufgestellt, die verschiedene Faktoren wie zum Beispiel das chronologische Alter bei Therapiebeginn, die Wachstumshormondosis etc. auswertet, um eine Prädiktion über den Wachstumsverlauf zu geben. Der Wachstumsverlauf konnte mit diesen Modellen nicht sicher prognostiziert werden. Das erste Modell erklärte 61% und das zweite Modell 45% der Variabilität des Wachstumsverlaufs im ersten Therapiejahr (Ranke et al., 1999). Die gleiche Arbeitsgruppe hat auch bei Mädchen mit einem Ullrich-Turner-Syndrom versucht, über die Auswertung von sechs verschiedenen Einflussfaktoren ein Ansprechen auf die Therapie mit Wachstumshormonen vorherzusagen. Die Variabilität des Wachstumsverlaufs im ersten Therapiejahr konnte mit diesem mathematischen Modell zu 46% und somit nicht abschließend geklärt werden (Ranke et al., 2000). Rauch et al. haben die Kollagen Marker Deoxypyridinolin, Hydroxylysin und dessen Glykoside im Urin gemessen und mit einem Ansprechen auf die Therapie in Beziehung gesetzt. Die Arbeit zeigte einen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen dem Anstieg dieser Marker und einem Anstieg der Wachstumsrate. Das Ansprechen auf die Wachstumshormontherapie konnte mit diesen Markern jedoch nicht sicher vorhergesagt werden (Rauch et al., 2002).

In einem anderen Ansatz wurde der Zusammenhang zwischen den Polymorphismen des Wachstumshormonrezeptors (Growth Hormone Receptor, GHR) und dem Therapieansprechen ausgewertet. Eine Arbeitsgruppe untersuchte den Effekt der Exon 3-Minus Isoform des GHR (d3-GHR) unter der Wachstumshormontherapie bei Kindern mit SGA oder ISS. Kinder mit dieser Isoform zeigten eine 1.7 bis 2-fach höhere Akzeleration der Wachstumsgeschwindigkeit als Kinder der Vergleichsgruppe (Dos Santos et al., 2004). Im Gegensatz dazu wurde bei Patienten mit einem isolierten Wachstumshormonmangel nachgewiesen, dass die Exon 3-Minus Isoform des Wachstumshormonrezeptors keinen Einfluss auf das Ansprechen auf eine Wachstumshormontherapie hat (Blum et al., 2006).

Zu diesem Zeitpunkt kann man zusammenfassend sagen, dass eine sichere Vorhersage des Therapieansprechens und des Wachstumsverlaufs nicht möglich ist.

1.6 Biomarkeridentifikation mittels Expressionsmicroarray-Strategie

1.6.1 Geschichte der Microarray-Methode

In den vergangenen Jahren sind große Fortschritte im Bereich der molekularen Genetik erzielt worden. Nach der Sequenzierung großer Teile des menschlichen Genoms im Jahre 2001 haben sich neue und vielfältige Möglichkeiten ergeben, dieses Wissen für funktionelle Untersuchungen in genomweitem Maßstab zu nutzen (Venter et al., 2001).

Die funktionelle Analyse des Genoms wurde im Jahre 1996 mit der Einführung der Microarray Methode erheblich weiterentwickelt (Shalon et al., 1996). Eine häufig verwendete Methode, die an der Stanford Universität in Kalifornien, USA, entwickelt wurde, ermöglicht es, Expressionsunterschiede verschiedenster Zellarten und Organismen auf Transkriptionsebene mittels Fluoreszenz-Hybridisierung darzustellen. Für jedes einzelne Gen wird der mRNA-Transkriptionsunterschied zwischen zwei Proben zum Beispiel vor und nach Behandlung mit Hilfe eines Laser-Mikroskops anhand der Fluoreszenz infolge spezifischer Hybridisierung gemessen (Brown & Botstein, 1999).

1.6.2 Anwendungen der Microarray-Methode

Die Microarray Methode fand in den letzten Jahren in vielen verschiedenen Bereichen Anwendung. Die Methode wird zur Erforschung von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen und zur Untersuchung der endokrinen Genexpression genutzt. Bei der Untersuchung von pathophysiologischen Prozessen wird die Genexpression in Blutzellen oder im betroffenen Gewebe gemessen.

Physiologie

Smith et al. untersuchten mit dieser Methode physiologische Prozesse in der Hefe (Smith et al., 1996), Gobert et al. die Genexpressionsunterschiede zwischen verschiedenen Arten und Geschlechtern von *Schistosoma japonicum* (Gobert et al., 2006).

Pathophysiologie

Genexpressionsunterschiede in verschiedenen Geweben können diagnostisch, therapeutisch und prognostisch genutzt werden. Mit Hilfe der Microarray Analyse wurden spezifische Genexpressionsmuster im Tumorgewebe beim Brustkrebs identifiziert, die dann Tumorsubtypen definieren und eine Prognose der Erkrankung vorhersagen können (Sorlie et al., 2001). Genexpressionsprofile in Nierenkarzinomzellen können in Zukunft eine

zunehmende Bedeutung für die Diagnose, Therapie und Prognose des Nierenkarzinoms gewinnen (Young et al., 2008).

In weiteren Studien wurden die Unterschiede in der Genexpression von Blutzellen gemessen. Die genetische Analyse von Blutzellen bietet viele, nicht unerhebliche Vorteile. Mit einer einfachen Blutentnahme können Transkriptionsunterschiede nachgewiesen werden, die diagnostisch, therapeutisch und prognostisch von Bedeutung sind (Burczynski & Dorner, 2006). Die Genexpression in PBMC (peripheral blood mononuclear cells) von Patienten mit aktivierter rheumatoider Arthritis wurde mit der von gesunden Patienten verglichen. Eine detaillierte Betrachtung der dabei ermittelten Unterschiede der Genexpression kann einen Einblick in die Pathogenese geben (Batliwalla et al., 2005). Spezifische Genprofile konnten auch für viele neurologische Erkrankungen in Blutzellen nachgewiesen werden. Ein ischämischer Schlaganfall löste ebenfalls spezifische Expressionsunterschiede in Blutzellen aus (Sharp et al., 2006). Tang et al. verglichen die Genexpression in PBMC von Neurofibromatose I-Patienten mit Kontrollpatienten und entdeckten Unterschiede, die zukünftig eventuell diagnostischen und prognostischen Wert bekommen könnten (Tang et al., 2004). Die Identifikation spezifischer Genexpressionsmuster in Blutzellen erlaubt bei der Leukämie eine Vorhersage des Therapieansprechens und der Prognose (Cario et al., 2005).

Endokrine Genexpression

Bebermeier et al. konnten in Zellen, die den Androgenrezeptor exprimieren, mittels Microarray direkte Änderungen der Genexpression nach Androgengabe nachweisen (Bebermeier et al., 2006).

Zur Identifikation potentieller Biomarker, die zukünftig eine Prognose bezüglich des Ansprechens auf eine Wachstumshormontherapie erlauben könnten, bietet die Microarray Methode eine völlig neue Perspektive.

1.7 Identifikation potentieller Biomarker der Wachstumshormonwirkung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Transkriptionsunterschiede der Gene EGR1, EGR2, FOS und HBA1 näher betrachtet. Diese Gene wiesen im Rahmen der ebenfalls in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Microarrayexperimente vielversprechende Expressionsmuster bei den Patienten im IGF-1 Generationstest auf. Deshalb sollen sie in der Einleitung in Kürze vorgestellt werden.

1.7.1 Early Growth Response 1-Gen (EGR1)

EGR1 ist in der Literatur auch als KROX24 (Chavrier et al., 1989) und als Nerve Growth Factor-Induced Clone A (NGFIA) bekannt. Die Sequenzanalyse des Gens mit der Lokalisation auf dem Chromosom 5 (Region q23 bis q31) sagte ein Zink-Finger-Protein mit drei Zinkfingern voraus (Tsai-Morris et al., 1988).

Dieses Protein fungiert in vielen verschiedenen Geweben als Transkriptionsfaktor. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass vor allem im Knochen und im Knorpel hohe Konzentrationen von EGR1-RNA vorliegen. Gleichzeitig konnte eine Koregulation mit FOS nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass EGR1 und FOS einen Einfluss auf die normale Skelett-Entwicklung haben (McMahon et al., 1990).

Zusätzlich spielt EGR1 neben vielen anderen Faktoren eine Rolle bei dem Wachstum und der Differenzierung von Osteoblasten der Maus (Fang et al., 1995).

1.7.2 Early Growth Response 2-Gen (EGR2)

Das Gen, nach (Chavrier et al., 1989) auch KROX-20 genannt, besteht aus zwei Introns und drei Exons und liegt auf dem Chromosom 10 in der Region q21.1 bis q22.1. Es kodiert ein Zink-Finger-Protein aus drei Zink-Fingern. EGR1, EGR2 und FOS koregulieren. Es konnte gezeigt werden, dass diese Gene in Fibroblasten auf ähnliche Weise durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren aktiviert werden (Chavrier et al., 1988).

1.7.3 FOS-Gen

Das Onkogen FOS war der erste Transkriptionsfaktor, dem eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des Skeletts zugesprochen wurde. Das Gen liegt auf Chromosom 14 in der Region q21 bis q31 (Barker et al., 1984).

Untersuchungen zur Rolle von FOS in der Entwicklung, der Differenzierung und der Wachstumskontrolle liegen aus dem Jahre 1987 vor. Die Ergebnisse zeigen, dass FOS vor allem in den perichondrialen Wachstumsregionen des Knorpels exprimiert wird. Außerdem lassen die Ergebnisse vermuten, dass FOS regulierend in die Differenzierung der Knochenzellen eingreift und somit einen Einfluss auf das physiologische Längenwachstum hat (Dony & Gruss, 1987).

Verschiedene experimentelle Ansätze wie zum Beispiel das Northern-Blotting und die In-situ-Hybridisierung zeigten einen hohen Gehalt an FOS-RNA im Bereich der Epiphyse von

menschlichen Röhrenknochen, insbesondere in den Osteoklasten und den Knorpelzellen (Sandberg et al., 1988b). Diese Untersuchungen wurden an Schädelkalotten von 15 bis 18 Wochen alten Feten wiederholt und konnten einen erhöhten Gehalt von c-fos RNA in Osteoklasten nachweisen (Sandberg et al., 1988a). Osteoklasten sind an der Resorption der Knochenmatrix beteiligt und somit wichtig für Umbauvorgänge und das Wachstum von Knochen.

Sowohl FOS, als auch EGR1 und EGR2 gehören zur „immediate-early gene family“, einer Familie von Genen, die nach extrazellulären Signalen sehr schnell mit einem Anstieg der Genexpression reagieren (Ouellette et al., 1990; Sukhatme, 1990).

1.7.4 Hämoglobin Alpha 1-Gen (HBA1)

Das HBA1-Gen ist auf dem Chromosom 16p13.3 lokalisiert (Breuning et al., 1987). Es gehört zu der Familie der Hämoglobine. Die glykosylierte Form des HbA1c wird im Rahmen der Wachstumshormontherapie im Hinblick auf den Kohlenhydratstoffwechsel regelmäßig überprüft. HbA1c ist zudem der wichtigste Verlauf- und Prognoseparameter beim Diabetes mellitus.

1.8 Fragestellung

Das individuelle Ansprechen auf eine Wachstumshormontherapie ist bei kleinwüchsigen Patienten mit unterschiedlichen Ursachen des Kleinwuchses immer noch schwer vorauszusagen. Diese Arbeit untersucht die Unterschiede in der Genexpression in PBMC vor und nach viertägiger Wachstumshormongabe im Rahmen eines routinemäßig durchgeführten IGF-1 Generationstests. Vor Tag 1 und nach Tag 4 der Wachstumshormongabe wird eine Blutentnahme durchgeführt. Die aus diesen beiden Blutproben isolierten PBMC werden mit Hilfe von Microarrays hinsichtlich der Genexpressionsunterschiede auf Transkriptionsebene analysiert.

Für diese Arbeit ergeben sich folgende Fragestellungen:

- 1.) Kommt es im Rahmen des IGF-1 Generationstests zu spezifischen Änderungen der Genexpression in PBMC vor und nach Wachstumshormongabe?
- 2.) Gibt es Unterschiede oder Gemeinsamkeiten der Genexpressionsmuster zwischen verschiedenen kleinwüchsigen Patienten, die mit Wachstumshormon behandelt werden?
- 3.) Welche Gene könnten aufgrund ihres Expressionsprofils potentielle zukünftige Biomarker der Wachstumshormonwirkung sein? Welche biologischen Funktionen weisen diese Gene normalerweise auf?
- 4.) Lassen sich die Microarrayergebnisse mit der RT-PCR verifizieren?
- 5.) Gibt es eine Assoziation zwischen Genexpressionsänderungen und biologischem Ansprechen auf die Therapie in einem Beobachtungszeitraum von 6 Monaten bis 12 Monaten?

2. Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 Ethische Aspekte

Die Studie einschließlich Einverständniserklärung und Patientenaufklärungsbogen wurde der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel vorgelegt. Sie wurde abschließend unter dem Aktenzeichen D422/07 genehmigt.

Die Blutentnahme erfolgte im Rahmen des routinemäßig zur Diagnoseverifikation und Prädiktion durchgeführten IGF-1 Generationstests, so dass keine Blutentnahme nur zu Studienzwecken durchgeführt wurde.

2.1.2 Patienten

Die Genexpression (mRNA-Transkription) in peripheren mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) von insgesamt dreizehn Patienten wurde vor und nach viertägiger Gabe von rhGH (30 μ g/kg KG) untersucht. Ein vierzehnter Patient mit Verdacht auf einen IGF-1 Mangel erhielt vier Tage lang IGF-1 und wurde ebenfalls hinsichtlich der transkriptionellen Regulation untersucht.

Bei sieben Patienten wurde die mRNA-Transkription in PBMC mittels Microarrays untersucht. Die Ergebnisse der Microarrays wurden mit Hilfe der RT-PCR verifiziert. Die PBMC der anderen sieben Patienten wurden gezielt hinsichtlich der Genregulation von EGR1, EGR2, FOS und HBA1 mittels RT-PCR untersucht.

Die Patientenproben stammten von Patienten, die im Rahmen der Routine-Diagnostik einen IGF-1 Generationstest erhielten. Die Proben wurden nur mit Einwilligung der Eltern und/oder der Patienten in die Studie einbezogen.

In Tabelle 3 werden klinische Daten der Patienten zusammengefasst, die für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind. Die Tabelle umfasst die Diagnose, das chronologische Alter und das Knochenalter der Patienten zu Beginn der Wachstumshormontherapie. Das Knochenalter wird als altersentsprechend gewertet, wenn es mit \pm 1 Jahr dem chronologischen Alter entspricht. Knochenalterabweichungen um mehr als ein Jahr werden als retardiert bzw. akzeleriert bezeichnet.

Im Verlauf der Studie werden verschiedene Parameter dokumentiert. Die Körperhöhe und die SDS der Körperhöhe vor Therapiebeginn und die Wachstumsgeschwindigkeit (Wachstumsrate, WR) in cm/Jahr und die SDS vor Therapiebeginn. Außerdem wird die mit dem Knemometer gemessene Unterschenkellänge (mm) aufgeführt.

In der Tabelle 3 sind auch die Laborparameter IGF-1 vor der ersten Wachstumshormongabe (Tag 1) mit der zugehörigen Perzentile dokumentiert (alters- und geschlechtsabhängige Normwerte nach Mediagnost).

Zwei standardisierte Wachstumshormon-Stimulationstests, der Arginin Stimulationstest und der Insulin Hypoglykämie Test, sowie das berechnete Flächenintegral des Wachstumshormon-Nachtprofils (nächtliche, spontane Wachstumshormonausschüttung) sind ebenfalls in der Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Kasuistiken der Patienten

*teilweise unter bis dahin bestehender Wachstumshormongabe

Patient	P1	P2	P3
Diagnose	Zustand nach Craniopharyngeom	Bioinaktives Wachstumshormon	Verdacht auf GH-Resistenz
Chronologisches Alter (Jahre, Monate)	10 7/12	9 1/12	9 7/12
Knochenalter (Jahre, Monate) (Greulich und Pyle)	8 6/12	6 1/12	5 9/12
Körperhöhe vor Therapie, (cm, SDS)	138,6cm (-1,10)	127,1cm (-2,10)	121,1cm (-3,21)
WR vor Therapie, (cm/Jahr, SDS)	1,81 (-2,88)	4,64 (-0,79)	*4,74 (-0,75)
Unterschenkellänge (mm), Tag 1	365,2mm	311,5mm	285,5mm
IGF-1 (ng/ml), Tag 1 (Perzentile)	53 (<P0.1)	68 (P0.1)	67 (P0)
Arginin Stimulationstest (GH, ng/ml)	Nicht durchgeführt	28,1ng/ml	29,4ng/ml
Insulin Hypoglykämie Test (GH, ng/ml)	<0.5ng/ml	12,0ng/ml	Nicht verfügbar
Nachtprofil, Flächenintegral (GH, ng*min/ml)	Nicht durchgeführt	3821,6ng*min/ml	2288ng*min/ml

Normalwerte:

Arginin Stimulationstest, Insulin Hypoglykämie Test: >10ng/ml

Nachtprofil, Flächenintegral: 2000-6800ng*min/ml

Tabelle 3: Kasuistiken der Patienten

Patient	P4	P5	P6
Diagnose	Neurosekretorische Dysfunktion	Ullrich-Turner Syndrom	Neurosekretorische Dysfunktion
Chronologisches Alter (Jahre, Monate)	9 5/12	12 3/12	7 8/12
Knochenalter (Jahre, Monate) (Greulich und Pyle)	6	11	7
Körperhöhe vor Therapie, (cm, SDS)	124,4cm (-2,43)	138,7cm (-2,39)	112,8cm (-3,40)
WR vor Therapie, (cm/Jahr, SDS)	4,98 (-0,43)	4,51 (-1,01)	5,99 (0,39)
Unterschenkellänge (mm), Tag 1	294,4mm	350,0mm	269,4mm
IGF-1 (ng/ml), Tag 1 (Perzentile)	99 (P8)	208 (P16)	133 (P39)
Arginin Stimulationstest (GH, ng/ml)	34,3ng/ml	29,1ng/ml	8,6ng/ml
Insulin Hypoglykämie Test (GH, ng/ml)	19,0ng/ml	Nicht durchgeführt	11,8ng/ml
Nachtprofil, Flächenintegral (GH, ng*min/ml)	1387ng*min/ml	Nicht durchgeführt	773,2ng*min/ml

Normalwerte:

Arginin Stimulationstest, Insulin Hypoglykämietest: >10ng/ml

Nachtprofil, Flächenintegral: 2000-6800ng*min/ml

Tabelle 3: Kasuistiken der Patienten

Patient	P7	P8	P9
Diagnose	Neurosekretorische Dysfunktion, Z.n. Rheumatoide Arthritis	Neurosekretorische Dysfunktion	Hypophysärer GH-Mangel
Chronologisches Alter (Jahre, Monate)	14 8/12	13 7/12	10 8/12
Knochenalter (Jahre, Monate) (Greulich und Pyle)	13 9/12	12 3/12	10 6/12
Körperhöhe vor Therapie, (cm, SDS)	155,4cm (-1,84)	141,8cm (-3,14)	133,9cm (-1,98)
WR vor Therapie, (cm/Jahr, SDS)	6,03 (-0,71)	5,22 (0,60)	6,06 (0,08)
Unterschenkellänge (mm), Tag 1	415,6mm	371,8mm	332,6mm
IGF-1 (ng/ml), Tag 1 (Perzentile)	85 (P<0.1)	134 (P<0.1)	258 (P58)
Arginin Stimulationstest (GH, ng/ml)	36,0ng/ml	>10ng/ml	9,2ng/ml
Insulin Hypoglykämie Test (GH, ng/ml)	8,2ng/ml	>10ng/ml	4,6ng/ml
Nachtprofil, Flächenintegral (GH, ng*min/ml)	208,5ng*min/ml	1688ng*min/ml	Nicht verfügbar

