

Aus dem Med. Zentrum für Innere Medizin

Bereich Endokrinologie & Diabetologie

Direktor: Prof. Dr. med. P. H. Kann

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg und in
Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH

Standort Marburg

**Pharmakogenetik der Wachstumshormonsubstitution bei
Hypophysenvorderlappeninsuffizienz:
Der Collagen-I-alpha-1-SP1-Polymorphismus**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Marlitt Horn, geb. Haist
aus Seeheim-Jugenheim**

Marburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 27.11.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. P. H. Kann

Koreferent: Prof. Dr. med. R. Göke

1. Einleitung	1
1.1. Kollagen	1
1.1.1. COLIA1-SP1-Polymorphismus (Collagen-I-alpha-1-SP1-Polymorphismus)	4
1.1.2. Der COLIA1-SP1-Polymorphismus und die individuell unterschiedliche Ansprechbarkeit auf subkutan applizierte Substanzen	7
1.2. Das humane Wachstumshormon (Growth hormone = GH)	9
1.2.1. Molekularbiologie	9
1.2.2. Regulation der GH-Sekretion	10
1.2.3. Insulin-like-Growth-Faktor (IGF)	12
1.2.4. Wirkmechanismus und metabolischer Einfluss von GH	13
1.2.5. Ursachen und Klinik des GH-Mangels beim Erwachsenen	19
1.2.6. Diagnose und Therapieindikation des GH-Mangels	21
1.2.7. GH-Substitutionstherapie	26
2. Ziel der Untersuchung	30
3. Material und Methoden	31
3.1. Patientenkollektiv	31
3.2. Materialien	34
3.3. Methoden	36
3.4. Statistische Analysen	41
4. Ergebnisse	42
4.1. Verteilung des COLIA1-SP1-Polymorphismus im Patientenkollektiv im Vergleich zur gesunden europäischen Bevölkerung	42
4.2. Assoziation mit klinischen Befunden	43
4.3. GH-Therapie assoziierte Merkmale in Abhängigkeit vom COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotyp	48
4.4. Korrelation zwischen anthropometrischen und GH-Therapie assoziierten Merkmalen	50
5. Diskussion	51
6. Zusammenfassung	57
7. Verzeichnis der Abkürzungen	60
8. Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	62
8.1. Tabellen	62

8.2. Abbildungen.....	63
9. Literaturangaben	64
10. Anhang.....	80

1. Einleitung

1.1. Kollagen

Kollagen ist ein bei Menschen und Tier vorkommendes Strukturprotein der extrazellulären Matrix. Im menschlichen Körper ist Kollagen mit über 30 % Anteil am Gesamtgewicht aller Proteine das am häufigsten vorkommende Eiweiß. Es ist organischer Bestandteil von Knochen und Zähnen und der wesentliche Bestandteil von Sehnen, Bändern und Haut. Kollagenfasern besitzen eine enorme Zugfestigkeit und sind nicht dehnbar. Seinen Namen erhielt das Kollagen (aus dem Griechischen: Leim erzeugend) ursprünglich aufgrund seiner früheren Nutzung als Knochenleim im Holzhandwerk.

Kollagen besteht aus helikalen Peptidketten (auch α -Ketten genannt), die eine linksgängige Helix aufweisen. Drei dieser Helices, welche untereinander Wasserstoffbrücken (sog. H-Brücken) ausbilden können, umschlingen einander zu einer rechtsgängigen Superhelix. Auffallend an der Primärstruktur (Aminosäuresequenz) des Kollagens ist, dass jede dritte Aminosäure Glycin ist. Diese häufig vorkommende Primärstruktur der α -Ketten setzt sich aus repetitiven G-x-y-Einheiten (Prolin-Hydroxyprolin-Glycin) zusammen.

Die Aminosäure Prolin ist sehr häufig an Position x zu finden, während 4-Hydroxyprolin an Position y lokalisiert ist. Hierdurch wird die Rotation der Polypeptidkette begrenzt. Jede α -Kette kann in Abhängigkeit des Kollagen-Typs aus 600 bis 3000 Aminosäuren (AS) zusammengesetzt sein [Eriksen et al., 2006; Myllyharju et al., 2001; Prockop et al., 1995; Kivirikko et al., 1993].