Normalwerte:

Arginin Stimulationstest, Insulin Hypoglykämie Test: >10ng/ml

Nachtprofil, Flächenintegral: 2000-6800ng*min/ml

Tabelle 3: Kasuistiken der Patienten

Patient	P10	P11	P12
Diagnose	Neurosekretorische Dysfunktion	Bioinaktives Wachstumshormon	Neurosekretorische Dysfunktion
Chronologisches Alter (Jahre, Monate)	10 2/12	9 11/12	8 2/12
Knochenalter (Jahre, Monate) (Greulich und Pyle)	6 9/12	7 9/12	Nicht verfügbar
Körperhöhe vor Therapie, (cm, SDS)	126,2cm (-2,67)	130,0cm (-1,88)	116,3cm (-3,14)
WR vor Therapie, (cm/Jahr, SDS)	4,67 (-0,77)	7,37 (2,75)	4,47 (-1,56)
Unterschenkellänge (mm), Tag 1	308,0mm	315,0mm	265,6mm
IGF-1 (ng/ml), Tag 1 (Perzentile)	106 (P2)	104 (P5)	109 (P8)
Arginin Stimulationstest (GH, ng/ml)	Nicht verfügbar	22,5ng/ml	Nicht verfügbar
Insulin Hypoglykämie Test (GH, ng/ml)	Nicht verfügbar	18,1ng/ml	Nicht verfügbar
Nachtprofil, Flächenintegral (GH, ng*min/ml)	1800ng*min/ml	3114ng*min/ml	1894,9ng*min/ml

Normalwerte:

Arginin Stimulationstest, Insulin Hypoglykämie Test: >10ng/ml

Nachtprofil, Flächenintegral: 2000-6800ng*min/ml

Tabelle 3: Kasuistiken der Patienten

Patient	P13	P14
Diagnose	Neurosekretorische Dysfunktion	SGA
Chronologisches Alter (Jahre, Monate)	10 8/12	9 7/12
Knochenalter (Jahre, Monate) (Greulich und Pyle)	Nicht verfügbar	Nicht verfügbar
Körperhöhe vor Therapie, (cm, SDS)	128,7cm (-2,78)	125,1cm (-2,65)
WR vor Therapie, (cm/Jahr, SDS)	3,60 (-1,64)	8,03 (2,25)
Unterschenkellänge (mm), Tag 1	325,6mm	297,4mm
IGF-1 (ng/ml), Tag 1 (Perzentile)	120 (P3)	340 (P91)
Arginin Stimulationstest (GH, ng/ml)	15,1ng/ml	19,5ng/ml
Insulin Hypoglykämie Test (GH, ng/ml)	20,0ng/ml	27,7ng/ml
Nachtprofil, Flächenintegral (GH, ng*min/ml)	445ng*min/ml	Nicht verfügbar

Normalwerte:

Arginin Stimulationstest, Insulin Hypoglykämie Test: >10ng/ml

Nachtprofil, Flächenintegral: 2000-6800ng*min/ml

2.2 Material

Verbrauchsmaterialien:

Arrays (SDHA)	Stanford Genomics Facility, USA
Deckgläschen (Lifter Slip, 25mm x 60mm)	Erie Scientific Company, Portsmouth, USA
Einwegpipettenspitzen 10ml	Sarstedt, Nürnberg
Einwegpipettenspitzen:	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Biosphere [®] Filter Tips (10µl, 100µl, 1000µl)	
Erlenmeyer-Kolben	
Falcon-Röhrchen 15ml	Sarstedt, Nürnberg
LightCycler [®] Kapillaren (20µl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler [®] Kunststoffstopfen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler [®] Zentrifugenadapter	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Microcon YM-30 Säule	Millipore, Bedford, USA
Pipette (Typ Pipetus)	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Reaktionsgefäße 0,5ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Reaktionsgefäße 0,2ml (Multiply [®] -µStrip)	Sarstedt, Nürnberg
Röhrchen 50ml	Sarstedt, Nürnberg
Röhrchen 15ml	Sarstedt, Nürnberg

Geräte:

Glasschalen zum Waschen der Microarrays	
Geldokumentationsanlage (DeVision)	Decon Science Tec, Hohengandern
Gelelektrophoresekammer (Typ G45/1)	Whatman Biometra®, Göttingen
Heizplatte (Dri-Block DB-1)	Techne, biostep GmbH, Jahnsdorf
Hybridisierungskammer	Forschungswerkstatt der Medizinischen Hochschule Hannover
Inkubator	Heraeus, Hanau
LightCycler [®] Analysesystem	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler [®] Software 3.5	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PCR-Maschine (Mastercycler)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Plastikwanne	
Scanner (GenePix 4000B)	Axon Instruments, USA
Spannungsgerät (Typ EPS 601)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Thermocycler	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
UV-Crosslinker	Amersham Life Sciences, USA
UV-Kammer (ECX-20-M)	Vilber Lourmat, Marne La Vallee, France
Vortex-Gerät	VWR™ International GmbH, Darmstadt
Wasserbad (Typ 1083)	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifuge (Galaxy Mini)	VWR™ International GmbH, Darmstadt
Zentrifuge (Typ 5415D)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Zentrifuge (Typ 5417R)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Zentrifuge (Allegra™ X-22R)	Beckmann Coulter, Krefeld
Zentrifuge (Multifuge 3S-R)	Heraeus, Hanau
Zählkammer (Neubauer)	
Zentrifuge (Sigma 4K15C)	Qiagen GmbH, Hilden
Zentrifuge (Thermomixer)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Gebrauchslösungen und Chemikalien:

Agarose	Invitrogen™, Karlsruhe
Biocoll Separating Solution (Ficoll)	Biochrom AG, Berlin
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	J. T. Baker, Deventer, Holland
DNA ladder (100bp)	Invitrogen™, Karlsruhe
Endotoxin-free TE Buffer	Qiagen GmbH, Hilden
EDTA (Ethyldiaminetetraacetic acid)	Sigma®, Steinheim
Ethanol, 70%	J. T. Baker, Deventer, Holland
Ethidiumbromid 1%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycerol	Sigma®, Steinheim
MQ-Wasser	Millipore, Bedford, USA
PBS (Dulbecco's)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
SDS (Sodium Dodecyl Solution, 20%)	Sigma, USA
SSC, 20%	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Tris-EDTA	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

Tris (hydroxymethyl) – aminomethan	Merck, Darmstadt
Trizol	Invitrogen, USA
Türks Lösung	Merck, Darmstadt

Lösungen:

EDTA: Als Stammlösung wird eine 10mM EDTA-Verdünnung verwendet. Hierzu werden 3,72g EDTA in 1l Aqua bidest gelöst. pH 8,0.

10xTBE: Dazu werden 121g Tris Base, 61,7g Borsäure und 40ml 0,5M EDTA zusammen gegeben. Danach wird mit Aqua bidest auf 2l Gesamtvolumen aufgefüllt. pH 8,0.

1xTBE: Von der 10xTBE-Stammlösung werden 100ml entnommen und mit 900ml Aqua bidest versetzt. pH 8,0.

Bromphenolblaulösung 0,125%: In einem ersten Arbeitsschritt werden 2g Bromphenolblau in 100ml Aqua bidest gelöst und somit eine 2%ige Lösung hergestellt. Daraufhin werden 10ml von der 10mM EDTA Lösung mit 40ml Glycerol und 6,25ml der hergestellten Bromphenolblaulösung (2%) vermischt und mit Aqua bidest auf 100ml aufgefüllt.

2xSSC; 0,03%SDS: 100ml 20xSSC + 900ml H₂O + 1,5ml 20%SDS

2xSSC: 50ml 20xSSC + 450ml H₂O

1xSSC: 25ml 20xSSC + 475ml H₂O

0,2xSSC: 5ml 20xSSC + 495ml H₂O

0,1xSSC: 2,5ml 20xSSC + 497,5ml H₂O

Kits:

Agilent RNA 6000 Nano Reagents	Agilent Technologies, Lithuania
Rneasy mini kit	Qiagen GmbH, Hilden
MessengerAmp II aRNA Kit	Ambion, Austin, USA
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden

Primer

Die Synthese der Primer erfolgte extern durch die Syntheselabor GmbH TIB MOLBIOL in Berlin.

Tabelle 4: Primersequenzen

Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3' Orientierung
EGR-1 forward	AGCCCTACGAGCACCTGA
EGR-1 reverse	GGCAGTCGAGTGGTTTGG
EGR-2 forward	TTGACCAGATGAACGGAGTG
EGR-2 reverse	TGGTTTCTAGGTGCAGAGACG
FOS forward	CTACCACTCACCCGCAGACT
FOS reverse	AGGTCCGTGCAGAAGTCCT
HBA1 forward	CACGCTGGCGAGTATGGT
HBA1 reverse	CGAAGTGCGGGAAGTAGGT
SDHA forward	ACCAGGTCACACACTGTTGC
SDHA reverse	CGTAGAAATGCCACCTCCA

2.3 Methoden

2.3.1 Auxologische Daten

Die Körperhöhe wird mit dem Stadiometer des Knemometrielabors gemessen. Die Bestimmung der Unterschenkellänge wird an einem fest installierten Stuhl durchgeführt.

Zur Berechnung der Wachstumsrate werden zwei Messungen der Körperhöhe (frühe Messung: Körperhöhe 1, späte Messung: Körperhöhe 2) über einen definierten mehrmonatigen Zeitraum benötigt. Die Differenz (cm) wird durch die Anzahl der Monate des Beobachtungszeitraums dividiert und mit 12 multipliziert.

$$\text{WR (cm pro Jahr) } = \frac{(\text{Körperhöhe 2} - \text{Körperhöhe 1})}{\text{Anzahl der Monate}} \times 12$$

Normwerte und Abweichungen werden nach den Wachstumskurven nach Brandt/Reinken angegeben (Brandt & Reinken, 1988; Reinken et al., 1980; Reinken & van Oost, 1992).

2.3.2 IGF-1 Generationstest

Vor Beginn einer Therapie mit Wachstumshormon erfolgt stets morgens und nüchtern eine venöse Blutentnahme (Li-Heparin Plasma), bei der sowohl das IGF-1 als auch das Bindungsprotein 3 (IGF-BP3) bestimmt werden. Diese Werte werden als Ausgangswerte benutzt. Nach viertägiger Wachstumshormongabe in einer vom Körpergewicht und von der Diagnose abhängigen Dosis wird am Morgen des fünften Tages erneut venöses Blut entnommen und die beiden Laborparameter IGF-1 und IGF- BP3 bestimmt. Der Anstieg der IGF-1 Konzentration ist bei einem 1,5-fachen Anstieg signifikant.

IGF-1 und IGF-BP3 werden jeweils mittels direktem RIA (Radio Immuno Assay; Mediagnost) bestimmt. Die Konzentrationen des Wachstumshormons in den Stimulationstests und im Nachtprofil (Spontansekretion) werden mittels IRMA (Immune radiometric assay, Adaltis) bestimmt. Die Bestimmungen der Laborparameter werden im Endokrinologischen Labor der Arbeitsgruppe Pädiatrische Endokrinologie der Universitäts-Kinderklinik Kiel durchgeführt.

2.3.3 Vorbereitung für die Durchführung von Microarrays und RT-PCR

2.3.3.1 Gewinnung mononukleärer Zellen aus Patientenblut

Das im Rahmen der Routineblutentnahme mitentnommene EDTA-Röhrchen (5-10ml) wird in ein 50ml Röhrchen überführt und mit PBS auf ein Volumen von 35ml gebracht. In ein zweites 50ml Röhrchen werden 15ml Ficoll vorgegeben und mit dem Blut/PBS-Gemisch überschichtet. Im Anschluss wird das Ficollröhrchen bei 2400rpm (Rotationen pro Minute) für 20 Minuten zentrifugiert.

Nach dem Zentrifugieren wird die Interphase mit einer 10ml Pipette abgenommen, in ein 15ml Röhrchen überführt und bei 200rpm 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen, dem Zellpellet wird 10ml PBS zugegeben und mit Hilfe einer Stabpipette gut durchmischt.

Zum Bestimmen der Zellzahl werden 200 μ l der Zellsuspension in ein 1,5ml Reaktionsgefäß pipettiert, der im 15ml Tube verbleibende Rest nochmals bei 1300rpm für 5 Minuten zentrifugiert.

Von den 200 μ l werden 10 μ l Zellen mit 90 μ l Türks Lösung verdünnt (1:10) und anschließend in der Neubauer-Zählkammer 1 Großquadrat ausgezählt. Die Türks Lösung hämolysiert die Erythrozyten, so dass nur die Leukozyten gezählt werden. Die Berechnung der Zellzahl/ml erfolgt mit dieser Formel:

$$\text{Zellzahl} \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

Von den erneut zentrifugierten 10ml wird der Überstand abgegossen und das Zellpellet in 2ml aufgenommen.

2.3.3.2 RNA-Extraktion

Es werden für jede Probe 5ml PBS in ein 15ml Falcon-Reaktionsgefäß vorgelegt. Die Zellen werden eine Minute in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben, und im angetauten Zustand in PBS vollständig gelöst.

Homogenisierungsphase:

Nach fünfzehnminütiger Zentrifugation bei 2000rpm und 6°C wird der Überstand verworfen und zu dem Zellpellet 1ml Trizol/1x10⁷Zellen gegeben. Bei Raumtemperatur wird das Zellpellet 30 Minuten lang durch ständig wiederholtes Vortexen vollständig gelöst und auf einer Arbeitsfläche mit Abzug ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt.

Separationsphase:

Je 1ml Trizol werden 0,2ml Chloroform zugegeben, bei Raumtemperatur 2-3 Minuten lang kräftig durchmischt und 15 Minuten bei 12000rpm und 6°C zentrifugiert. Nach Überführen der oberen wässrigen Phase in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß werden 700µl 70% Ethanol hinzugegeben.

Säulen-Adsorptionsphase:

700µl der mit Ethanol versetzten wässrigen Zellsuspension werden auf eine Aufreinigungssäule des Rneasy mini kits (Qiagen GmbH) gegeben und anschließend bei Raumtemperatur für 15 Sekunden (10000rpm) zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Dieser Schritt wird mit der restlichen Flüssigkeit wiederholt.

Waschphase I:

Nach einer Gabe von 700µl RW1 Puffer auf den Filter der Säule folgt eine erneute Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10000rpm und Raumtemperatur. Das Collectiontube mit dem Durchfluss wird verworfen und die Säule in ein neues Collectiontube gegeben.

Waschphase II:

500µl RPE-Puffer werden auf den Filter der Säule gegeben, wiederum bei 10000rpm 15 Sekunden lang zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Waschphase III:

Erneut werden 500µl RPE-Puffer auf den Filter der Säule pipettiert. Nach 2 Minuten Zentrifugieren bei 10000rpm und Raumtemperatur wird der Durchfluss zusammen mit dem Collectiontube verworfen und die Säule in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben.

Elutionsphase:

50µl RNase-freies Wasser wird auf den Filter der Säule gegeben und 1 Minute lang bei 10000rpm zentrifugiert.

Der Durchfluss wird erneut auf die Säule gegeben und wiederum bei 10000rpm 1 Minute lang zentrifugiert.

Zur RNA werden 5µl 10xDNase I Puffer und 1µl DNase I pipettiert, kurz durchmischt, anzentrifugiert und anschließend bei 37°C 20-30 Minuten im Wärmeschrank inkubiert.

Das DNase-Inaktivierungsreagenz wird durch Vortexen resuspendiert und 5µl anschließend zum Ansatz pipettiert. Während der zweiminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird der Ansatz sobald sich Inaktivierungsreagenz absetzt gevortext und bei 10000rpm für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben.

Für die Quantifizierung der RNA werden 1µl der total RNA entnommen und in einem 0,2ml Reaktionsgefäß mit 1µl RNase-freiem Wasser verdünnt. Die restliche RNA-Lösung wird bei -80°C aufbewahrt.

2.3.3.3 RNA-Quantifizierung

Die RNA-Konzentration wird mit dem „RNA 6000 Nano Assay“ Kit gemessen. Dazu werden 1µl Farbstoff und 65µl eines filtrierte Gels in ein Reaktionsgefäß gegeben, kurz durchmischt und zehn Minuten bei 13000g zentrifugiert.

Der RNA Nano Chip wird in der Chip Priming Station platziert. Es werden 9µl des Gel-Farbstoff-Gemisches (G-F-Gem.) in ein Well (markiert mit G) blasenfrei pipettiert. Die Station wird verschlossen und für 30 Sekunden Druck ausgesetzt. Wiederum werden jeweils 9µl des Gemisches in zwei Wells (markiert mit G) gegeben. Die restlichen 13 Wells werden mit 5µl des RNA 6000 Nano Markers versetzt. Nach einer zweiminütigen Denaturierung bei 70°C werden 1µl des Standards und jeweils 1µl RNA in diese Wells hinzugefügt. Die folgende Tabelle zeigt schematisch die vollständige Beladung eines Chips.

Tabelle 5: RNA Nano Chip

5µl Marker + 1µl RNA	5µl Marker + 1µl RNA	5µl Marker + 1µl RNA	9µl G-F- Gem. (2. Schritt)
5µl Marker + 1µl RNA	5µl Marker + 1µl RNA	5µl Marker + 1µl RNA	9µl G-F-Gem. (2. Schritt)
5µl Marker + 1µl RNA	5µl Marker + 1µl RNA	5µl Marker + 1µl RNA	9µl G-F-Gem. (1.Schritt)
5µl Marker + 1µl RNA	5µl Marker + 1µl RNA	5µl Marker + 1µl RNA	5µl Marker + 1µl Standard

Der Chip wird eine Minute bei 2400rpm durchmischt und in das Analysegerät gestellt. Die Messung der RNA-Konzentration wird mit dem Agilent 2100 Bionalyzer bewerkstelligt.

2.3.4 cDNA-Microarrays

Prinzip:

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode dient der Messung von Genexpressionsunterschieden zweier Proben. Es handelt sich hierbei um die Probe vor Therapiebeginn mit Wachstumshormon und die Probe am Vormittag des fünften Tages der Wachstumshormonbehandlung. Nach verschiedenen Zwischenschritten wird die cDNA der beiden Proben mit zwei unterschiedlich fluoreszierenden Farbstoffen markiert und auf einem Microarray hybridisiert. Auf dem Microarray sind die Sequenzen von etwa 32000 Genen in Form mikroskopisch kleiner Punkte aufgedruckt. Die Hybridisierung erfolgt nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarbildung, wobei es zu einer Kompetition der beiden Proben um die Bindungsstelle kommt (Prinzip der kompetitiven Hybridisierung). Die Hybridisierung der beiden fluoreszierenden Farbstoffe wird mit einem Laser-Scanner gemessen und wird durch die Software Gene Pix Pro 6.0 voranalysiert. Dadurch wird die relative Herauf- oder Herunterregulation des Gens quantifiziert. Es findet keine Bestimmung der absoluten Transkriptzahl statt. Die Daten werden in der Stanford Microarray Database (Gollub et al., 2003) gespeichert und über einen Onlinezugang analysiert, sodass die Expression jedes einzelnen Gens berechnet werden kann.

Durchführung:

Die Methode wird mit dem Ambion MessengerAmp II aRNA Kit bewerkstelligt.

Reverse Transkription zur Synthese von First Strand cDNA:

2000ng RNA jeder Probe werden mit 1µl T7 Oligo (dT) Primer versetzt und mit Nuclease-freiem Wasser auf 12µl aufgefüllt. Anschließend werden die Proben bei 70°C für zehn Minuten in einer PCR-Maschine inkubiert, kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt.

Tabelle 6: Reaktionsmix der Reversen Transkription

	Menge pro Ansatz (µl)
10x First Strand Puffer	2
dNTP Mix	4
Rnase Inhibitor	1
Array Script	1
Gesamtvolumen	8

Das Gesamtvolumen von 8 μ l (Tabelle 6) wird zu den einzelnen Proben hinzugefügt und bei 42°C für zwei Stunden im Wärmeschrank inkubiert.

Second Strand cDNA Synthese:

Tabelle 7: Reaktionsmix der Zweitstrangsynthese

	Menge pro Ansatz (μ l)
Nuclease-freies Wasser	63
10x Second Strand Puffer	10
dNTP Mix	4
Rnase H	1
DNA Polymerase	2
Gesamtvolumen	80

Dieser Mix (80 μ l, Tabelle 7) wird am Ende der zwei Stunden in jede Probe pipettiert, kurz zentrifugiert und bei 16°C zwei Stunden in einer PCR-Maschine inkubiert.

cDNA Reinigung:

Zu jeder Probe werden 250 μ l cDNA Binding Puffer zugegeben. Nach kurzer Zentrifugation werden die Proben in ein cDNA Filter Cartridge überführt und bei 10000rpm für eine Minute wieder zentrifugiert. Anschließend wird die Flüssigkeit verworfen und der cDNA Filter Cartridge zurück in den Waschtube gesetzt. Nach der Zugabe von 500 μ l Wash-Puffer in jedes cDNA Filter Cartridge wird wiederum bei 10000rpm eine Minute lang zentrifugiert, die Flüssigkeit verworfen und eine weitere Minute bei gleicher Geschwindigkeit zentrifugiert. Der cDNA Filter Cartridge wird nun in ein sauberes Elution Tube überführt und in die Mitte des Filters 10 μ l 55°C warmes Nuclease-freies Wasser pipettiert. Nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgt eine Zentrifugation bei 10000rpm für 1,5 Minuten. Wiederum werden 10 μ l Nuclease-freies Wasser in die Mitte des Filters gegeben, die Proben für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und bei 10000rpm für 1,5 Minuten zentrifugiert. Die Proben werden bei -20°C über Nacht gelagert.

In vitro Transkription zur Synthese der aRNA:

In einem ersten Schritt wird folgender Ansatz (Tabelle 8) zusammen pipettiert und kurz zentrifugiert.

Tabelle 8: Reaktionsmix der In vitro Transkription

	Menge pro Ansatz (μ l)
T7 ATP Soln	4
T7 CTP Soln	4
T7 GTP Soln	4
T7 UTP Soln	4
T7 10x Reaction Puffer	4
T7 Enzym Mix	4
Gesamtvolumen	24

Der In vitro Transkriptions-Mix wird zu jeder Probe hinzugefügt. Die Proben werden für vier Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend 60 μ l Nuclease-freies Wasser hinzugefügt. 350 μ l aRNA Binding Puffer und 250 μ l 100% Ethanol werden in jede Probe pipettiert, mit einer Pipette vermischt und jede Probe in die aRNA Filter Cartridge gegeben. Diese werden bei 10000g eine Minute zentrifugiert und die Flüssigkeit verworfen. Im Folgenden werden 650 μ l Wash Puffer zu jeder aRNA Filter Cartridge gegeben, diese eine Minute bei 10000rpm zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und der Zentrifugationsvorgang wiederholt. Daraufhin wird die aRNA Filter Cartridge in ein neues aRNA Collection Tube überführt. 100 μ l des auf 55°C vorgeheizten Nuclease-freien Wassers werden in die Mitte des Filters gegeben, bei Raumtemperatur zwei Minuten stehen gelassen und bei 10000rpm für 1,5 Minuten zentrifugiert.

Die RNA-Proben werden bei -80°C gelagert und die aRNA nach dem gleichen Prinzip wie vorher beschrieben quantifiziert.

Nukleinsäure-Labeling:

Für diesen Schritt werden 4 μ g Proben-aRNA und 1,5 μ g Kontroll-aRNA benötigt. Zu jeder RNA werden jeweils 2 μ l Random-Hexamer Primer gegeben und mit Reinst-Wasser (RNase/DNase frei) auf ein Gesamtvolumen von 15,4 μ l aufgefüllt. Die Proben werden gemischt, kurz zentrifugiert, bei 65°C für zehn Minuten erhitzt und anschließend auf 4°C abgekühlt.

Daraufhin werden zu jedem Ansatz 14,6 μ l in folgender Zusammensetzung (Tabelle 9) pipettiert und zwei Stunden bei 42°C im Thermoblock inkubiert, die nach einer Stunde von einer erneuten Zugabe von 1 μ l SSII kurz unterbrochen wird.

Tabelle 9: Pipettierschema der Markierungsreaktion

	Probe (μl)	Kontrolle (μl)
5x First Strand Puffer	6	6
0.1M DTT	3	3
dNTP	0,6	0,6
Cy3 (blau)	----	3
Cy5 (rot)	3	----
Superscript II	2	2
Gesamtvolumen	14,6	14,6

Eine RNA-Degradierung und der Reaktionsstopp erfolgen durch Zugabe von 15 μl 0.1N NaOH, 2mM EDTA und einer Inkubation bei 65°C für zehn Minuten, die Neutralisierung mittels Zugabe von 15 μl 0.1N HCl.

Auf jeweils eine Microcon YM-30 Säule werden 380 μl TE und anschließend 60 μl des Cy3-Kontrollansatzes und 60 μl des Cy5-Probenansatzes gegeben. Nach einer achtminütigen Zentrifugation bei 12000rpm wird der Durchfluss entfernt, zur Aufreinigung 450 μl TE auf die Säule gegeben. Die Zentrifugation wird wiederholt und der Durchfluss erneut verworfen. Nachdem 474 μl des unten aufgeführten Ansatzes (Tabelle 10) hinzugefügt werden folgt eine neunminütige Zentrifugation bei 12000rpm, bei der die Restflüssigkeit möglichst vollständig entfernt sein sollte. Je nach optischer Beurteilung der Restflüssigkeitsmenge erfolgen weitere einminütige Zentrifugationen bei 13400rpm bis die restliche Flüssigkeitsmenge nur noch einen äußeren Ring auf dem Filter bildet.

Tabelle 10: Pipettierschema der Microarray-Hybridisierungslösung

	Menge pro Ansatz (μl)
TE	450
Cot1-human DNA (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	20
PolyA-RNA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	2
total-RNA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	2
Gesamtvolumen	474

Zum Sammeln der gelabelten cDNA wird die Microcon YM-30 Säule umgedreht und auf ein sauberes Eppendorftube gesetzt. Bei einer Kurzzentrifugation von 15 Sekunden bei 16100rpm überführt man die cDNA mittels der Restflüssigkeit.

Es folgt die Bestimmung des Volumens der cDNA mit Hilfe einer Pipette und anschließend das Einstellen der Flüssigkeitsmenge mit 1x TE-Puffer auf 32µl Endvolumen.

Es werden 6,75µl 20xSSC und 1,20µl 10%SDS hinzugefügt, die Proben bei 100°C für zwei Minuten denaturiert und anschließend bei 16100rpm für 30 Minuten zentrifugiert.

Vorbereitung der Arrays:

Zunächst wird eine Prähybridisierungslösung (Tabelle 11) angesetzt und in einer Glaswanne bei 50°C im Wasserbad vorgewärmt.

Tabelle 11: Prähybridisierungslösung

	Menge (ml)
20xSSC	37,5
H ₂ O	210
10%SDS	2.5
BSA	2.5
Gesamtvolumen	250

In eine Kunststoffwanne werden 100ml 1xSSC gegeben. Die Ausdehnung des mit DNA-bedruckten Bereichs (Spotfeld) wird auf der unbedruckten (ungespotteten) Seite mit einem Diamantstift auf dem Array markiert, mit der gespotteten Fläche nach unten über die Flüssigkeit in der Kunststoffwanne gelegt und mit einem Deckel verschlossen. Zum Fixieren der Spots wird der Array nach drei Minuten entnommen und mit der ungespotteten Seite drei Sekunden auf eine 100°C heiße Heizplatte gegeben und anschließend im UV-Crosslinker mit 650 mJoule bestrahlt.

Die Arrays werden dann in einem Rack für 45 Minuten bei 50°C in der vorbereiteten Lösung (Tabelle 11) prähybridisiert. Zum Waschen der Arrays werden diese jeweils für zwei Minuten nacheinander in drei mit MQ-Wasser gefüllten Glaswannen geschwenkt. Die Arrays werden daraufhin bei 600rpm für vier Minuten zentrifugiert und somit getrocknet.

Hybridisierung:

Der getrocknete Array wird in die Hybridisierungskammer gelegt und der gelabelte cDNA-Mix mit einer Pipette auf das vordere Ende des Spotfeldes gegeben. Für ein gleichmäßiges

Hybridisieren wird das Spotfeld möglichst blasenfrei mit einem Deckglas verschlossen. Um eine Austrocknung der Flüssigkeit zu verhindern wird in das rechte Reservoir 15µl und in jede Ecke 3µl 3xSSC pipettiert. Nach Verschluss der Kammer folgt die Hybridisierung bei 65°C für 14 bis 18 Stunden.

Reinigung des Arrays:

Für das Reinigen des Arrays werden mehrere Kammern benötigt. Der Arbeitsablauf wird in der folgenden Tabelle schematisch dargestellt.

Tabelle 12: Waschen hybridisierter Microarrays

Kammer	Lösung	Arbeitsvorgang
1	2xSSC; 0,03%SDS	Array in die Kammer halten bis Deckglas abfällt
2	2xSSC; 0,03%SDS	Array in den Rag setzen, 2 Minuten in der Kammer agitieren
		Array aus dem Rag nehmen, kurz abtropfen lassen
3	2xSSC	Array mit der Hand 10 Mal in die Kammer tauchen (schwenken)
		Array herausnehmen, abtropfen lassen
4	1xSSC	Array in den Rag setzen, 2 Minuten in der Kammer agitieren
5	0,2xSSC	Array mit dem gleichen Rag in der Kammer 2 Minuten agitieren
6	0,1xSSC	Array mit dem gleichen Rag in der Kammer 2 Minuten agitieren

Schlussendlich werden die Arrays bei 600rpm für vier Minuten zentrifugiert und mit dem GenePix4000B Gerät und der Gene Pix Pro 6.0 Software gescannt. Die Daten werden in die „Stanford Microarray Database“ (Gollub et al., 2003) transferiert und sind dort gespeichert.

Die Genexpression der PBMC von den Patienten P1 bis P7 wurden per Microarray analysiert, wobei die Genexpression der Patienten P1, P3 und P4 doppelt untersucht wurde. Demnach wurden insgesamt 10 Microarrays von 7 Patienten ausgewertet.

2.3.5 Hierarchische Clusteranalyse der Microarray Daten

Die Microarray Daten werden mit einer hierarchischen Clusteranalyse (Eisen et al., 1998) analysiert. Hierbei wird ein unsupervidierter Ansatz gewählt, da es sich um ein

Screeningverfahren handelt. Das zuvor durchgeführte „Gridding“ mit der Software Gene Pix Pro 6.0 hat bereits offensichtliche Artefakte identifiziert und ausgeschlossen.

Es werden nur Gene berücksichtigt, die mindestens in 80% der Microarrays auswertbare Hybridisierungssignale zeigen und die in mindestens drei von zehn Microarrays zweifach hoch- oder runterreguliert sind. Einzelne Hybridisierungssignale entsprechen dann einem signifikanten Signal, wenn in einem der beiden Kanäle (Cy5 oder Cy3) die Signalintensität mindestens 50% über der Hintergrundaktivität liegt.

Die hierarchische Clusteranalyse gruppiert Gene mit ähnlichen Expressionsmustern. Das Programm Cluster ordnet die Expressionsdaten hierarchisch nach Ähnlichkeiten bezogen auf die Gene und die Patienten. Zugrunde liegt die Pearson Korrelation, innerhalb des Clusterprogramms wird der Algorithmus „Average Linkage Clustering“ gewählt. Gene mit einem ähnlichen Expressionsmuster clustern eng beieinander und weisen häufig miteinander im Zusammenhang stehende biologische Funktionen auf (Eisen et al., 1998). Dadurch ergeben sich Hinweise über biologisch zusammenhängende Signaturen. Mit dem Tree View Programm werden die Ergebnisse der hierarchischen Clusteranalyse graphisch dargestellt.

2.3.6 Synthese von komplementärer DNA (cDNA) für RT-PCR

Prinzip:

Die cDNA-Synthese ermöglicht die Umschreibung von RNA zu der für die Real Time – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) benötigte cDNA. Dazu werden in einen Ansatz Gesamt-RNA und Random Hexamer Primer gegeben. Die reverse Transkription von RNA in cDNA erfolgt mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase und den zur Herstellung von DNA benötigten desoxy-Nukleosidtriphosphaten (dNTPs). Es werden weitere Zusätze benötigt, um passende Reaktionsbedingungen zu schaffen. Es wird nur mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetztes Wasser verwendet. DEPC inaktiviert RNasen durch kovalente Modifikationen im aktiven Zentrum der Enzyme (Jurk 1998).

Durchführung:

Die cDNA-Synthese wird mit dem Fermentas-Kit durchgeführt. Dazu werden 1µg Gesamt-RNA in ein 1,5ml Gefäß pipettiert. Es werden 2µl Random-Hexamer Primer, ein unspezifischer Primer, hinzugefügt und durch die Zugabe von DEPC-Wasser ein Gesamtvolumen von 26µl erreicht. Die Proben werden gemischt und 3-5 Sekunden zentrifugiert. Daraufhin folgt eine fünfminütige Inkubation bei 70° im Thermocycler, die das

Ziel hat, die RNA in einer linearen Form zu halten und Vernetzungen zu vermeiden. Die RNA wird im Thermocycler auf 4°C abgekühlt und auf Eis gelagert.

Nach kurzem Vortexen und Anzentrifugieren werden zu jeder Probe ein Mix aus 8µl Reaktions-Puffer, sowie 1µl RNase-Inhibitor und 4µl dNTP gegeben. Die Proben werden wiederum mit dem Vortexer vermischt und kurz zentrifugiert, bevor die Proben für fünf Minuten bei 25°C im Thermocycler inkubiert werden. Anschließend wird jeder Probe 1µl der M-MuLV Transkriptase zugefügt. Die Proben werden in den Thermocycler gestellt und erst zehn Minuten bei 25°C, anschließend eine Stunde bei 42°C inkubiert, zur Inaktivierung der Enzyme auf 70°C für 10 Minuten erhitzt und letztendlich auf 4°C abgekühlt. Durch Zugabe von TE-Puffer werden Lösungen mit cDNA-Konzentrationen von 12,5ng/µl (1:2) und 3,125ng/µl (1:8) hergestellt. Die Proben werden bei -20°C gelagert.

2.3.7 Real Time – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Prinzip:

Mit der Polymerase Ketten Reaktion (PCR) ist es möglich, klar definierte DNA-Sequenzabschnitte in vitro zu amplifizieren (Mullis & Faloona, 1987). Die Methode der RT-PCR ermöglicht eine Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte und dessen relative Quantifizierung.

Definierte Oligonukleotide (Primer) grenzen den DNA-Abschnitt ein und sind komplementär zu den Basen der 3' Enden von kodierendem (Forward Primer) und nicht kodierendem Strang (Reverse Primer). Zur Anlagerung der Primer muss der DNA-Doppelstrang zunächst durch Hitze denaturiert werden. Bei tieferen Temperaturen erfolgt später die Anlagerung der Primer. Neben den definierten Oligonukleotiden werden bei jedem Ansatz sowohl das Enzym DNA-Polymerase als auch die zur Verlängerung der DNA benötigten Bausteine, die dNTPs, zugeführt. Die DNA-Polymerase verlängert den DNA-Strang ausgehend vom Oligonukleotid, der komplementäre Strang dient dabei als Matrize.

Der Zyklus bestehend aus Denaturierung der DNA, Anlagerung der Primer an die Einzelstränge und Synthese der DNA durch DNA-Polymerase wird wiederholt, wodurch die DNA-Doppelstranganzahl exponentiell steigt.

Zudem wird jedem Reaktionsansatz SYBR Green zugefügt. Dies ist ein Farbstoff, der sich in die gebildete doppelsträngige DNA einlagert. Bei der Bindung an die doppelsträngige DNA fluoresziert der Farbstoff. Die Stärke der Fluoreszenz spiegelt die Menge der mit der RT-PCR amplifizierten DNA wieder und wird mit dem LightCycler Analysesystem gemessen.

Für die Analyse, die relative Quantifizierung, werden neben der Patienten-DNA auch eine Calibrator-DNA und neben dem zu untersuchenden Target-Gen auch ein Referenz-Gen benötigt. Die Calibrator-DNA dient zur Normalisierung aller Proben innerhalb eines RT-PCR-Laufs und als konstanter Kalibrierungspunkt zwischen mehreren Läufen. Das Referenz-Gen Succinyldehydrogenase (SDHA) hat ein ähnliches Expressionslevel wie das Target-Gen und wird nicht reguliert (Housekeeping Gen). Das Verhältnis zwischen Target- und Referenz-Gen dient dazu Unterschiede in Qualität und Quantität in jeder einzelnen Probe zu normalisieren.

Normalisiertes Ratio:

$$\frac{\text{Konzentration Targetgen (Patienten - DNA)}}{\text{Konzentration Referenzgen (Patienten - DNA)}} \div \frac{\text{Konzentration Targetgen (Calibrator - DNA)}}{\text{Konzentration Referenzgen (Calibrator - DNA)}}$$

Die Analyse erfolgt mit der LightCycler Relativen Quantifikation Software. Es wird die „Calibrator- normalisierte relative Quantifizierung mit Effizienzkorrektur“ gewählt. Die Effizienzkorrektur korrigiert zusätzlich Unterschiede in der PCR-Effizienz zwischen Target- und Referenz-Gen.

Ziel der RT-PCR war es, die Daten der Microarrays für die gewählten Gene exemplarisch und methodisch unabhängig zu verifizieren. Somit wurde der Expressionsunterschied der Patientenproben vor und nach Wachstumshormongabe im IGF-1 Generationstest überprüft.

Durchführung:

Primerherstellung und –aufbereitung

Die Gene EGR1, EGR2, FOS und HBA1 wurden für die Verifikation per RT-PCR ausgewählt, SDHA stellt das Housekeeping Gen dar. Die DNA-Sequenz der Gene ist bekannt und wurde aus der NCBI Genbank (Tabelle 13) übernommen.