Zurzeit sind 28 verschiedene Kollagentypen bekannt (Typ I bis XXVIII). Zusätzlich sind mindestens 10 weitere Proteine mit Kollagen-ähnlichen Domänen zu verzeichnen. Die Kollagene werden in verschiedene Untergruppen unterteilt. Die wichtigsten Kollagentypen zeigt Tabelle 1.1. [Eriksen et al., 2006; Myllyharju et al., 2001; Prockop et al., 1995; Kivirikko et al., 1993].

Typ	Vorkommen
I	Knochen, Haut, Sehnen, Bänder, Hornhaut, innere Organe
II	Knochen, Zwischenwirbelscheiben
III	Blutgefäße, Skelettmuskulatur
IV	Basalmembran
V	Knochen, Haut, Sehnen, Bänder, Hornhaut, innere Organe
VI	Bindegewebe
VII	Verankerung von Epithelien aus Basalmembran und Stroma
VIII	Descemet Membran
IX	Knorpel, Corpus vitreum
X	Wachstumszone Knorpel
XI	Knochen, Haut, Sehnen, Bänder, Hornhaut, innere Organe
XII	Embryonale Haut, embryonale Sehnen
XVII	Assoziation mit Hemidesmosomen von Plattenepithelien der Epidermis
XIX	Fetale Haut, fetale Sehnen

Tab. 1.1.: Die häufigsten Kollagentypen

Kollagen Typ I, das zu den fibrillären Kollagen-Typen gerechnet wird, kommt in allen Geweben vor, am häufigsten jedoch in Haut und Knochen, aber auch in Sehnen und der Hornhaut des Auges (Kornea). Es repräsentiert das häufigste extrazelluläre Protein im Subkutangewebe. Synthetisiert wird Kollagen Typ I insbesondere von Fibroblasten, Osteoblasten und Myofibroblasten [Chenu et al., 1990; Rossert et al., 2000, Eriksen et al., 2006; Myllyharju et al., 2001; Prockop et al., 1995; Kivirikko et al., 1993].

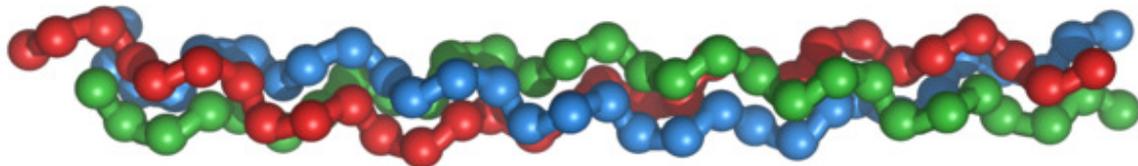


Abb. 1.1.: Kollagen-Tripelhelix

Das Kollagen Typ I Tripelhelixmolekül besteht aus zwei Alpha 1- und einer Alpha 2-Proteinkette, welche von unterschiedlichen Genen, COL1A1 (Collagen Typ I-alpha-1) und COL1A2 (Collagen Typ I-alpha-2), kodiert werden. Lokalisiert sind diese Gene auf Chromosom 17 und 7 [Rossert et al., 2000].

Die sie bildenden drei Kollagen-Polypeptidketten sind im Falle von Kollagen Typ I die linksgängigen α -Ketten, $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$, die sich zu einer rechtshändigen Tripelhelix umeinander winden.

Das Gen der $\alpha 1$ -Kette von Kollagen Typ I besteht aus 50 Exons (kodierenden Genen), von denen über die Hälfte eine Länge von 54 Basenpaaren oder das zwei- bis dreifache dieser Länge besitzen. Sie kodieren die Sequenz (G-x-y) 6 oder ein Vielfaches davon. Einzelne Kollagen-Polypeptidketten werden am rauen endoplasmatischen Retikulum hergestellt und in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums transportiert. Dabei liegen sie in Form größerer Vorläufermoleküle, den Pro- α -Ketten, vor, die mit N- und C-terminalen Propeptiden versehen sind. Im endoplasmatischen Retikulum werden an einzelne Prolin- und Lysin-Reste OH-Gruppen angehängt (Hydroxylierung). Durch Ausbildung von Disulfidbindungen zwischen den C-terminalen Propeptiden wird die Tripelhelixbildung eingeleitet [Eriksen et al., 2006; Myllyharju et al., 2001; Prockop et al., 1995; Kivirikko et al., 1993; Chamson et al., 1995].