Tabelle 13: NCBI Genbank Nummern

Gen	NCBI Genbank (RefSeq Nummer)
EGR1	NM_001964.2
EGR2	NM_000399.2
FOS	NM_005252.2
HBA1	NM_000558.3
SDHA	NM_004168.1

Mit Hilfe dieser Sequenzen und der Universal Probe Library (Roche Applied Science) wird für jedes Gen ein Primerpaar ermittelt. Bei der Primerauswahl wird darauf geachtet, dass die Primer Intron-Exon übergreifend sind, um die Bindung genomischer DNA zu vermeiden.

Die Herstellung der Primer erfolgt extern in dem Syntheselabor GmbH TIB MOLBIOL in Berlin. Es wird eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100µM (100 pmol/µl) durch Zugabe von TE-Puffer (pH 8) angelegt. Alle Oligos werden bei -20°C gelagert.

In der Tabelle 14 wird das Pipettierschema für die RT-PCR aufgeführt.

Tabelle 14: Pipettierschema der RT-PCR

Reagenzien	Pro Ansatz in µl	Negativkontrolle
SYBR [®] Green PCR-Mix	2	2
Primer forward (100pmol/µl)	1	1
Primer reverse (100pmol/µl)	1	1
RNase-freies Wasser	6	8
cDNA (3,125ng/µl)	2	0
Gesamtvolumen	20	20

Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes wird in 20µl LightCycler Kapillaren pipettiert, mit einem Kunststoffstopfen verschlossen und daraufhin bei 3500rpm für 15 Sekunden zentrifugiert.

Die Kapillaren werden in das LightCycler Probenkarussell gesetzt und das bestückte Probenkarussell in das LightCycler Analysesystem gestellt.

Die RT-PCR lief nach folgendem Schema ab (Tabelle 15):

Tabelle 15: RT-PCR Programm

Schritt (Zyklen)	Temperatur (°C)	Inkubationszeit (min)	Heiz-/Kühlrate (°C/sec)
Denaturierung (1)	95	15:00	20.00
Synthese (50)	94	00:15	20.00
	55	00:25	20.00
	72	00:25	20.00
Schmelzkurve (1)	95	00:40	20.00
	50	00:40	20.00
	95	00:00	0.10
Kühlung (1)	40	01:00	20

Die initiale Denaturierung bei 95°C dient der Aktivierung der DNA-Polymerase.

Die eigentliche PCR-Phase beginnt mit einer Denaturierung bei 94°C, die eine Einzelstrangbildung der cDNA bewirkt. Bei einer Temperatur von 55°C folgt nun die spezifische Anlagerung der Primer an den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt (Annealing). Im Folgenden werden die Proben auf 72°C erwärmt, um optimale Synthesebedingungen für die DNA-Polymerase zu schaffen (Elongation). Dieser Synthese-Zyklus wird fünfzig Mal wiederholt.

Die darauf folgende Schmelzkurve dient dem Spezifitätsnachweis. Am Schmelzpunkt wird aus der doppelsträngigen DNA einsträngige DNA. Dieser Punkt variiert je nach ihrer Länge und ihres Guanin- und Cytosingehalts. Der Schmelzpunkt ist für das PCR-Produkt spezifisch und hilft die spezifischen Produkte der RT-PCR von den unspezifischen Produkten, wie zum Beispiel Primer-Dimeren, abzugrenzen. Schlussendlich wird das Gerät abgekühlt.

Bevor die Patienten-DNA mittels relativer Quantifizierung analysiert werden konnte müssen zunächst die Primer getestet und mit Hilfe von Verdünnungsreihen Standardkurven hergestellt werden.

Primertest

In einem ersten Schritt werden die Primer mittels RT-PCR auf ihre Spezifität getestet. Dazu werden für jedes Primerpaar zwei Ansätze mit Calibrator-DNA und eine Negativkontrolle angelegt und auf einem Agarosegel auf die zu erwartende Länge überprüft (siehe 2.3.7).

Standardkurve

Die Verdünnungsreihen werden so gewählt, dass der zu erwartende Konzentrationsbereich der Patientenproben abgedeckt wird. Die Stammlösung der DNA mit einer Konzentration von

25,0ng/μl wird mit TE-Puffer 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 und 1:128 verdünnt. Die RT-PCR mit drei Replikaten für die insgesamt sieben Verdünnungsstufen wird für jedes Target-Gen und das Referenz-Gen durchgeführt und liefert nach einer Auswertung mit der LightCycler Relativen Quantification Software für jedes Gen eine Standardkurve.

Patienten-DNA

Nach Erstellen der Standardkurve beginnt die Testung der Patienten-cDNA. In der Tabelle 16 wird exemplarisch der Aufbau eines RT-PCR Laufs dargestellt.

Tabelle 16: Schematischer Aufbau eines RT-PCR-Laufs

1	Calibrator-DNA	Target-Gen
2	Calibrator-DNA	Target-Gen
3	Calibrator-DNA	Target-Gen
4	Calibrator-DNA	SDHA
5	Calibrator-DNA	SDHA
6	Calibrator-DNA	SDHA
7	Patient 1, Probe 1	Target-Gen
8	Patient 1, Probe 1	Target-Gen
9	Patient 1, Probe 1	Target-Gen
10	Patient 1, Probe 1	SDHA
11	Patient 1, Probe 1	SDHA
12	Patient 1, Probe 1	SDHA
13	Patient 1, Probe 2	Target-Gen
14	Patient 1, Probe 2	Target-Gen
15	Patient 1, Probe 2	Target-Gen
16	Patient 1, Probe 2	SDHA
17	Patient 1, Probe 2	SDHA
18	Patient 1, Probe 2	SDHA
19	Patient 2, Probe 1	Target-Gen
20	Patient 2, Probe 1	Target-Gen
21	Patient 2, Probe 1	Target-Gen
22	Patient 2, Probe 1	SDHA
23	Patient 2, Probe 1	SDHA
24	Patient 2, Probe 1	SDHA
25	Patient 2, Probe 2	Target-Gen
26	Patient 2, Probe 2	Target-Gen
27	Patient 2, Probe 2	Target-Gen
28	Patient 2, Probe 2	SDHA
29	Patient 2, Probe 2	SDHA
30	Patient 2, Probe 2	SDHA
31	Aqua	SDHA
32	Aqua	Target-Gen

2.3.8 Agarosegelelektrophorese

Prinzip:

Die in der RT-PCR amplifizierten DNA-Fragmente wandern aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld in Richtung Anode und trennen sich dabei entsprechend ihrer Länge auf. Ethidiumbromid macht die dabei entstandenen Banden unter UV-Licht sichtbar. Mit Hilfe des Längenmarkers kann die Größe des amplifizierten Fragments abgeschätzt und das Ergebnis der RT-PCR kontrolliert werden.

Durchführung:

Hierzu wird ein zwei Prozentiges Agarosegel hergestellt. In einen Erlenmeyerkolben werden 1g Agarose und 50ml 1xTBE gegeben. Anschließend wird dieses Gemisch in einer Mikrowelle erhitzt und das Agarosepulver gelöst. Zwischenzeitlich wird ein Kamm in die Gelelektrophorese-Kammer gegeben und die beiden offenen Enden mit Klebeband abgeklebt. Die klare Flüssigkeit wird auf etwa 60°C abgekühlt, mit 2µl Ethidiumbromid versehen und in die vorbereitete Gelelektrophorese-Kammer gegossen. Nach einer zehnminütigen Abkühlphase ist das Gel fest und der Kamm kann gezogen werden. Die Gelelektrophorese-Kammer wird mit 1xTBE befüllt. In die Taschen werden jeweils das Gemisch aus 7µl des RT-PCR-Produktes und 2µl Bromphenolblau (0,125%) (mit Glycerol und Wasser) pipettiert. Zusätzlich zu den Patientenproben werden in den beiden äußeren Taschen der Reihe 2µl eines 100bp (Basenpaare) Längenstandards aufgetragen. Das Gel wird für eine Stunde einer Netzspannung von 80V ausgesetzt. Anschließend werden die Banden auf dem UV-Tisch betrachtet. Die Anfertigung eines Photos unter UV-Licht ermöglicht eine Dokumentation und Auswertung der Banden.

3. Ergebnisse

3.1 Klinische Ergebnisse

In Tabelle 17 sind die klinischen Ergebnisse der Patienten P1 bis P14 nach mindestens sechs Monaten Wachstumshormontherapie aufgeführt. Neben auxologischen Daten wie der Unterschenkellänge an Tag 1 und Tag 5 als Kurzzeitwert des Therapieansprechens und der Wachstumsrate (WR) und dessen Standardabweichung vor und unter Wachstumshormontherapie ist auch der Serumparameter IGF-1 dargestellt. Übersichtshalber werden auch die Werte vor Therapiebeginn in der Tabelle mit aufgeführt.

Tabelle 17: Auxologische Daten und IGF-1 Werte der Patienten

(*teilweise unter bis dahin bestehender Wachstumshormongabe, **unter IGF-1 Gabe)

Patient	P1	P2	P3
Diagnose	Zustand nach Craniopharyngeom	Bioinaktives Wachstumshormon	Verdacht auf GH-Resistenz
Körperhöhe vor Therapiebeginn, (cm, SDS)	138,6cm (-1,10)	127,1cm (-2,10)	121,1cm (-3,21)
Körperhöhe unter Therapie, (cm, SDS)	144,6cm (-0,55)	131,1cm (-1,76)	123,3cm (-3,11)
WR vor Therapiebeginn, (cm/Jahr, SDS)	1,81 (-2,88)	4,64 (-0,79)	*4,74 (-0,75)
WR unter Therapie, (cm/Jahr, SDS)	11,85 (3,72)	8,25 (3,79)	**4,73 (-0,53)
Unterschenkellänge (mm), Tag 1	365,2mm	311,5mm	285,5mm
Unterschenkellänge (mm), Tag 5	366,7mm	311,6mm	286,3mm
Anstieg der Unterschenkellänge (mm), Tag 1-5	1,5mm	0,1mm	0,8mm
IGF-1(ng/ml),Tag1 (Perzentile)	53 (<P0.1)	68 (P0.1)	67 (P0)
IGF-1(ng/ml),Tag5 (Perzentile)	328 (P90-95)	113 (P10)	430 (>P99)

Tabelle 17: Auxologische Daten und IGF-1 Werte der Patienten

Patient	P4	P5	P6
Diagnose	Neurosekretorische Dysfunktion	Ullrich-Turner Syndrom	Neurosekretorische Dysfunktion
Körperhöhe vor Therapiebeginn, (cm, SDS)	124,4cm (-2,43)	138,7cm (-2,39)	112,8cm (-3,40)
Körperhöhe unter Therapie, (cm, SDS)	129,0cm (-1,97)	142,5cm (-2,33)	117,1cm (-3,03)
WR vor Therapiebeginn, (cm/Jahr, SDS)	4,98 (-0,43)	4,51 (-1,01)	5,99 (0,39)
WR unter Therapie, (cm/Jahr, SDS)	9,49 (5,45)	8,26 (1,38)	8,31 (3,37)
Unterschenkellänge (mm), Tag 1	294,4mm	350,0mm	269,4mm
Unterschenkellänge (mm), Tag 5	295,6mm	351,1mm	269,9mm
Anstieg der Unterschenkellänge (mm), Tag 1-5	1,2mm	1,1mm	0,5mm
IGF-1 (ng/ml), Tag 1 (Perzentile)	99 (P8)	208 (P16)	133 (P39)
IGF-1 (ng/ml), Tag 5 (Perzentile)	90 (P5)	574 (P85)	144 (P47)

Tabelle 17: Auxologische Daten und IGF-1 Werte der Patienten

Patient	P7	P8	P9
Diagnose	Neurosekretorische Dysfunktion, Z.n. Rheumatoide Arthritis	Neurosekretorische Dysfunktion	Hypophysärer GH-Mangel
Körperhöhe vor Therapiebeginn, (cm, SDS)	155,4cm (-1,84)	141,8cm (-3,14)	133,9cm (-1,98)
Körperhöhe unter Therapie, (cm, SDS)	161,0cm (-1,62)	146,0cm (-2,90)	142,5cm (-1,33)
WR vor Therapiebeginn, (cm/Jahr, SDS)	6,03 (-0,71)	5,22 (0,60)	6,06 (0,08)
WR unter Therapie, (cm/Jahr, SDS)	11,05 (2,18)	8,03 (3,97)	9,52 (2,07)
Unterschenkellänge (mm), Tag 1	415,6mm	371,8mm	332,6mm
Unterschenkellänge (mm), Tag 5	416,4mm	372,9mm	334,3mm
Anstieg der Unterschenkellänge (mm), Tag 1-5	0,8mm	1,1mm	1,7mm
IGF-1 (ng/ml), Tag 1 (Perzentile)	85 (P<0.1)	134 (P<0.1)	258 (P58)
IGF-1 (ng/ml), Tag 5 (Perzentile)	307 (P21)	274 (P20)	280 (P77)

Tabelle 17: Auxologische Daten und IGF-1 Werte der Patienten

Patient	P10	P11	P12
Diagnose	Neurosekretorische Dysfunktion	Bioinaktives Wachstumshormon	Neurosekretorische Dysfunktion
Körperhöhe vor Therapiebeginn, (cm, SDS)	126,2cm (-2,67)	130,0cm (-1,88)	116,3cm (-3,14)
Körperhöhe unter Therapie, (cm, SDS)	134,5cm (-1,83)	135,3cm (-1,49)	121,7cm (-2,50)
WR vor Therapiebeginn, (cm/Jahr, SDS)	4,67 (-0,77)	7,37 (2,75)	4,47 (-1,56)
WR unter Therapie, (cm/Jahr, SDS)	9,41 (4,52)	9,93 (5,42)	10,43 (5,57)
Unterschenkellänge (mm), Tag 1	308,0mm	315,0mm	265,6mm
Unterschenkellänge (mm), Tag 5	309,5mm	316,8mm	267,4mm
Anstieg der Unterschenkellänge (mm), Tag 1-5	1,5mm	1,8mm	1,8mm
IGF-1 (ng/ml), Tag 1 (Perzentile)	106 (P2)	104 (P5)	109 (P8)
IGF-1 (ng/ml), Tag 5 (Perzentile)	144 (P18)	156 (P37)	205 (P55)

Tabelle 17: Auxologische Daten und IGF-1 Werte der Patienten

Patient	P13	P14
Diagnose	Neurosekretorische Dysfunktion	SGA
Körperhöhe vor Therapiebeginn, (cm, SDS)	128,7cm (-2,78)	125,1cm (-2,65)
Körperhöhe unter Therapie, (cm, SDS)	135,1cm (-2,37)	129,1cm (-2,36)
WR vor Therapiebeginn, (cm/Jahr, SDS)	3,60 (-1,64)	8,03 (2,25)
WR unter Therapie, (cm/Jahr, SDS)	7,19 (0,62)	7,53 (1,44)
Unterschenkellänge (mm), Tag 1	325,6mm	297,4mm
Unterschenkellänge (mm), Tag 5	326,9mm	298,4mm
Anstieg Unterschenkellänge (mm), Tag 1-5	1,3mm	1,0mm
IGF-1 (ng/ml), Tag 1 (Perzentile)	120 (P3)	340 (P91)
IGF-1 (ng/ml), Tag 5 (Perzentile)	187 (P25)	606 (>P99)

Zur Veranschaulichung der in der Tabelle 17 aufgeführten Ergebnisse werden in der Abbildung 5 die Standardabweichung der Wachstumsraten vor und nach Therapie graphisch dargestellt. Die Wachstumsraten (cm/Jahr) der Patienten wurden zum einen über einen Zeitraum von sechs Monaten vor und zum anderen über einen Zeitraum von sechs Monaten nach Therapiebeginn berechnet. Der erste Wert von Patient P3 wurde unter Wachstumshormongabe, der zweite Wert unter IGF-1 Gabe berechnet. Das Balkendiagramm gibt die Standardabweichung der Wachstumsraten über die jeweiligen Zeiträume vor und nach sechs Monaten Wachstumshormongabe wieder. Die y-Achse zeigt die Standardabweichungen der Wachstumsraten, die x-Achse zeigt die Patienten.

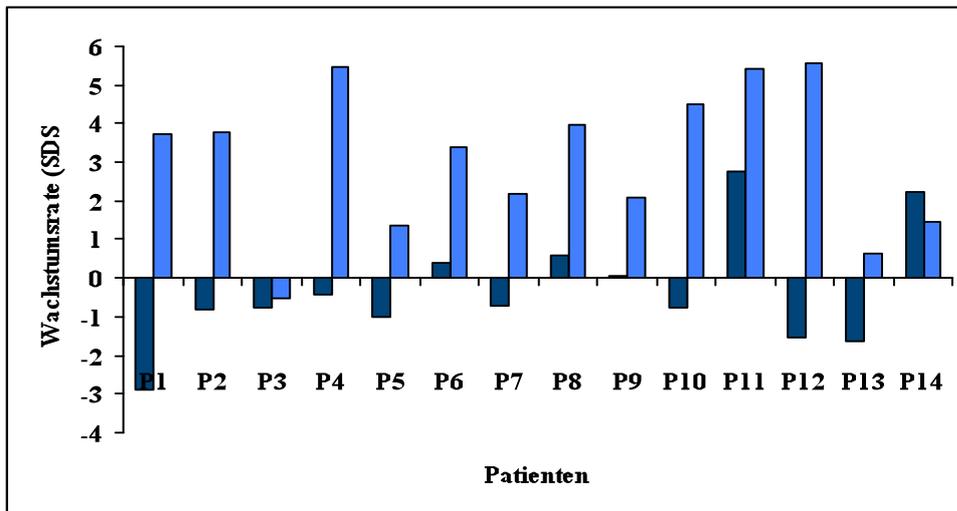


Abbildung 5: Standardabweichungen (SDS) der Wachstumsraten der Patienten P1 bis P14

Die Abbildung 5 zeigt bei 13 von 14 Patienten einen Anstieg der Standardabweichung der Wachstumsraten, bei Patient P14 einen Abfall der Standardabweichung der Wachstumsrate.

In der Abbildung 6 werden auf der y-Achse der Anstieg der Unterschenkelänge von Tag 1 bis Tag 5 der Wachstumshormontherapie und auf der x-Achse die Patienten P1 bis P14 dargestellt.

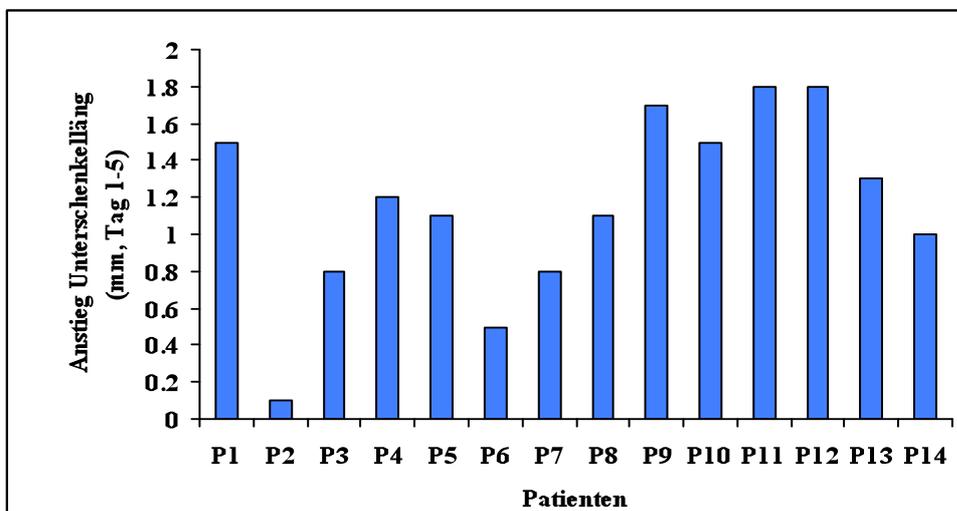


Abbildung 6: Anstieg der Unterschenkelänge (mm, Tag 1 bis Tag 5 der Therapie)

Mit Ausnahme von Patient P2 zeigen alle Patienten von Tag 1 bis Tag 5 der Wachstumshormongabe einen deutlichen Anstieg der am Knemometer gemessenen Unterschenkelänge.