Drei Pro- α -Ketten formieren dabei über Wasserstoffbrücken ein dreisträngiges Helixmolekül, das Prokollagen. Die fibrillären Kollagene werden in dieser Form aus der Zelle entlassen. Die Abgabe der Moleküle in den extrazellulären Raum erfolgt durch Exozytose, mittels sekretorischer Vesikel. Unmittelbar nach der Abgabe aus der Zelle werden die Propeptide mit Hilfe von Prokollagen-Peptidasen abgespalten. Anschließend lagern sich einzelne Kollagen-Moleküle zu Kollagen-Fibrillen zusammen (Fibrillogenese). In einem weiteren Schritt kommt es dann zur Ausbildung der Kollagenfasern, wobei die Quervernetzung an bestimmten Lysin- und Hydroxylysinresten erfolgt. Vitamin C (Ascorbinsäure) ist ein wichtiger Co-Faktor bei der Hydroxylierung der Aminosäuren Prolin und Lysin. Bei fehlender Hydroxylierung werden nur fehlerhafte Kollagenmoleküle gebildet, die ihrer Funktion als Strukturprotein nicht nachkommen können. Hierbei ist anzumerken, dass nahezu alle Symptome der Ascorbinsäure-Mangelerkrankung Skorbut auf die fehlerhafte Biosynthese des Kollagens zurückzuführen sind [Cohn et al., 1990].

In den Fibrillen sind benachbarte Kollagenmoleküle nicht bündig angeordnet, sondern um 67 nm, d.h. um etwa ein Fünftel ihrer Länge, gegeneinander versetzt. Diese Anordnung hat zur Folge, dass auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Metall-kontrastierten Kollagenfibrillen eine Querstreifung zu sehen ist. Es entsteht ein charakteristisches Bänderungsmuster, das sich alle 67 nm (234 Aminosäuren) wiederholt und als D-Periode bezeichnet wird. Dadurch werden die α -Ketten in vier homologe Bereiche D1-D4 unterteilt. Die in einer D-Einheit auftretenden Banden werden mit a-e bezeichnet [Chamson et al., 1995].

Die Kollagen-Fibrillen sind geordnete Polymere, die im ausgereiften Gewebe viele Mikrometer lang werden können. Sie sind oft zu größeren, kabelartigen Bündeln, den Kollagenfasern, zusammengefasst. Bei Sehnen betragen die Kollagen Typ I Fibrillendurchmesser 50-500 nm, in der Haut 40-100 nm und in der Kornea 25 nm. Die Fibrillogenese des Kollagens wird oftmals durch kleine leucinreiche Proteoglycane reguliert, so dass in den entsprechenden Geweben Fibrillen mit definiertem Durchmesser und definierter Anordnung entstehen können [Eriksen et al., 2006; Myllyharju et al., 2001; Prockop et al., 1995; Kivirikko et al., 1993].

1.1.1. COLIA1-SP1-Polymorphismus (Collagen-I-alpha-1-SP1-Polymorphismus)

Ein diploider Organismus besitzt von jedem Gen (z.B. für die Blutgruppe) zwei Kopien, im Regelfall eines von jedem Elternteil. Sind diese beiden Gene eines Individuums für ein bestimmtes Merkmal gleich, bezeichnet man das Erbgut, bezogen auf dieses Merkmal, als reinerbig oder homozygot. Für viele Gene existieren mehrere Varianten. An gleicher Stelle im Erbgut kann bei einem Individuum die Erbinformation für z.B. braune Haare, bei einem anderen Individuum für blonde Haare gespeichert sein. Die unterschiedlichen Genvarianten nennt man als Allele. Das Vorhandensein zweier gleicher Allele in einem Genom bezeichnet man daher als homozygot, während das Auftreten zweier verschiedener Allele als heterozygot bezeichnet wird.

Als Polymorphismus bezeichnet man das Auftreten einer Genvariante (d.h. eines Allels) in einer Population. Definitionsgemäß muss die Auftretenshäufigkeit der Genvariante größer als 1 % sein, anderenfalls wird von einer Mutation gesprochen.

Es lassen sich 3 Arten von Polymorphismen unterscheiden: Einzelnukleotidpolymorphismen (Single Nucleotid Polymorphism, SNP), Insertion- und Deletionspolymorphismen und Multiplikationen.

Die häufigsten Polymorphismusformen sind die Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP), bei denen es zum Austausch eines Nukleotids im DNA-Molekül kommt. Es wird von einem SNP auf 200-1000 Basenpaare im menschlichen Genom ausgegangen. Liegt der SNP im kodierenden Bereich einer Gen-Sequenz, kann das einen Aminosäureaustausch im resultierenden Protein zur Folge haben. Da aber viele Aminosäuren von mehreren Basentriplets kodiert werden, hat nicht jeder Basenaustausch in der DNA zwingend einen Aminosäureaustausch im Protein zur Folge [Zhao et al., 2006; Zöllner et al., 2000; Reich et al., 2000].

Einer dieser Polymorphismen des COLIA1-Gens wurden schon in zahlreichen vorangegangenen Studien beschrieben [Kann et al., 2002; Willing et al., 1994; Nuytinck et al., 2000; Gensure et al., 2005]. Es handelt sich hierbei um einen Single Nucleotid Polymorphism (SNP), welcher an der Bindestelle des ubiquitär auftretenden Transskriptionsfaktor spezifisch protein 1 (SP1) liegt. Diese Genvariabilität befindet sich auf Position ex2-348 als erste Base der SP1-Bindungsstelle im ersten Intron des COLIA1-Gens auf Genlocus 17q21. Wie bereits von Kann et al. 2002 in Untersuchungen zur Knochendichte bei postmenopausalen Frauen beschrieben, lassen sich bei dem COLIA1-SP1-Polymorphismus 3 unterschiedliche Genvariationen je nach Basenanordnung nachweisen. Die in dem COLIA1-SP1-Polymorphismus vorkommenden Basen Guanin und Thymin lagern sich je nach Polymorphismus unterschiedlich zueinander und können damit entweder den homozygoten Genotypen GG (zwei Guanin-Allele), den homozygoten Genotypen TT (zwei Thymin-Allele) oder den heterozygoten Genotypen GT (Allel Thymin und Guanin) ausbilden.

Andere Punktmutationen auf dem COLIA1-Gen wurden bei Ausprägung von Osteogenesis imperfecta [Willing et al., 1994] und dem Ehler-Danlos-Syndrom [Nuytinck et al., 2000; Chamson et al., 1995] beschrieben.

2005 wurde eine Studie veröffentlicht, die eine COLIA1-Genmutation als zugrunde liegende Ursache einer autosomal dominanten Form von infantiler kortikaler Hyperostosis (Caffey-Silvermann-Syndrom, charakterisiert durch unregelmäßige Periostverdickungen im ossären Diaphysenbereich mit dolenter Weichteilschwellung) detektierte [Gensure et al., 2005].

Auch die infiltrativ wachsenden Hauttumoren Dermatofibrosarkoma protuberans und Riesenzellfibroblastom werden durch ein chromosomales Rearrangement genetisch determiniert, bei dem es zu einer Fusion des COLIA1-Gens mit dem Gen der B-Kette des platelet-derived growth factors kommt [O'Brien et al., 1998]. In Bezug auf die Assoziation des COLIA1-SP1-Polymorphismus mit Osteoporose konnte in Gel-Elektrophoreseuntersuchungen gezeigt werden, dass das T-Allel im Vergleich zum G-Allel eine höhere Affinität zu dem SP1 Bindeprotein aufweist [Mann et al., 2001]. Diese Tatsache war verbunden mit einer größeren Anzahl von T-Allel-Transkripten in unverbundenen DNA-Strängen, extrahiert aus Knochenmaterial von Individuen, die einen heterozygoten Genotypen (GT) des COLIA1-SP1-Polymorphismus aufwiesen [Mann et al., 2001]. Analysen der Collagen-Proteinproduktion zeigten eine verstärkte Produktion von COLIA1-Ketten relativ zur Produktion der COLIA2-Ketten in Osteoblasten von GT-heterozygoten Genotypen im Vergleich zu den GG-homozygoten Genotypen. Dies führte zu einer relativen Überexpression von COLIA1-mRNA im Vergleich zu COLIA2-mRNA in Osteoblasten [Mann et al., 2001].

Die Normalverteilung der Allele des COLIA1-SP1-Polymorphismus in der gesunden europäischen Bevölkerung liegt für das homozygote Allel G (GG) bei ca. 64,5 %, für das heterozygote Allel GT (GT) bei 29,8 % und für das homozygote Allel T (TT) bei 5,6 % (Tab. 1.2.) [Kann et al., 2002; Nguyen et al., 2005; Ralston et al., 2006].