In der Abbildung 7 erfolgt eine graphische Darstellung der in der Tabelle 17 aufgeführten IGF-1 Werte. Das Balkendiagramm zeigt die IGF-1 Werte im Rahmen des IGF-1

Generationstest an Tag 1 und an Tag 5 der Wachstumshormongabe. Der Anstieg der IGF-1 Konzentration ist bei einem mindestens 1,5fachen Anstieg signifikant. Die y-Achse zeigt die IGF-1 Konzentration (ng/ml), die x-Achse zeigt die Patienten.

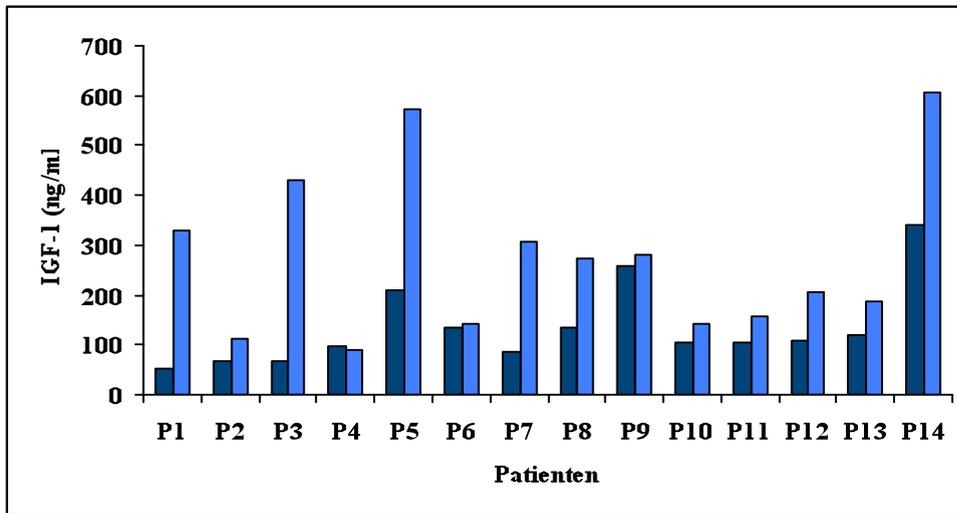


Abbildung 7: IGF-1 Werte der Patienten P1 bis P14

Einen signifikanten Anstieg der IGF-1 Werte zeigen 10 von 14 Patienten. Die Patienten P6, P9 und P10 zeigen nur einen geringen Anstieg der IGF-1 Werte, Patient P4 einen Abfall der IGF-1 Werte.

3.2 Microarray-Daten und hierarchische Clusteranalyse

Nach dem Scannen der Microarrays und der Primärdatenbearbeitung (Gridding) mittels Gene Pix Pro 6.0 wurden die Daten in die ‚Stanford Microarray Data Base‘ eingegeben. Insgesamt wurden 10 Microarrays ausgewertet (Patient P1 bis P7, Duplikate von Patient P1, P3 und P4). Die folgende Abbildung zeigt als Beispiel das Bild eines der hybridisierten Microarrays (Abb. 8a) auf dem etwa 32,000 Gene abgebildet sind. Jeder Punkt symbolisiert ein Gen. Ein grünes Signal symbolisiert ein herunterreguliertes Gen, ein rotes Signal ein hochreguliertes Gen. Die Abbildung 8b zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Microarrays. Ein einzelner Punkt, in diesem Fall das hochregulierte Gen EGR1, wird in der Abbildung 8c dargestellt.

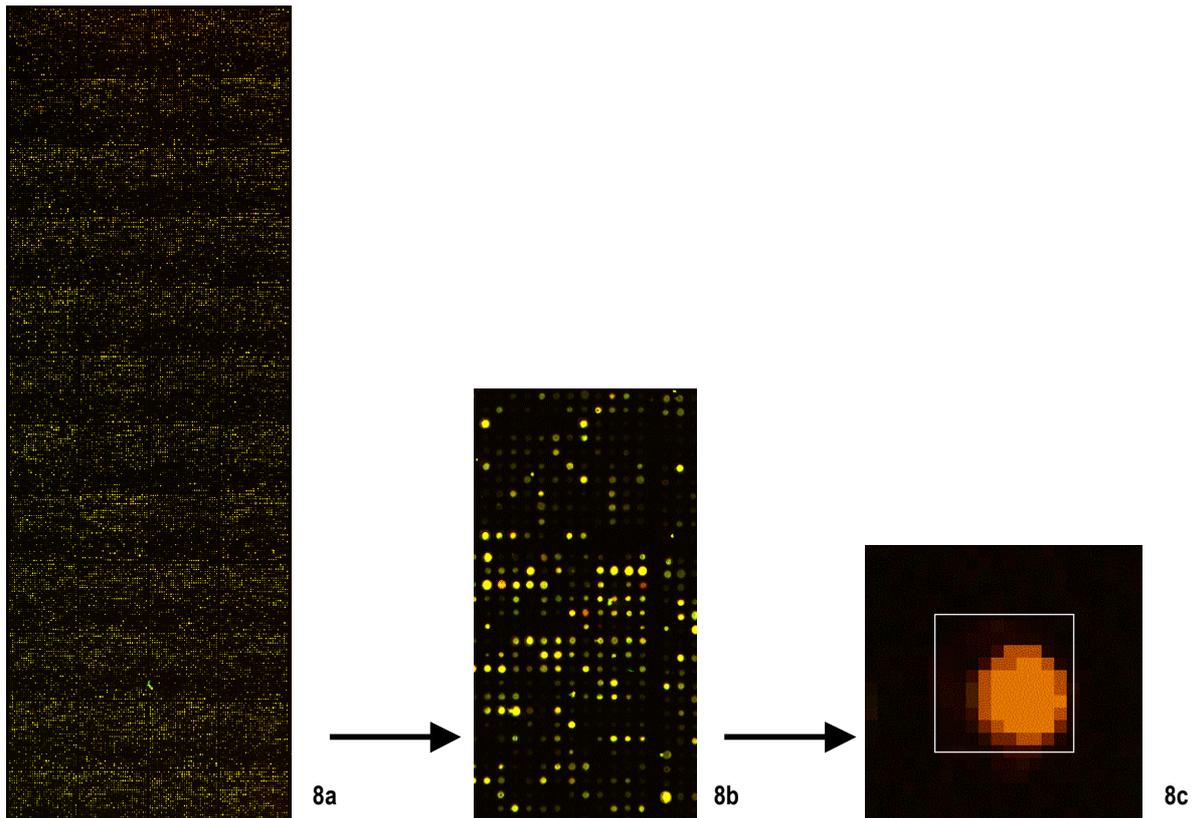


Abbildung 8: 8a. Microarray 8b. Ausschnittvergrößerung 8c. Hochreguliertes EGR1

Alle Gene, die in den 10 ausgewerteten Microarrays mehr als zweifach hoch- oder herunterreguliert worden sind, wurden einer hierarchischen, unsupervidierten Clusteranalyse unterzogen.

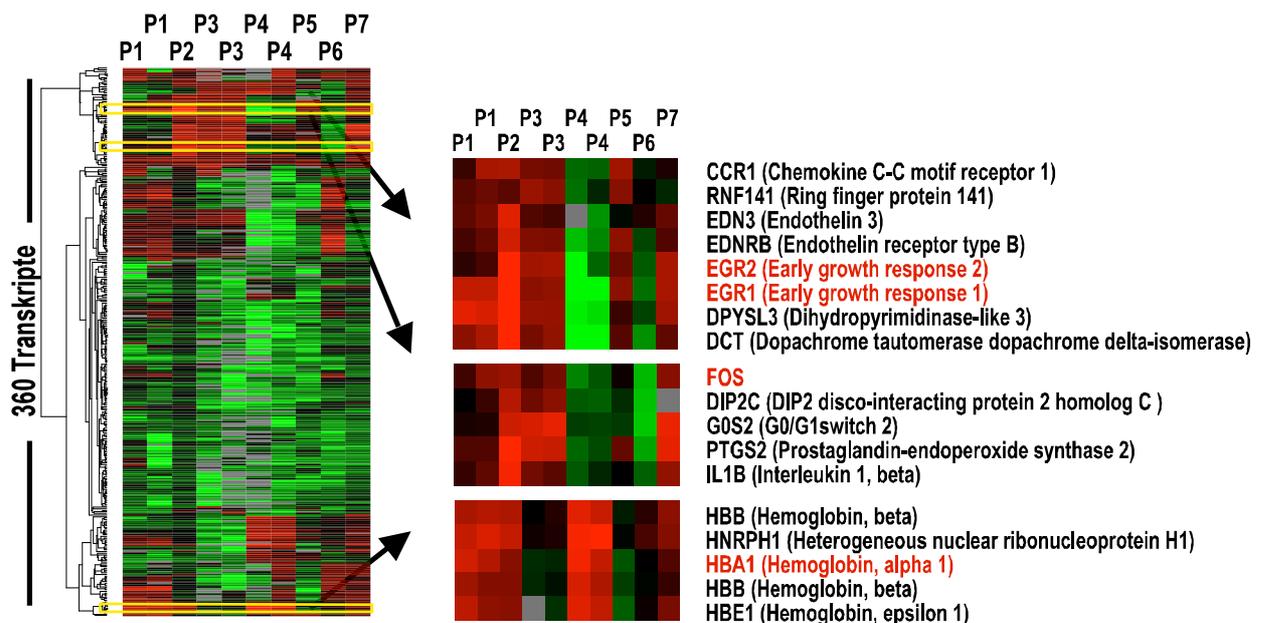


Abbildung 9: Hierarchische Clusteranalyse von 10 cDNA-Microarrays

Die x-Achse der Abbildung 9 zeigt die Patienten (P1 bis P7) und die y-Achse die Gene. Jeder Farbpunkt stellt ein Gen dar. Ein zunehmend grüner Punkt symbolisiert ein zunehmend herunterreguliertes Gen, ein zunehmend roter Punkt ein zunehmend hochreguliertes Gen, ein schwarzer Punkt ein nicht reguliertes Gen. Auf der linken Seite der Abbildung 9 sind alle 360 in dieser Clusteranalyse gefilterten Transkripte aufgeführt. Der in der y-Achse sichtbare Stammbaum spiegelt die Ähnlichkeit der Genexpression bezogen auf die 10 Microarrays wider. Gene mit einem ähnlichen Expressionsmuster clustern eng zusammen. Je weiter die Gene oder Cluster in der Graphik voneinander entfernt sind, desto unterschiedlicher ist die Expression der darin enthaltenen Gene. Die auf der linken Seite der Abbildung 9 gelb markierten Cluster sind vergrößert in der Mitte der Abbildung abgebildet. Auf der rechten Seite der Abbildung 9 sind die Namen der dargestellten Gene aufgelistet, dabei sind die Gene in roter Schrift angezeigt, dessen Microarray-Daten in der Abbildung 10 graphisch dargestellt sind und in einem nächsten Schritt mit Hilfe der RT-PCR validiert wurden.

Die Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse der Microarray-Analyse der Gene EGR1, EGR2, FOS und HBA1. Auf der x-Achse sind die Patienten P1 bis P7 aufgeführt. Bei den Patienten P1, P3 und P4, bei denen jeweils zwei Microarrays angefertigt wurden, wird der zweite Wert aufgeführt. In den einzelnen Diagrammen wird auf der y-Achse die Regulation der EGR1-, EGR2-, FOS- und HBA1-Gene dargestellt. Die Werte zwischen 0 und 1 geben eine Herunterregulation, Werte über 1 eine Hochregulation der Gene an. Der Wert 1 bedeutet, dass das Gen nicht reguliert wurde.

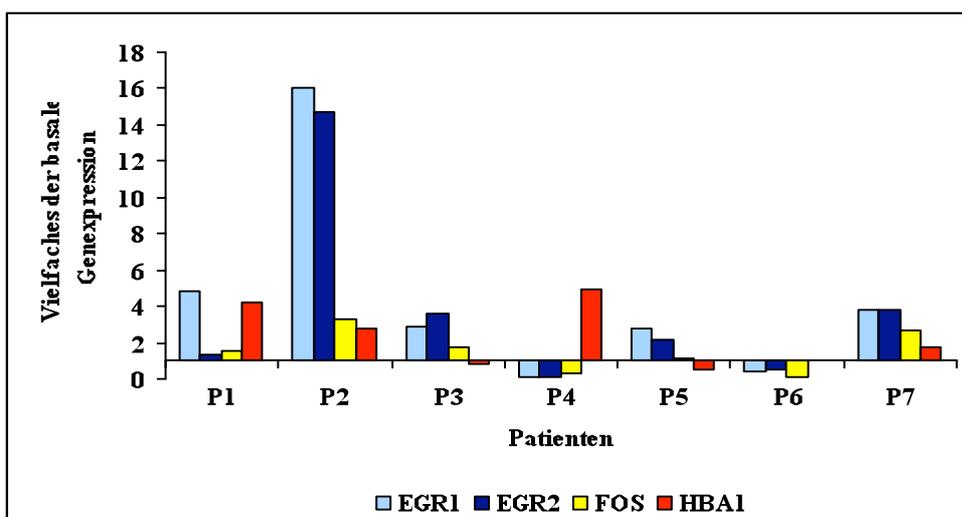


Abbildung 10: Microarray-Analyse der Gene EGR1, EGR2, FOS und HBA1

Die Patienten P1, P2 und P7 zeigen in allen vier Genen eine Hochregulation. Bei den Patienten P3 und P5 werden die Gene EGR1, EGR2 und FOS hochreguliert, das Gen HBA1 herunterreguliert. Die Patienten P4 und P6 zeigen eine Herunterregulation der Gene EGR1, EGR2 und FOS. Das Gen HBA1 wird bei Patient P4 stark hoch- und bei Patient P6 nicht reguliert. Somit ergeben sich für unterschiedliche Patienten verschiedene Profile herauf- und herunterregulierter Gene. Es lässt sich kein für alle Patienten uniformes Muster identifizieren.

3.3 RT-PCR

3.3.1 Agarosegelelektrophorese

Die Größe der mit der RT-PCR amplifizierten DNA-Moleküle wurde mittels Agarosegelelektrophorese bestimmt und mit den zu erwartenden Werten abgeglichen. In der Abbildung 11 ist auf den beiden äußeren Bahnen 1 und 16 ein 100bp (Basenpaare) Standard aufgetragen. Die untersuchten Gene EGR1 (Bahn 2 und 3), EGR2 (Bahn 5 und 6), FOS (Bahn 8 und 9) und HBA1 (Bahn 11 und 12) und das Housekeeping-Gen SDHA (Bahn 14 und 15) sind auf jeweils zwei Bahnen nebeneinander aufgetragen. Zwischen jedem Gen wurde eine Bahn frei gelassen.

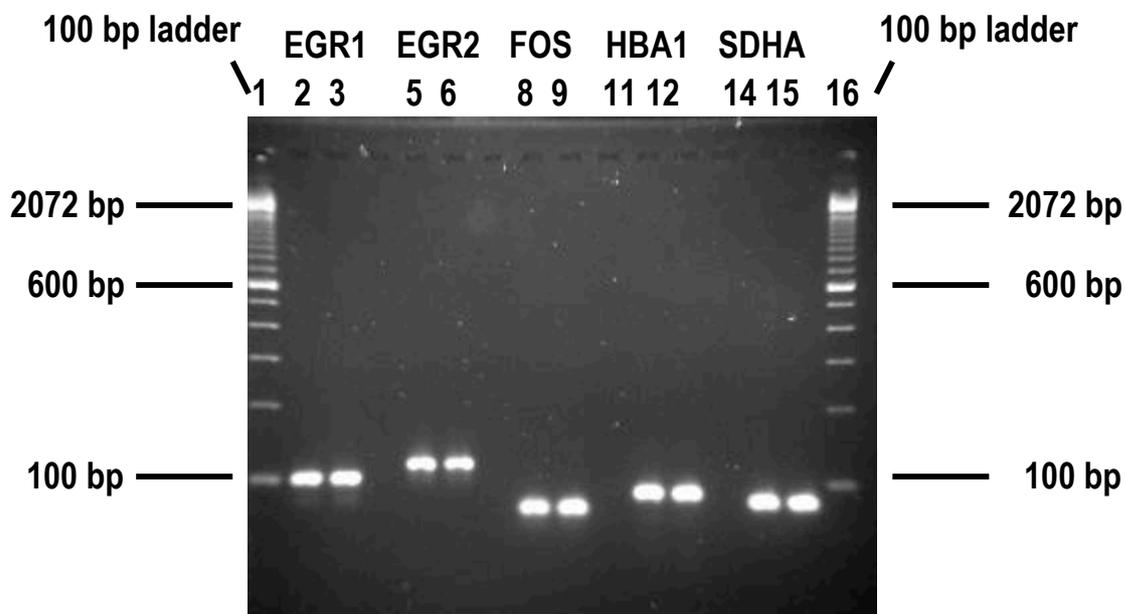


Abbildung 11: Agarosegelelektrophorese von EGR1, EGR2, FOS, HBA1 und SDHA

Auf den beladenen Bahnen sind jeweils zwei parallel liegende Banden zu sehen, die unter UV-Licht ein starkes Signal abgeben. Bei der Abgleichung mit den zu erwartenden Werten für die Länge der einzelnen PCR-Fragmente konnte sichergestellt werden, dass es sich bei den amplifizierten RT-PCR Produkten um die Gene EGR1 mit 103 bp, EGR2 mit 121 bp, FOS mit 72 bp, HBA1 mit 82 bp und SDHA mit 88 bp handelt.

3.3.2 RT-PCR-Daten

Die Daten der in der Abbildung 9 rot markierten Gene wurden mit Hilfe der quantitativen RT-PCR methodisch unabhängig validiert. SDHA diente als Housekeeping-Gen.

Die beiden folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der RT-PCR für die Patienten P1 bis P7 (Abb. 12) und für die Patienten P8 bis P14 (Abb. 13). Auf der y-Achse sind die Genexpressionsdaten (RT-PCR Daten) und auf der x-Achse die Patienten abgebildet.