Die Patienten aller hier angeführten Studien stammen aus Europa. Das Kollektiv, welches Kann et al. 2002 analysierten, stammte aus Holland. Ralston et al. rekrutierten für seine Studie 2006 Patienten aus verschiedenen europäischen Ländern. Das Untersuchungskollektiv von Nguyen et al. 2005 wurde überwiegend aus dem kaukasischem Raum zusammengestellt.

Literatur	n (%)	GG (%)	GT (%)	TT (%)
Kann et al.	740 (100)	477 (64,5)	233 (31,4)	30 (4)
Nguyen et al..	677(100)	433 (63,9)	210 (31)	34 (5)
Ralston et al.	248 (100)	160 (64,5)	74 (29,8)	14 (5,6)

Tab. 1.2.: Allel-Verteilung des COLIA1-SP1-Polymorphismus in der Normalbevölkerung [Kann et al., 2002; Nguyen et al., 2005; Ralston et al., 2006]

Die Beeinflussung des Knochenstoffwechsels durch das COLIA1-Gen und den COLIA1-SP1-Polymorphismus wurde in zahlreichen Studien belegt [Kann et al., 2002; Nguyen et al., 2005; Ralston et al., 2006; Willing et al., 1994; Nuytinck et al., 2000; Bornstein et al., 1987; Grant et al., 1996].

Im Rahmen einer großen Multicenter Studie mit 20.786 untersuchten Patienten wurde eine Assoziation des COLIA1-SP1-Polymorphismus mit der Knochendichte (bone mineral density, BMD) der Lendenwirbelsäule und des Oberschenkelhalses beschrieben [Ralston et al., 2006]. Dieser beschriebene COLIA1-SP1-Genotyp abhängige Einfluss auf den BMD der Patienten wurde in einer weiteren Studie [Saitta et al., 2000] als wesentlicher Faktor für die Knochenelastizität und damit assoziierte Frakturhäufigkeit beschrieben [Kann et al., 2002].

Weitere Studien beschäftigten sich mit den regulierenden Elementen auf die Promoter Region des COLIA1-Gens, die die Transskriptionskontrolle der Kollagen Produktion in normalen und von generalisierter Sklerose betroffenen Fibroblasten beeinflussen [Hitraya et al., 1998].

1.1.2. Der COLIA1-SP1-Polymorphismus und die individuell unterschiedliche Ansprechbarkeit auf subkutan applizierte Substanzen

Die extrazelluläre Bindegewebsmatrix der Haut und der Knochen besteht überwiegend aus Kollagen Typ I. Der Zusammenhang zwischen Hautdicke und Knochendichte wurde von Whitmore et al. anschaulich beschrieben [Whitmore et al., 1998].

Chappard et al. postulierten 1991 einen gemeinsamen genetischen Mechanismus bei der Alters-bedingten Haut- und Knochendegeneration [Chappard et al., 1991]. So zeigten sie eine statistisch signifikante Korrelation zwischen vertebralem und femoralem BMD, sowie der jeweiligen Hautdicke [Chappard et al., 1991].

Robinson et al. beschrieben die Korrelation dieser zwei Parameter (Hautdicke und Knochendichte) bei Patienten mit Morbus Crohn [Robinson et al., 1997].

Whitmore et al. benannten verschiedene Einflussfaktoren auf die Knochendichte und auf die Hautdicke, wie z.B. Koffein, körperliches Training, Schilddrüsenhormonsubstitutionstherapie, Therapie mit Glukokortikoiden oder Östrogenen. Zur Möglichkeit der Beeinflussung der Hautdicke durch genetische Faktoren wurden jedoch in dieser Arbeit keine Aussagen gemacht [Whitmore et al., 1998].

Der Einfluss der COLIA1-Gens auf die systemische Sklerose, eine Bindegewebserkrankung, die mit einer exzessiven Produktion von Komponenten von Kollagen einhergeht, sowie auf die Knochendichte, führt zu der These, dass der COLIA1-SP1-Polymorphismus auch einen Effekt auf die mechanischen und biologischen Eigenschaften des Kollagen Typ I-haltigen Subkutangewebes haben könnte.

Eine Anzahl renommierter Forscher hat sich seit 2006 [Ioannidis JP et al., 2006] zur Aufgabe gemacht, diese zahlreichen Daten über Genvariabilitäten und deren potentielle Auswirkungen auf die Entstehung von Erkrankungen zu sammeln und ein zentrales Netzwerk zur Verwaltung dieser Daten aufzubauen.