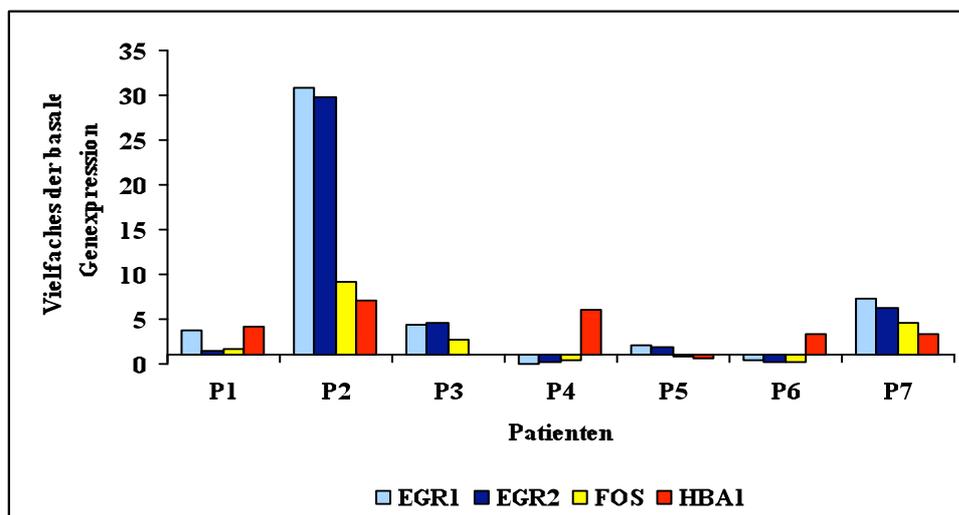


Abbildung 12: RT-PCR Ergebnisse der Patienten P1 bis P7

Die Abbildung 12 zeigt eine Hochregulation der Gene EGR1, EGR2, FOS und HBA1 bei den Patienten P1-P3 und P7. Die Patienten P4 und P6 zeigen eine Herunterregulation der Gene EGR1, EGR2 und FOS und eine Hochregulation des Gens HBA1. Die Gene EGR1 und EGR2 sind bei dem Patienten P5 hochreguliert, während die Gene FOS und HBA1 herunterreguliert sind.

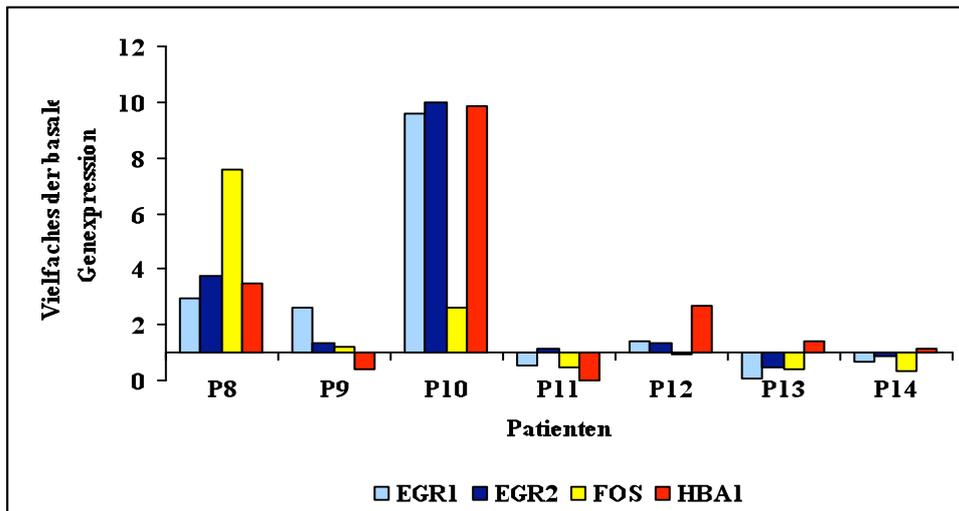


Abbildung 13: RT-PCR Ergebnisse der Patienten P8 bis P14

Die Abbildung 13 zeigt eine Hochregulation aller Gene (EGR1, EGR2, FOS und HBA1) bei den Patienten P8 und P10. Die Gene EGR1, EGR2 und FOS sind beim Patienten P9 hochreguliert, das Gen HBA1 herunterreguliert. Patient P11 zeigt eine Herunterregulation der Gene EGR1, FOS und HBA1 und eine Hochregulation des Gens EGR2. Beim Patienten P12 sind die Gene EGR1, EGR2 und HBA1 hochreguliert, das Gen FOS herunterreguliert. Die Patienten P13 und P14 zeigen eine Herunterregulation der Gene EGR1, EGR2 und FOS und eine Hochregulation des Gens HBA1.

3.3.3 Korrelation der Microarray und RT-PCR Daten

Die Daten der Microarray Analyse und die Daten der RT-PCR sind miteinander korreliert worden. Die Korrelationen der beiden Datensätze sind graphisch in Abbildung 14 dargestellt. Dabei sind die Microarray Daten auf der x-Achse und die RT-PCR Daten auf der y-Achse aufgetragen worden.

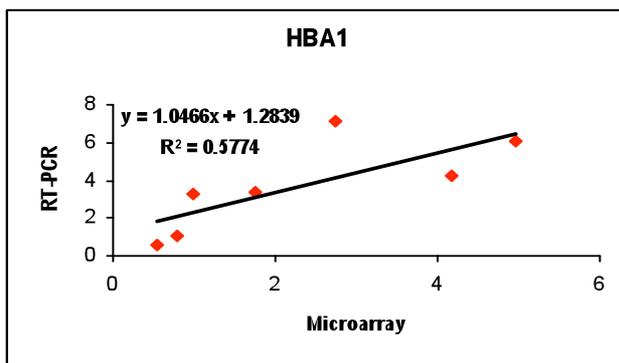
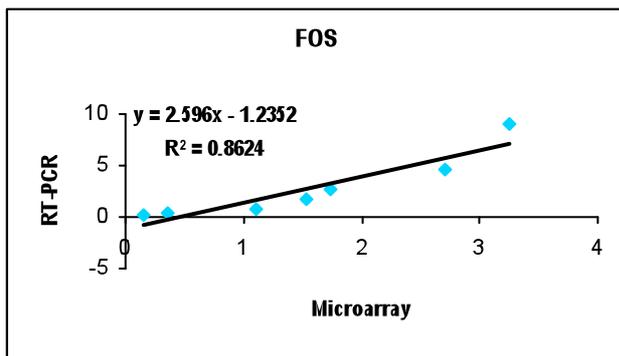
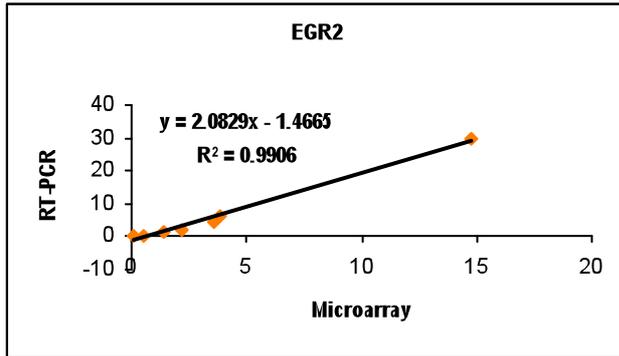
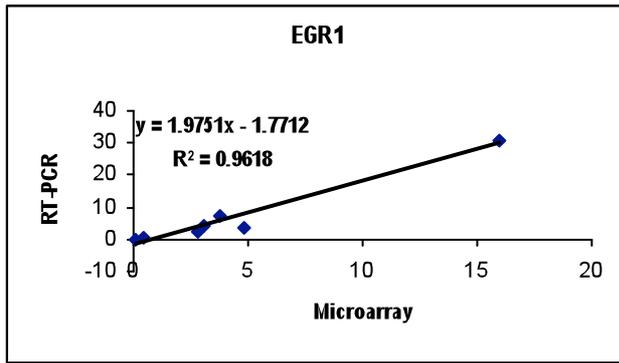


Abbildung 14: Korrelation der Microarray und RT-PCR Daten

Die Ergebnisse in der Abbildung 14 zeigen, dass die Microarray- und RT-PCR- Daten miteinander folgendermaßen korrelieren: EGR1: $R^2= 0,96$; EGR2: $R^2=0,99$; FOS: $R^2=0,86$ und HBA1: $R^2=0,58$. Insofern ließen sich alle selektierten Gene mittels RT-PCR unabhängig validieren.

3.4 Korrelationen

3.4.1 Korrelation der IGF-1 Werte mit auxologischen Daten und RT-PCR-Daten

Das Delta der IGF-1 Konzentrationen zwischen dem stimulierten Wert am Tag 5 und dem Basalwert am Tag 1 und der Quotient der beiden IGF-1 Konzentrationen im IGF-1 Generationstest wurden mit verschiedenen auxologischen Daten korreliert. In der Tabelle 18 werden die Ergebnisse der Korrelationen (Bestimmtheitsmaß R^2) als Zahlenwert aufgeführt. Basis dieser Berechnungen sind die Daten aller 14 Patienten, bei denen sowohl biologische Parameter aufgeführt werden, die ein Kurzzeitansprechen auf die Wachstumshormontherapie (Delta der Unterschenkellängen zwischen Tag 1 und Tag 5) darstellen, als auch biologische Parameter, die über einen längeren Beobachtungszeitraum von 6 bis 12 Monaten erhoben wurden.

Tabelle 18: Korrelation der IGF-1 Änderungen mit auxologischen Daten

	Delta der IGF-1 Konz. (Tag 5 – Tag 1)	IGF-1 Quotient (Tag 5/Tag 1)
Delta der Unterschenkellänge (mm) (Tag 5 – Tag 1)	0,0167	0,0073
Körperhöhen-SDS Quotient (SDS unter Therapie/SDS vor Therapie)	0,006	0,0807
Delta der SDS der Körperhöhen (SDS unter Therapie – SDS vor Therapie)	0,355	0,1281
Wachstumsrate unter Therapie (cm/Jahr)	0,0638	0,006
Wachstumsraten-Quotient (WR unter Therapie/WR vor Therapie)	0,0298	0,2474
Delta der Wachstumsraten (cm/Jahr) (WR unter Therapie – WR vor Therapie)	0,0076	0,0525
Delta der SDS der Wachstumsrate (SDS unter Therapie – SDS vor Therapie)	0,1532	0,0041

Die Ergebnisse in Tabelle 18 zeigen, dass für die Gesamtheit aller 14 Patienten keine Korrelation zwischen den im IGF-1 Generationstest gemessenen Serumparametern und den sieben untersuchten auxologischen Daten besteht.

Die Tabelle 19 führt die Bestimmtheitsmaße (R^2) der IGF-1 Werte mit den RT-PCR Daten (Vielfaches der basalen Genexpression) von EGR1, EGR2, FOS und HBA1 auf.

Tabelle 19: Korrelation der IGF-1 Werte mit RT-PCR Daten

	Vielfaches der basalen Genexpression von:			
	EGR1	EGR2	FOS	HBA1
Delta der IGF-1 Konzentration (Tag 5 – Tag 1)	0,0153	0,0213	6^{-7}	0,1489
IGF-1 Quotient (IGF-1 Tag 5/IGF-1 Tag 1)	3^{-5}	0,0016	0,0103	0,0236

Zwischen den Serumparametern des IGF-1 Generationstests und den Genexpressionsänderungen der Gene EGR1, EGR2, FOS und HBA1 kann für die Grundgesamtheit aller 14 Patienten keine Korrelation festgestellt werden.

3.4.2 Korrelation auxologischer Daten mit RT-PCR Daten

Die RT-PCR Daten (Vielfaches der basalen Genexpression) der Gene EGR1, EGR2, FOS und HBA1 wurden mit verschiedenen biologischen Parametern der Patienten unter Therapie korreliert. Die Bestimmtheitsmaße (R^2) sind in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Korrelation auxologischer Parameter mit RT-PCR Daten

	Vielfaches der basalen Genexpression von:			
	EGR1	EGR2	FOS	HBA1
Delta der Unterschenkelänge (mm) (Tag 5 – Tag 1)	0,3384	0,3474	0,2830	0,0573
Körperhöhen-SDS Quotient (SDS unter Therapie/SDS vor Therapie)	0,0001	0,0039	0,0189	0,0676
Delta der SDS der Körperhöhen (SDS unter Therapie – SDS vor Therapie)	4 ⁻⁶	0,0004	0,0550	0,2204
Wachstumsrate unter Therapie (cm/Jahr)	0,0007	0,0073	0,0044	0,0592
Wachstumsraten-Quotient (WR unter Therapie/WR vor Therapie)	7 ⁻⁵	0,0045	0,0016	0,0499
Delta der Wachstumsraten (cm/Jahr) (WR unter Therapie – WR vor Therapie)	0,0057	8 ⁻⁵	0,0007	0,1364
Delta der SDS der Wachstumsrate (SDS unter Therapie – SDS vor Therapie)	0,0366	0,0272	0,0150	0,3716

Für die 14 Patienten kann keine Korrelation zwischen den Genexpressionsänderungen und den aufgeführten biologischen Daten unter der Wachstumshormontherapie aufgestellt werden. Die Datensätze beinhalten sowohl biologische Parameter des Kurzzeitansprechens auf die Wachstumshormontherapie (Delta der Unterschenkelängen zwischen Tag 1 und Tag 5) als auch biologische Parameter, die einen längeren Beobachtungszeitraum darstellen. Hierzu zählen das Vielfache des Anstiegs des SDS der Körperhöhe (Körperhöhen-SDS Quotient), das Delta des SDS der Körperhöhe, die Wachstumsrate unter Therapie, das Vielfache des Anstiegs der Wachstumsrate (Wachstumsraten-Quotient), das Delta der Wachstumsraten und das Delta der SDS der Wachstumsraten.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird mittels Microarray und RT-PCR untersucht, ob und welche Veränderungen der Genexpression in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) nach Wachstumshormongabe auftreten (Brämswig et al. 2007, Poster). Ziel der Arbeit ist es, nach einer viertägigen Wachstumshormongabe im Rahmen des IGF-1 Generationstests spezifische, auf die Gabe von Wachstumshormon zurückzuführende Änderungen der Genexpression in PBMC nachzuweisen.

Clayton et al. (2007, Poster) untersuchten zeitgleich in der „PREDICT study“ den Einfluss einer einmonatigen Wachstumshormontherapie auf die Genexpression in allen Subpopulationen von Blutzellen („whole blood“). Durch die Isolation von PBMC aus den Blutproben wurde in der vorliegenden Arbeit die möglicherweise zu einer Verfälschung der Ergebnisse führende Genexpression in Retikulozyten, Leukozyten und Lymphozyten eliminiert.

Whatmore et al. (2007, Poster) haben den Einfluss einer Wachstumshormongabe auf die Genexpression der Fibroblasten von Mädchen mit einem Ullrich-Turner-Syndrom (n = 4) in vitro untersucht und mit der Genexpression der Fibroblasten von Kontrollpersonen (n = 2) verglichen. Die basale Genexpression war unterschiedlich, die Wachstumshormongabe führte bei der Kontrollgruppe zu einer ausgeprägteren Genexpressionsänderung als bei den Mädchen mit einem Ullrich-Turner Syndrom.

Im Jahr 2008 haben Whatmore et al. bei 6 Patienten den Einfluss einer dreimonatigen Wachstumshormontherapie auf die Genexpression in PBMC untersucht (Whatmore et al., 2008). In dieser Pilot Studie konnten signifikante Expressionsunterschiede der Gene SOCS1, NR4A2, CREM und RGS1 nur bei den 3 Patienten mit einem Wachstumshormonmangel, nicht aber bei den 3 Mädchen mit einem Ullrich-Turner-Syndrom nachgewiesen werden. Die Gene EGR1, EGR2, FOS und HBA1 wurden nicht identifiziert und nicht weiter untersucht.

4.1 Methodische Aspekte

Wachstumshormonbedingte Veränderungen der Genexpression können nur dargestellt werden, wenn die PBMC einen Wachstumshormonrezeptor und/oder einen IGF-1 Rezeptor exprimieren. Valerio et al. haben zeigen können, dass der Wachstumshormonrezeptor auf den PBMC exprimiert wird (Valerio et al., 1997). In einer anderen Arbeit haben Kooijman et al.

den IGF-1 Rezeptor auf den PBMC nachgewiesen (Kooijman et al., 1992). Veränderungen der Genexpression in PBMC können daher die Folge einer Wachstumshormongabe sein. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte zudem zeigen, dass PBMC in vitro nach Wachstumshormongabe IGF-1 sezernieren (Auernhammer et al., 2002).

Microarray-Methode

Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist die Auswahl der Methoden von großer Bedeutung. Die Microarray Methode ist eine weltweit akzeptierte Methode zur Messung der Genexpression. Die cDNA wird hochspezifisch auf den Arrays gebunden. Die Methode zeichnet sich durch eine hohe Zuverlässigkeit aus (Brown & Botstein, 1999). Dies gilt jedoch nur, wenn ein außerordentlich hohes Maß an Qualitätskontrolle, Validation, Datenbankmanagement und Biomathematik zur Verfügung steht. Diese Voraussetzungen waren im vorliegenden Projekt in Zusammenarbeit mit der Stanford Universität, Kalifornien, USA gegeben.

Die Microarray Methode ist ein geeignetes Screening Verfahren, um die Genexpression einer Vielzahl von Genen gleichzeitig zu messen (Brown & Botstein, 1999; Shalon et al., 1996) und mögliche Targets einer pharmakologischen Behandlung zu identifizieren. Die von uns verwendete Methode erlaubt jedoch keine exakte Quantifikation der Genexpression, da lediglich die relative Änderung der Genexpression zwischen den Zuständen vor und nach Behandlung detektiert wurde. Basale Genexpressionsunterschiede der Patienten, die möglicherweise schon vor der Behandlung mit Wachstumshormon bestehen, können mit dieser Methode nicht erfasst werden. Die Erfassung basaler Unterschiede der Genexpression wäre mit Hilfe von sogenannten Typ II Microarray-Experimenten möglich, bei denen die Genexpression beider Proben im Vergleich zu einer „common reference Probe“ gemessen wird (Dudley et al., 2002). Die Typ II Microarray-Experimente, die von der kinderendokrिनologischen Arbeitsgruppe in Kiel regelmäßig eingesetzt werden, überschreiten jedoch den Fokus der vorliegenden Arbeit, die Genexpressionsänderungen in PBMC und nicht die basalen Unterschiede der Genexpression erfassen will. Die Typ II Microarray Untersuchungen werden derzeit als Folgeprojekt durchgeführt.

Hierarchische Clusteranalyse

Die große Datenmenge der Microarrays wurde zunächst durch eine unsupervidierte hierarchische Clusteranalyse auf eine überschaubare Anzahl relevanter Gene reduziert (Eisen et al., 1998) und graphisch dargestellt (Abb. 9). Durch die Anwendung der hierarchischen Clusteranalyse ist es möglich, Genexpressionsmuster auffindig zu machen und die Bedeutung einzelner Gene zu überprüfen (4.2). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass im

Rahmen einer unsupervidierten hierarchischen Clusteranalyse interessante Gene fälschlich herausgefiltert werden.

RT-PCR

Microarray-Daten können mit einer sensitiveren Methode zur Messung der Genexpression validiert werden. Die RT-PCR ist als Methode mit hoher Sensitivität und Assay-Spezifität anerkannt. Trotz einer hohen Sensitivität und Spezifität kann jedoch auch die SYBR Green RT-PCR bei Anwesenheit von Primer-Dimeren und unspezifischen Amplifikaten falsch positive Signale generieren, da der SYBR Green Farbstoff sich unspezifisch in doppelsträngige DNA einlagert (Arikawa et al., 2008). Zur Erhöhung der Spezifität wurde ein sorgfältiges Primerdesign durchgeführt, eine durch Hitze aktivierte DNA-Polymerase verwendet und nach jedem RT-PCR-Lauf eine Schmelzkurve angefertigt. Die Verwendung von Intron-Exon-übergreifenden Primern schließt eine Amplifikation genomischer DNA aus. Außerdem zeigt die Agarosegelelektrophorese der RT-PCR-Amplifikate starke Einzelbanden, die nach dem Längenstandard mit den gesuchten Genen EGR1, EGR2, FOS und HBA1 übereinstimmt. Diese Maßnahmen, die Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese und die hohe Korrelation der Microarray- und RT-PCR-Daten bestätigen, dass es sich bei den untersuchten Genen um EGR1, EGR2, FOS und HBA1 handelt.