Individuelle Unterschiede in der Ansprechbarkeit auf subkutan applizierte Substanzen (z.B. Medikamente oder Hormone) sind bis jetzt noch nicht vollständig verstanden.

Bei der Beeinflussung der Absorption subkutan applizierter Substanzen werden verschiedene, zum Teil bereits genannte, exogene Einflussfaktoren (z.B. Kaffeingenuss, körperliches Training usw.) diskutiert. Bei der Absorption von subkutan appliziertem Insulin wurden z.B. der lokale Blutfluss an der Injektionsstelle, die Injektionslokalisierung, Raum- und Körpertemperatur, körperliche Betätigung, Dicke von Haut und Subkutangewebe, lokale Massage, subkutane Flüssigkeitseinlagerungen, Insulintypen, Injektionstechnik, Raucheranamnese und weitere Faktoren als beeinflussend beschrieben [Hildebrandt, 1991; Sindelka et al., 1994].

Inwieweit jedoch genetische Faktoren die Absorption bzw. Bioverfügbarkeit subkutan applizierter Substanzen durch Änderung von mechanischen und biologischen Eigenschaften und/oder der Dicke des Subkutangewebes beeinflussen, wurde bis jetzt nicht untersucht.

Aus diesem Grund beschäftigt sich diese Studie mit dem möglichen Effekt des COLIA1-SP1-Polymorphismus auf die benötigte Dosis von subkutan injiziertem hGH (human Growth Hormone) bei GH-defizienten adulten Patienten bis zum Erreichen alters- und geschlechtsspezifischer IGF-1-Serumwerten.

1.2. Das humane Wachstumshormon (Growth hormone = GH)

1.2.1. Molekularbiologie

GH ist ein einkettiges, aus 191 Aminosäuren (AS) ohne Zuckerreste aufgebautes Peptidhormon, welches über 2 Disulfidbrücken (Cys53-Cys165; Cys182-Cys189) in seine Tertiärstruktur gefaltet ist. Diese besteht aus 4 α -Helices, die antiparallel angeordnet sind. Wachstumshormon ist das Produkt des GH-1 (GH-N)-Gens, welches zusammen mit Genen für humanes Chorionsomatototropin (hCS) und dem nur in der Placenta exprimierten GH-2 (GH-V)-Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 17 lokalisiert ist.

Neben GH mit einem Molekulargewicht von 22 kDA (Kilo Dalton) entsteht durch alternatives Splicing eine Proteinvariante von 20 kDA, dem die Aminosäuren 32-46 der 22-kDA-Form fehlen. Darüber hinaus existieren im Blut in geringen Konzentrationen, jedoch individuell variierend, weitere GH-Varianten und Oligomere mit unterschiedlicher biologischer Aktivität.

Die Expression des GH-1-Gens ist fast ausschließlich auf die somatotropen Zellen der Adenohypophyse beschränkt, welche ca. 90 % ihrer Zellmasse ausmachen [Nawroth et al., 2001]. In den großen Granula (350-500 nm) dieser Zellart werden 4-6 mg GH gespeichert, was etwa 3-5 % des Drüsentrockengewichts entspricht. Die tägliche GH-Produktionsrate beträgt nur einen kleinen Teil dieser Menge, etwa 400 μ g pro Tag. Wegen der hohen Spezifität ist beim Menschen therapeutisch nur humanes GH wirksam (hGH) [Kossiakoff et al., 2004; Wieland et al., 1998; Behncken et al., 1999; Wells et al., 1993; de Vos et al., 1992].

1.2.2. Regulation der GH-Sekretion

Die spontane GH-Sekretion ist charakterisiert durch Phasen kurzzeitiger Ausschüttungen in die Zirkulation und längeren Phasen der Sekretionsruhe, in denen die GH-Konzentration im Serum unter $1 \mu\text{g/l}$ absinkt. Die Halbwertszeit des GH in der Zirkulation beträgt etwa 20 Minuten. Die Sekretionsepisoden erfolgen ca. alle 3 Stunden [Nawroth et al., 2001]. Bei den erhöhten GH-Spiegeln während der Nacht handelt es sich um Schlaf-assoziierte Sekretionsschübe, die in den Schlafstadien 3 und 4 (Slow-wave-EEG) auftreten und sich mit dem Schlaf parallel verschieben lassen [Wieland et al., 1998].