Der Vergleich der Abbildungen 10 und 12 zeigt, dass mit der Microarray-Methode (Abb. 10) und mit der Methode der RT-PCR (Abb. 12) nahezu identische Genexpressionsprofile für die Patienten P1 bis P7 identifiziert werden. Die Genexpressionsprofile der Patienten P3, P5 und P6 unterscheiden sich beim Vergleich der beiden Methoden nur in der Expression eines einzelnen der vier untersuchten Gene. Die hohe Reproduzierbarkeit der Daten (Abb. 10 versus Abb. 12) und die hohe Korrelation der beiden Datensätze (Abb. 14) zeigen, dass die identifizierten Muster der untersuchten Gene EGR1, EGR2, FOS und HBA1 mit hoher Zuverlässigkeit spezifische Genexpressionsantworten auf die Wachstumshormontherapie der einzelnen Individuen darstellen.

Auxologische Daten

Zusätzlich zu den Genexpressionsdaten sind auch auxologische Parameter erhoben worden, um das Wachstum vor und unter Wachstumshormontherapie zu dokumentieren. Einen Anstieg der SDS der Wachstumsrate (WR) zeigen 13 von 14 Patienten. Ausnahme ist der Patient P14 mit einem Abfall der WR-SDS (Abb. 5). Als weiterer auxologischer Parameter ist die Unterschenkellänge erfasst worden. Einen deutlichen Anstieg der Unterschenkellänge zeigen alle Patienten mit Ausnahme von Patient P2 (Abb. 6). Insofern liegt im

Kurzzeitverlauf ein relevantes biologisches Ansprechen fast aller Patienten auf die Therapie vor. Dies bestätigt auch die biologische Relevanz der jeweils gestellten Diagnosen.

Für die Korrelation der auxologischen Parameter mit den Genexpressionsänderungen ist die korrekte Messung der Körperhöhen und der Unterschenkellängen wichtig. Die Körperhöhen und die Unterschenkellängen wurden von geschultem Personal mit demselben Stadiometer bzw. Knemometer erhoben. Die Daten zur Körperhöhe und zur Knemometrie zeichnen sich daher durch eine hohe Zuverlässigkeit und sehr gute Reproduzierbarkeit aus (Hermanussen et al., 1985).

Die Körperhöhen wurde über einen Zeitraum von 6 bis 12 Monaten gemessen, die sich daraus ergebende Wachstumsrate auf ein Jahr (cm/Jahr) hochgerechnet. Auf diesem Wege konnte eine Vergleichbarkeit zwischen den Patienten mit unterschiedlichen Beobachtungszeiträumen hergestellt werden. Dieses Verfahren ist ungenau, wenn kürzere als die oben genannten Zeitintervalle auf ein Jahr hochgerechnet werden.

Serumparameter

Einen signifikanten Anstieg der IGF-1 Werte im IGF-1 Generationstest haben 10 von 14 Patienten. Die Patienten P6, P9 und P10 zeigen nur einen geringen Anstieg und der Patient P4 einen Abfall der IGF-1 Konzentration (Abb. 7).

Für die Interpretation der Ergebnisse ist die Vergleichbarkeit der Serumparameter wichtig. Bei Verwendung unterschiedlicher Messmethoden sind die IGF-1 Werte kaum vergleichbar (Clemmons, 2007). Die korrekte Messung der Serumparameter IGF-1, IGF-BP3 und GH wird in dieser Arbeit dadurch sichergestellt, dass alle Proben im Labor der internen Arbeitsgruppe mit der jeweils gleichen Methode gemessen wurden.

4.2 Funktionen der Gene

Gene, die in der Clusteranalyse eng beieinander liegen und die ein sehr ähnliches Expressionsprofil bezogen auf die Behandlung und die Patienten aufweisen, haben möglicherweise eine ähnliche Funktion (Eisen et al., 1998). Die Clusteranalyse zeigt, dass die Expression der Gene EGR1, EGR2 und FOS in einem sehr ähnlichen Muster verändert wird. Diese drei Gene treten in nah beieinander liegenden Clustern auf. EGR1 und FOS sind beide in für das Längenwachstum entscheidenden Geweben, dem Knochen und Knorpel, nachgewiesen worden. Sie haben im Mausmodell (EGR1) und in menschlichen Röhrenknochen und der Schädelkalotte (FOS) eine Funktion als Transkriptionsfaktoren in Osteoblasten und Osteoklasten (Fang et al., 1995; McMahon et al., 1990; Sandberg et al.,

1988a; Sandberg et al., 1988b). EGR1 und FOS haben damit möglicherweise auch einen Einfluss auf das physiologische Längenwachstum und die Skelett-Entwicklung (Dony & Gruss, 1987; McMahon et al., 1990). Diese Funktionen der Gene EGR1 und FOS sind im Hinblick auf diese Arbeit besonders interessant, da ein Anstieg der Genexpression möglicherweise auf eine Beschleunigung des Längenwachstums und auf ein gutes Ansprechen auf die Wachstumshormontherapie, ein Abfall der Genexpression hingegen auf eine Verlangsamung des Wachstums hindeuten könnte. Die Hochregulation der Gene mit signifikant beschleunigtem Wachstum ($p < 0.001$, t-test) wird bei den Patienten P1-P3, P7-P10, die Herunterregulation der Gene EGR1 und FOS mit verlangsamtem Wachstum bei Patient P14 gesehen. Andererseits zeigen die Patienten P4, P6, P11 und P13 einen Abfall der Genexpression von EGR1 und FOS bei signifikantem Anstieg der Wachstumsrate ($p < 0.01$, t-test). In dieser Untersuchung unterstützen 10 von 14 Patienten die Hypothese, dass über die Regulation der Gene EGR1 und FOS das Längenwachstum beeinflusst wird. Diese ersten Hinweise müssen an einem größeren Patientenkollektiv bestätigt oder verworfen werden.

Das in dieser Arbeit ebenfalls untersuchte Gen HBA1 ist in der Clusteranalyse weit von den Genen EGR1, EGR2 und FOS entfernt und tritt mit den HB-Genen HBB, HBE1 etc. in einem Cluster auf. Chung et al. (2006) haben mit Untersuchungen auf Protein-Ebene („Protein Chip“ Massenspektrometrie) gezeigt, dass nach einer dreiwöchigen Gabe von Wachstumshormon vor allem HBA1 vermehrt gebildet wird. (Chung et al., 2006). Die Untersuchung dieser Autoren zeigt, dass HBA1 nicht nur auf der von uns untersuchten Genebene, sondern auch auf Proteinebene durch die Wachstumshormongabe beeinflusst wird. In dieser Arbeit wird das HBA1 bei 9 von 14 Patienten deutlich hochreguliert. Diese Ergebnisse unterstützen die von Chung et al (2006) auf Proteinebene erhobenen Daten.

4.3 Auswahl der Patienten

Die Unterscheidung zwischen einem Wachstumshormonmangel und einer Normvariante ist schwierig. In diese Studie wurden nach Einwilligung alle Patienten der Endokrinologischen Sprechstunde aufgenommen, die aufgrund einer Wachstumsstörung einen diagnostischen IGF-1 Generationstest durchliefen. Bei den 14 Patienten liegen folgende Diagnosen vor: Neurosekretorische Dysfunktion ($n = 7$), bioinaktives Wachstumshormon ($n = 2$), hypophysärer Wachstumshormonmangel ($n = 1$), Z.n. Craniopharyngeom ($n = 1$), V.a. GH-Resistenz ($n = 1$), Ullrich-Turner Syndrom ($n = 1$), SGA ($n = 1$). Es wurden bewusst Patienten mit unterschiedlichen Wachstumsstörungen in die Studie aufgenommen, um keine

Diagnosengruppen bei der Suche nach einem potentiellen Biomarker für das Ansprechen auf die Wachstumshormontherapie auszuschließen. In der Arbeit von Whatmore et al. (2008) konnte ein signifikanter Anstieg der Genexpression zwar bei 3 Patienten mit einem Wachstumshormonmangel, nicht aber bei 3 Mädchen mit einem Ullrich-Turner Syndrom gezeigt werden (Whatmore et al., 2008). Es kann auf Grund dieser Untersuchung vermutet werden, dass unterschiedliche Wachstumsstörungen unterschiedliche Genexpressionen zeigen. Die hier vorliegende, umfangreichere, eigene Untersuchung weist zudem deutlich darauf hin, dass das Genexpressionsmuster nach Wachstumshormongabe einer erheblichen interindividuellen Variation unterliegt.

Das in dieser Arbeit untersuchte Gen EGR2 in PBMC konnte bei Kindern mit Typ 1 Diabetes mellitus in hoher Expression nachgewiesen werden (Kaizer et al., 2007). Diese hohe Expression war nicht nur bei Diagnose des Diabetes mellitus, sondern auch 4 Monate nach Therapiebeginn nachweisbar. Andere Gene wie zum Beispiel das EGR3 Gen zeigten eine hohe Expression bei Diagnose und eine Normalisierung der Genexpression nach Einstellung des Diabetes mellitus. Die Bedeutung von anderen Nebendiagnosen und Faktoren wie zum Beispiel die Glucosekonzentration für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann momentan nicht eingeschätzt werden.

Nach Wachstumshormongabe sind die Genexpressionsänderungen bei den Patienten unterschiedlich. 6 von 14 Patienten (P1-P3, P7, P8, P10) zeigen eine Hochregulation der Gene EGR1, EGR2, FOS und HBA1. Vier Patienten (P4, P6, P13, P14) reagieren mit einer Herunterregulation von EGR1, EGR2 und FOS und einer Hochregulation von HBA1. Die übrigen vier Patienten (P5, P9, P11, P12) zeigen davon abweichende Genexpressionsprofile. Bei den sieben Patienten mit der Diagnose der neurosekretorischen Dysfunktion (P4, P6-P8, P10, P12, P13) kann auch kein uniformes Responseprofil beobachtet werden. Sie zeigen variierende Expressionsprofile, die auf Grund individuell unterschiedlicher Regulationsphänomene entstehen können. Die Bedeutung dieser Expressionsprofile für das Längenwachstum muss weiter abgeklärt werden.

4.4 Korrelationen der Datensätze

Bei den 14 Patienten dieser Studie korrelieren die Ergebnisse des IGF-1 Generationstests und die Genexpressionsänderungen nicht mit dem biologischen Ansprechen auf die Therapie (Tabellen 18 und 20).

Die fehlende Korrelation der IGF-1 Werte mit dem biologischen Ansprechen auf die Wachstumshormontherapie zeigt, dass es schwer ist, einen einzelnen, universell gültigen Prädiktor für das Therapieansprechen zu finden. Dagegen könnten Genexpressionsänderungen mehrerer Gene (Genexpressionsprofile) in Zukunft von Bedeutung sein. Die bisherige Einteilung der Patienten in unterschiedliche Diagnosegruppen kann möglicherweise durch Genexpressionsprofile erweitert und besser strukturiert werden. Patienten mit Wachstumsstörungen können mit einem spezifischen Genexpressionsprofil eventuell besser kategorisiert werden, so dass auf diesem Weg eine sicherere Aussage über den Wachstumsverlauf gemacht werden kann.

Die jetzt vorliegenden Ergebnisse müssen durch Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv ergänzt werden. Dazu wird es notwendig sein, Wachstumsverläufe über mehrere Jahre und die Erwachsenengröße der mit Wachstumshormon behandelten Patienten zu dokumentieren. Mit diesen Ergebnissen wird man möglicherweise einen Hinweis erhalten, ob spezifische Genexpressionsmuster für einen bestimmten Wachstumsverlauf charakteristisch sind.

5. Zusammenfassung

Der Erfolg einer Therapie mit Wachstumshormon ist schwer vorherzusagen. Dies gilt sowohl für den einzelnen Patienten als auch für die Gesamtheit der Patienten mit Wachstumsstörungen unterschiedlicher Genese. Ziel dieser Studie ist es, den Effekt von Wachstumshormon auf die Genexpression in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) zu untersuchen, potentielle Biomarker der Wachstumshormonwirkung ausfindig zu machen und zu klären, ob es eine Assoziation zwischen dem biologischen Ansprechen auf die Wachstumshormontherapie und den Genexpressionsänderungen gibt.

Im Rahmen eines diagnostischen, routinemäßigen IGF-1 Generationstests wurde von vierzehn Patienten vor und nach viertägiger Gabe des Wachstumshormons Vollblut zur Isolierung von PBMC gewonnen, RNA extrahiert und auf Genexpressionsunterschiede auf Transkriptionsebene untersucht. Die Genexpression wurde mit Hilfe der Microarray-Methode dargestellt, die Microarray Daten mit Hilfe der hierarchischen Clusteranalyse analysiert, graphisch veranschaulicht und mittels Real Time-PCR (RT-PCR) validiert.

Die Microarray-Daten zeigen ein auffälliges Expressionsmuster der Gene EGR1 (early growth response 1), EGR2 (early growth response 2), FOS und HBA1 (Hämoglobin Alpha 1). Die Gene EGR1 und FOS kodieren Transkriptionsfaktoren, die im Knochen und Knorpel nachgewiesen werden, interessanterweise an der Skelettentwicklung beteiligt sind und das normale Längenwachstum beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Wachstumshormongabe zu messbaren Genexpressionsänderungen in PBMC führt. Die Untersuchungen legen nahe, dass eine Regulation der Genexpression von EGR1 und FOS das Längenwachstum beeinflussen könnte. In einem vorläufigen Beobachtungszeitraum von 6 bis 12 Monaten besteht jedoch keine statistisch signifikante Korrelation der potentiellen neuen Biomarker mit dem biologischen Ansprechen auf die Wachstumshormontherapie in der Grundgesamtheit aller untersuchten Patienten. Vielmehr weisen Clusteranalyse und RT-PCR auf die Existenz interindividuell unterschiedlicher, aber gut reproduzierbarer Responseprofile hin. Eine Langzeitbeobachtung des weiteren Wachstums einschließlich einer Dokumentation der Erwachsenengröße ist notwendig und geplant, um die Ergebnisse der vorliegenden Responseprofile im Hinblick auf ihre biologische Relevanz und ihren möglichen prädiktiven Wert erneut zu evaluieren.

6. Literaturverzeichnis

- Arikawa, E., Sun, Y., Wang, J., Zhou, Q., Ning, B., Dial, S.L., Guo, L. & Yang, J. (2008). Cross-platform comparison of SYBR Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. *BMC Genomics*, **9**, 328.
- Auernhammer, C.J., Fottner, C., Engelhardt, D., Bidlingmaier, M., Strasburger, C.J. & Weber, M.M. (2002). Differential regulation of insulin-like growth factor-(IGF) I and IGF-binding protein (IGFBP) secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *Horm Res*, **57**, 15-21.
- Barker, P.E., Rabin, M., Watson, M., Breg, W.R., Ruddle, F.H. & Verma, I.M. (1984). Human c-fos oncogene mapped within chromosomal region 14q21----q31. *Proc Natl Acad Sci USA*, **81**, 5826-30.
- Batliwalla, F.M., Baechler, E.C., Xiao, X., Li, W., Balasubramanian, S., Khalili, H., Damle, A., Ortmann, W.A., Perrone, A., Kantor, A.B., Gulko, P.S., Kern, M., Furie, R., Behrens, T.W. & Gregersen, P.K. (2005). Peripheral blood gene expression profiling in rheumatoid arthritis. *Genes Immun*, **6**, 388-97.
- Bebermeier, J.H., Brooks, J.D., DePrimo, S.E., Werner, R., Deppe, U., Demeter, J., Hiort, O. & Holterhus, P.M. (2006). Cell-line and tissue-specific signatures of androgen receptor-coregulator transcription. *J Mol Med*, **84**, 919-31.
- Bierich, J.R., Brugmann, G. & Kiessling, E. (1989). [Spontaneous secretion of growth hormone in deep nocturnal sleep. II. Studies on hypophyseal dwarfism and constitutional developmental delay]. *Monatsschr Kinderheilkd*, **137**, 80-5.
- Bierich, J.R., Brugmann, G. & Schippert, R. (1985). [Spontaneous secretion of growth hormone in deep nocturnal sleep. I. Measurement, calculation and normal values in childhood]. *Monatsschr Kinderheilkd*, **133**, 342-6.

- Blum, W.F., Machinis, K., Shavrikova, E.P., Keller, A., Stobbe, H., Pfaeffle, R.W. & 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*, **91**, 4171-4.
- Brandt, I. & Reinken, L. (1988). [The growth rate of healthy children in the first 16 years: Bonn-Dortmund longitudinal developmental study]. *Klin Padiatr*, **200**, 451-6.
- Breuning, M.H., Madan, K., Verjaal, M., Wijnen, J.T., Meera Khan, P. & Pearson, P.L. (1987). Human alpha-globin maps to pter-p13.3 in chromosome 16 distal to PGP. *Hum Genet*, **76**, 287-9.
- Brown, P. (1988). Human growth hormone therapy and Creutzfeldt-Jakob disease: a drama in three acts. *Pediatrics*, **81**, 85-92.
- Brown, P.O. & Botstein, D. (1999). Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet*, **21**, 33-7.
- Burczynski, M.E. & Dorner, A.J. (2006). Transcriptional profiling of peripheral blood cells in clinical pharmacogenomic studies. *Pharmacogenomics*, **7**, 187-202.
- Burns, E.C., Tanner, J.M., Preece, M.A. & Cameron, N. (1981). Growth hormone treatment in children with craniopharyngioma: final growth status. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **14**, 587-95.
- Cario, G., Stanulla, M., Fine, B.M., Teuffel, O., Neuhoff, N.V., Schrauder, A., Flohr, T., Schafer, B.W., Bartram, C.R., Welte, K., Schlegelberger, B. & Schrappe, M. (2005). Distinct gene expression profiles determine molecular treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **105**, 821-6.
- Chavrier, P., Janssen-Timmen, U., Mattei, M.G., Zerial, M., Bravo, R. & Charnay, P. (1989). Structure, chromosome location, and expression of the mouse zinc finger gene Krox-20: multiple gene products and coregulation with the proto-oncogene c-fos. *Mol Cell Biol*, **9**, 787-97.

- Chavrier, P., Zerial, M., Lemaire, P., Almendral, J., Bravo, R. & Charnay, P. (1988). A gene encoding a protein with zinc fingers is activated during G0/G1 transition in cultured cells. *Embo J*, **7**, 29-35.
- Chung, L., Clifford, D., Buckley, M. & Baxter, R.C. (2006). Novel biomarkers of human growth hormone action from serum proteomic profiling using protein chip mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab*, **91**, 671-7.
- Clemmons, D.R. (2007). IGF-I assays: current assay methodologies and their limitations. *Pituitary*, **10**, 121-8.
- Cotterill, A.M., Camacho-Hubner, C., Duquesnoy, P. & Savage, M.O. (1998). Changes in serum IGF-I and IGFBP-3 concentrations during the IGF-I generation test performed prospectively in children with short stature. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **48**, 719-24.
- Dattani, M. & Preece, M. (2004). Growth hormone deficiency and related disorders: insights into causation, diagnosis, and treatment. *Lancet*, **363**, 1977-87.
- Dony, C. & Gruss, P. (1987). Proto-oncogene c-fos expression in growth regions of fetal bone and mesodermal web tissue. *Nature*, **328**, 711-4.
- 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**, 720-4.
- Dudley, A.M., Aach, J., Steffen, M.A. & Church, G.M. (2002). Measuring absolute expression with microarrays with a calibrated reference sample and an extended signal intensity range. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7554-9.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. & Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14863-8.
- Fang, M.A., Noguchi, G.M. & McDougall, S. (1995). Epidermal growth factor induces Egr-1 messenger RNA and protein in mouse osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int*, **57**, 450-5.

Frasier, S.D. (1983). Human pituitary growth hormone (hGH) therapy in growth hormone deficiency. *Endocr Rev*, **4**, 155-70.

Frasier, S.D. (1997). The not-so-good old days: working with pituitary growth hormone in North America, 1956 to 1985. *J Pediatr*, **131**, S1-4.

Gobert, G.N., McInnes, R., Moertel, L., Nelson, C., Jones, M.K., Hu, W. & McManus, D.P. (2006). Transcriptomics tool for the human *Schistosoma* blood flukes using microarray gene expression profiling. *Exp Parasitol*, **114**, 160-72.

Goldenberg, N. & Barkan, A. (2007). Factors regulating growth hormone secretion in humans. *Endocrinol Metab Clin North Am*, **36**, 37-55.

Gollub, J., Ball, C.A., Binkley, G., Demeter, J., Finkelstein, D.B., Hebert, J.M., Hernandez-Boussard, T., Jin, H., Kaloper, M., Matese, J.C., Schroeder, M., Brown, P.O., Botstein, D. & Sherlock, G. (2003). The Stanford Microarray Database: data access and quality assessment tools. *Nucleic Acids Res*, **31**, 94-6.

Hermanussen, M., Sippell, W.G. & Valk, I.M. (1985). Knemometric monitoring of early effects of human growth hormone on leg length in children with growth hormone deficiency. *Lancet*, **1**, 1069-71.

Hindmarsh, P.C. & Dattani, M.T. (2006). Use of growth hormone in children. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, **2**, 260-8.

Kaizer, E.C., Glaser, C.L., Chaussabel, D., Banchereau, J., Pascual, V. & White, P.C. (2007). Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from children with diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, **92**, 3705-11.

Kooijman, R., Willems, M., De Haas, C.J., Rijkers, G.T., Schuurmans, A.L., Van Buul-Offers, S.C., Heijnen, C.J. & Zegers, B.J. (1992). Expression of type I insulin-like growth factor receptors on human peripheral blood mononuclear cells. *Endocrinology*, **131**, 2244-50.

Lopez-Bermejo, A., Buckway, C.K. & Rosenfeld, R.G. (2000). Genetic defects of the growth hormone-insulin-like growth factor axis. *Trends Endocrinol Metab*, **11**, 39-49.

Maghnie, M., Strigazzi, C., Tinelli, C., Autelli, M., Cisternino, M., Loche, S. & Severi, F. (1999). Growth hormone (GH) deficiency (GHD) of childhood onset: reassessment of GH status and evaluation of the predictive criteria for permanent GHD in young adults. *J Clin Endocrinol Metab*, **84**, 1324-8.

McMahon, A.P., Champion, J.E., McMahon, J.A. & Sukhatme, V.P. (1990). Developmental expression of the putative transcription factor Egr-1 suggests that Egr-1 and c-fos are coregulated in some tissues. *Development*, **108**, 281-7.

Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-50.

Ouellette, A.J., Malt, R.A., Sukhatme, V.P. & Bonventre, J.V. (1990). Expression of two "immediate early" genes, Egr-1 and c-fos, in response to renal ischemia and during compensatory renal hypertrophy in mice. *J Clin Invest*, **85**, 766-71.

Powell-Jackson, J., Weller, R.O., Kennedy, P., Preece, M.A., Whitcombe, E.M. & Newsom-Davis, J. (1985). Creutzfeldt-Jakob disease after administration of human growth hormone. *Lancet*, **2**, 244-6.

Prader, A., Zachmann, M., Poley, J.R., Illig, R. & Szeky, J. (1967). Long-term treatment with human growth hormone (Raben) in small doses. Evaluation of 18 hypopituitary patients. *Helv Paediatr Acta*, **22**, 423-40.

Quigley, C.A. (2007). Growth hormone treatment of non-growth hormone-deficient growth disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am*, **36**, 131-86.

Raben, M.S. (1958). Treatment of a pituitary dwarf with human growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, **18**, 901-3.

Ranke, M.B., Lindberg, A., Chatelain, P., Wilton, P., Cutfield, W., Albertsson-Wikland, K. & Price, D.A. (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*, **84**, 1174-83.

Ranke, M.B., Lindberg, A., Chatelain, P., Wilton, P., Cutfield, W., Albertsson-Wikland, K. & Price, D.A. (2000). Prediction of long-term response to recombinant human growth hormone in Turner syndrome: development and validation of mathematical models. KIGS International Board. Kabi International Growth Study. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 4212-8.

Rauch, F., Georg, M., Stabrey, A., Neu, C., Blum, W.F., Remer, T., Manz, F. & Schoenau, E. (2002). Collagen markers deoxypyridinoline and hydroxylysine glycosides: pediatric reference data and use for growth prediction in growth hormone-deficient children. *Clin Chem*, **48**, 315-22.

Reinken, L., Stolley, H., Droese, W. & van Oost, G. (1980). [Longitudinal data of physical growth of healthy children. II. Height, weight, skinfold thickness of children aged 1.5--16 years (author's transl)]. *Klin Padiatr*, **192**, 25-33.

Reinken, L. & van Oost, G. (1992). [Longitudinal physical development of healthy children 0 to 18 years of age. Body length/height, body weight and growth velocity]. *Klin Padiatr*, **204**, 129-33.

Rudman, D., Kutner, M.H., Blackston, R.D., Cushman, R.A., Bain, R.P. & Patterson, J.H. (1981). Children with normal-variant short stature: treatment with human growth hormone for six months. *N Engl J Med*, **305**, 123-31.

Sandberg, D.E. & Voss, L.D. (2002). The psychosocial consequences of short stature: a review of the evidence. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **16**, 449-63.

Sandberg, M., Autio-Harmainen, H. & Vuorio, E. (1988a). Localization of the expression of types I, III, and IV collagen, TGF-beta 1 and c-fos genes in developing human calvarial bones. *Dev Biol*, **130**, 324-34.

Sandberg, M., Vuorio, T., Hirvonen, H., Alitalo, K. & Vuorio, E. (1988b). Enhanced expression of TGF-beta and c-fos mRNAs in the growth plates of developing human long bones. *Development*, **102**, 461-70.

Schwarze, C.P., Wollmann, H.A., Binder, G. & Ranke, M.B. (1999). Short-term increments of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 predict the growth response to growth hormone (GH) therapy in GH-sensitive children. *Acta Paediatr Suppl*, **88**, 200-8.

Shalon, D., Smith, S.J. & Brown, P.O. (1996). A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res*, **6**, 639-45.

Sharp, F.R., Xu, H., Lit, L., Walker, W., Apperson, M., Gilbert, D.L., Glauser, T.A., Wong, B., Hershey, A., Liu, D.Z., Pinter, J., Zhan, X., Liu, X. & Ran, R. (2006). The future of genomic profiling of neurological diseases using blood. *Arch Neurol*, **63**, 1529-36.

Smith, V., Chou, K.N., Lashkari, D., Botstein, D. & Brown, P.O. (1996). Functional analysis of the genes of yeast chromosome V by genetic footprinting. *Science*, **274**, 2069-74.

Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J.C., Brown, P.O., Botstein, D., Eystein Lonning, P. & Borresen-Dale, A.L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 10869-74.

Spiliotis, B.E., August, G.P., Hung, W., Sonis, W., Mendelson, W. & Bercu, B.B. (1984). Growth hormone neurosecretory dysfunction. A treatable cause of short stature. *Jama*, **251**, 2223-30.

Sukhatme, V.P. (1990). Early transcriptional events in cell growth: the Egr family. *J Am Soc Nephrol*, **1**, 859-66.

Tang, Y., Lu, A., Ran, R., Aronow, B.J., Schorry, E.K., Hopkin, R.J., Gilbert, D.L., Glauser, T.A., Hershey, A.D., Richtand, N.W., Privitera, M., Dalvi, A., Sahay, A., Szaflarski, J.P., Ficker, D.M., Ratner, N. & Sharp, F.R. (2004). Human blood genomics: distinct profiles for gender, age and neurofibromatosis type 1. *Brain Res Mol Brain Res*, **132**, 155-67.

Tsai-Morris, C.H., Cao, X.M. & Sukhatme, V.P. (1988). 5' flanking sequence and genomic structure of Egr-1, a murine mitogen inducible zinc finger encoding gene. *Nucleic Acids Res*, **16**, 8835-46.

Valerio, G., Bond, H.M., Badolato, R., Petrella, A., Di Maio, S., Salerno, M., Waters, M.J., Venuta, S. & Tenore, A. (1997). Expression of growth hormone receptor by peripheral blood lymphocytes in children: evaluation in clinical conditions of impaired growth. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **47**, 329-35.

Van Pareren, Y.K., De Muinck Keizer-Schrama, S.M., Stijnen, T., Sas, T.C. & Drop, S.L. (2002). Effect of discontinuation of long-term growth hormone treatment on carbohydrate metabolism and risk factors for cardiovascular disease in girls with Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 5442-8.

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, J., McKusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J., Roberts, R.J., 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, A.E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T.J., Higgins, M.E., Ji, R.R., Ke, Z., Ketchum, K.A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G.V., Milshina, N., Moore, H.M., Naik, A.K., Narayan, V.A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D.B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, **291**, 1304-51.

Whatmore, A.J., Patel, L. & Clayton, P.E. (2008). A pilot study to evaluate Gene Expression profiles in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from children with Growth hormone (GH) deficiency and Turner syndrome in response to GH treatment. *Clin Endocrinol (Oxf)*.

Young, A.N., Master, V.A., Paner, G.P., Wang, M.D. & Amin, M.B. (2008). Renal epithelial neoplasms: diagnostic applications of gene expression profiling. *Adv Anat Pathol*, **15**, 28-38.

Zitierte Poster und Bücher:

Brämwig, N., Appari, M., Baus, I., Welzel, M., Sippell, W.G., Riepe, F. & Holterhus, P.M. (2007). Genome-wide analysis of GH responsive genes in PBMC is a potential technique to characterize future biomarkers for growth prediction. *Horm Res* **68**(S1): 158 (Poster und Abstract, P02-506).

Clayton, P., Tato, L., Chatelain, P., Olivier, C., Saunders, H., & Lamarine M. (2007). Gene expression profiling in prepubertal growth hormone deficient (GHD) children and Turner syndrome (TS) girls with high versus low IGF-1 responses after one month of GH therapy: the PREDICT study. *Horm Res* **68**(S1): 100 (Poster und Abstract, P01-325).

Jurk, M. (1998): Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren. Lottspeich, F. & Zorbas H. (Hrsg.). Bioanalytik (S. 589). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

Whatmore, A.J., Tajbakhsh, S., Zeef, L. & Clayton, P.E. (2007). Differential basal gene expression and response to GH treatment in fibroblast cells from girls with Turner syndrome compared to normal children. *Horm Res* **68**(S1): 39 (FC11-129).

7. Danksagung

Diese Arbeit entstand an der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel (Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Schrappe). Für das Gelingen dieser Arbeit möchte ich mich bei folgenden Personen bedanken:

Univ.-Prof. Dr. Paul Martin Holterhus, danke für die experimentelle und wissenschaftlich interessante Doktorarbeit, die erstklassige Betreuung und das Engagement, mir wissenschaftliche Perspektiven aufzuzeigen.

Mahesh Appari, I thank you for all your help.

Arbeitsgruppe Endokrinologie der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Kiel:

Frau Hohmann, Frau Dahm, Frau Karwelies und Frau Övermöhle für die Unterstützung im Labor,
 allen Mitarbeiterinnen des endokrinologischen Labors für die Messungen der Serumparameter,
 allen Ärzten der endokrinologische Sprechstunde für die Rekrutierung von Patienten und Schwester Katrin Masuch für die freundliche Hilfe bei der Aktensuche.

Arbeitsgruppe Onkologie der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Kiel:

Dr. Gunnar Cario für die Hilfe,
 Christian Bretscher für seine Hilfe, seine Erklärungen und seine unermüdliche, immer positive Unterstützung.

Frau Busekow im Knemometrielabor für die Erhebung der Knemometriedaten und die freundliche Hilfe.

Novo Nordisk für das Interesse und die finanzielle Unterstützung des Projekts und die Finanzierung der Teilnahme an der ESPE 2007 in Helsinki, Finnland.

Daniel, danke.

Meiner Familie, danke für alles an meine Geschwister, Kira und Aric, und besonders an meine Eltern Caroline und Jürgen Brämwig. Thank you.

8. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name:	Nuria C. Brämswig	
Geburtsdatum und –ort:	12.05.1983 in Münster, Nordrhein-Westfalen	
Familienstand:	ledig	
Staatsangehörigkeit:	Deutsch	
Eltern:	Professor Dr. med. Jürgen Brämswig Caroline Brämswig	
Geschwister:	Kira Brämswig	Ärztin
	Aric Brämswig	Student

Schulbildung

1989-1993	Marienschule, Münster (Grundschule)
1993-2002	Schillergymnasium, Münster, humanistischer Zweig
9/1997	Kingswood School Bath, England
8/1999-1/2000	Leicester High School, Leicester, Massachusetts, USA
4/2000	Gan Nahum Gymnasium, Rishon le Zion, Israel
15.6.2002	Abitur

Hochschulbildung

- Oktober 2002 bis November 2008 Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität Kiel
 - 18. August 2004 Ärztliche Vorprüfung
 - Juni 2006 bis Januar 2009 Dissertation in der Pädiatrie unter der Leitung von Herrn Univ.-Professor Dr. Paul Martin Holterhus, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel.
 - 6. November 2008 Ärztliche Prüfung

Fort- und Weiterbildung

- Teilnahme am STEPS-AWARD Basis Fortbildungskurs “Poster Presentations and Scientific Publications” am 22./23. Juni 2007 in Unterschleißheim bei München
- Teilnahme am STEPS-AWARD Aufbautrainingskurs “Poster Presentations and Scientific Publications” am 07./08. September 2007 in Unterschleißheim bei München

Kongressteilnahme

- 2007 ESPE (European Society for Paediatric Endocrinology) in Helsinki, Finnland vom 27.-30. Juli 2007
Posterpräsentation mit dem Titel „Genome-wide analysis of GH responsive genes in PBMC is a potential technique to characterize future biomarkers for growth prediction“, Nominierung für den President’s Poster Award 2007

Stipendien

- 2007 Stipendium des Dekanats der Universität Kiel zur Förderung eines PJ-Aufenthalts im Ausland

Medizinische Interessensgebiete

- 1999 Betriebspraktikum vom 25. Januar 1999 bis zum 5. Februar 1999 im Hämatologisch/Onkologischen Labor der Universitäts-Kinderklinik Münster, Leiter Professor Dr. H. Jürgens
- 2000-2001 Praktikum im Hämatologisch/Onkologischen Labor der Universitäts-Kinderklinik Münster vom August 2000 bis Februar 2001, Leiter Professor Dr. H. Jürgens
- 2001 Teilnahme am Landeswettbewerb „Jugend forscht“. 3. Preis in der Wertung Biologie, Sonderpreis der FNJ e.V. (Fördergemeinschaft für Naturwissenschaftliche Jugendarbeit e.V.) für die Teilnahme am „London International Youth Science Forum
- 2001 Praktikum auf der Onkologischen Station der Universitäts-Kinderklinik Münster vom 9. April 2001 bis zum 20. April 2001, Leiter Professor Dr. H. Jürgens
- Teilnahme am „London International Youth Science Forum“ vom 25. Juli 2001 bis zum 8. August 2001
- 2002 Praktikum im Labor des „Department of Genetics“ an der University of Pennsylvania in Philadelphia, Pennsylvania, USA vom 6. Juni 2002 bis zum 5. September 2002. Leiter Dr. Klaus H. Kaestner.
- 2003 Praktikum auf der Onkologischen Station der Pädiatrie im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel vom 28. Juli 2003 bis zum 17. August 2003, Leiter Professor Dr. M. Schrappe
- Praktikum auf der Schulkinderstation der Universitäts-Kinderklinik Münster vom 18. August 2003 bis zum 14. September 2003, Leiter Professor Dr. Harms
- 2004 Praktikum im Bereich der Notfallmedizin im Allgemeinen Krankenhaus der Stadt Wien, Österreich vom 1. März 2004 bis zum 14. März 2004, Leiter Professor Dr. A. Laggner

Famulaturen und Praktisches Jahr

- 2005 Herz-Thoraxchirurgie im Allgemeinen Krankenhaus der Stadt Wien, Österreich vom 21. Februar 2005 bis zum 1. April 2005, Leiter Professor Dr. E. Wolner
- Innere Medizin (Sektion für Stammzell- und Immuntherapie) im Mildred-Scheel-Haus des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel vom 18. Juli 2005 bis zum 31. Juli 2005, Leiter Professor Dr. M. Gramatzki
- Dermatologie im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel vom 16. September 2005 bis zum 2. Oktober 2005, Leiter Professor Dr. T. Schwarz
- Ambulanz der I. Medizinischen Klinik (Innere Medizin) des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel vom 3. Oktober 2005 bis zum 16. Oktober 2005, Leiter Professor Dr. U. R. Fölsch
- 2006 Augenheilkunde in der Augenklinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel vom 7. September 2006 bis zum 24. September 2006, Leiter Professor Dr. J. Roider
- Pädiatrie in der Poliklinik der Universitäts-Kinderklinik in Kiel vom 28. September 2006 bis zum 15. Oktober 2006, Leiter Professor Dr. M. Schrappe
- 2007 Erstes Tertial des Praktischen Jahres: Innere Medizin in der Medizinischen Klinik des Friedrich-Ebert-Krankenhauses in Neumünster vom 27. August 2007 bis zum 16. Dezember 2007, Leiter Professor Dr. A. Schuchert
- Zweites Tertial des Praktischen Jahres: Pädiatrie in der Kinderklinik der Universität Kiel vom 17. Dezember 2007 bis 10. Februar 2008, Leiter Professor Dr. M. Schrappe; Pädiatrie in der Medizinischen Universitäts-Kinderklinik, Inselspital in Bern, Schweiz vom 11. Februar 2008 bis zum 6. April 2008, Leiter Professor Dr. R. Kraemer
- Drittes Tertial des Praktischen Jahres: Chirurgie in der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel vom 7. April 2008 bis zum 27. Juli 2008, Leiter der Sektion Thoraxchirurgie Professor Dr. P. Dohrmann

Andere Interessensgebiete

- 1996 Teilnahme am Bundeswettbewerb „Jugend musiziert“. 3. Preis in der Wertung für Blockflötenquartett
- 1999 Teilnahme am Landeswettbewerb „Jugend musiziert“. 1. Preis in der Wertung für Bläser-Ensembles
- 2001 Teilnahme am „The Bath Schools’ Model United Nations“ vom 2. März 2001 bis zum 4. März 2001 in Bath, England
- 2005 Teilnahme am „International Student Festival in Trondheim“ (ISFiT 2005, Education. Why?) in Norwegen vom 11. Februar 2005 bis zum 20. Februar 2005