In der Regel wird mehr GH (ca. $2/3$) in der Schlafphase, als während des Wachseins sezerniert. Die GH-Sekretion ist im Säuglingsalter und in der Pubertät am höchsten. Im Erwachsenenalter sinkt die GH-Sekretion bis ins Senium hin ab (Abb. 1.2.) [Nawroth et al., 2001].

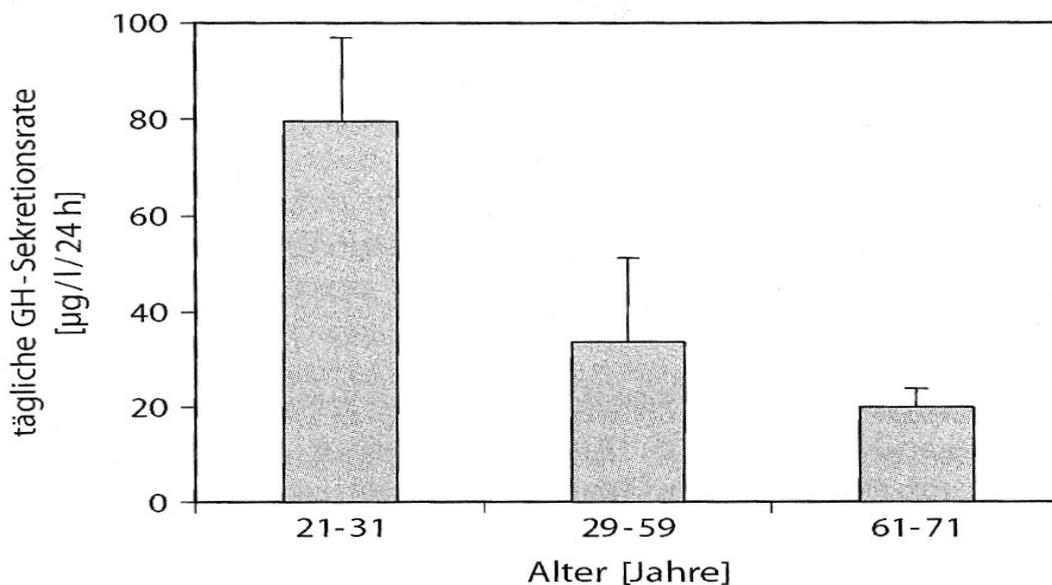


Abb. 1.2.: Tägliche GH-Sekretion in Abhängigkeit vom Alter [Nawroth et al., 2001]

In der Adoleszenz beträgt die GH-Sekretion etwa $60 \mu\text{g}/\text{kg KG}/24 \text{ h}$, im jungen Erwachsenenalter etwa $17 \mu\text{g}/\text{kg KG}/24 \text{ h}$. Die GH-Sekretion ist bei Frauen geringfügig höher als bei Männern [Nawroth et al., 2001].

Die Synthese und Sekretion von GH wird vordringlich durch die Balance zwischen GH-Releasing-Hormone (GHRH, Syn. Somatokrinin) und Somatostatin (GH-Release-Inhibiting-Hormon, GHRIH) reguliert [Smith et al., 1997]. Auch das Peptidhormon Ghrelin stimuliert an spezifischen GH-Rezeptoren in der Hypophyse die Ausschüttung von GH [Kojima et al., 1999].

Somatokrinin (Syn. GHRH)

Somatokrinin ist ein Peptidhormon von 44 AS Länge, dessen Produktion vorzugsweise im Nucleus arcuatus des Hypothalamus erfolgt. Axone sind von dort zur Eminentia mediana gerichtet. Somatokrinin wirkt nach Bindung an einen spezifischen G-Protein gekoppelten Zelloberflächenrezeptor über eine cAMP vermittelte intrazelluläre Signalkaskade. Dies führt zu einer Steigerung der GH-Produktion und –Sekretion [Nawroth et al., 2001].

Somatostatin (Syn. GHRIH)

Somatostatin ist ein Peptidhormon von 14 AS Länge, dessen Produktion vorzugsweise von Neuronen im Bereich der anterioren periventriculären Region des Hypothalamus erfolgt. Axone von dort sind zur Eminentia mediana regulatorisch gerichtet. Die Bindung von Somatostatin an spezifische Rezeptoren bewirkt eine Hemmung der Adenylatcyclaseaktivität und eine Verminderung der intrazellulären Kalziumkonzentration, welches zu einer Verminderung der GH-Sekretion führt [Smith et al., 1997; Nawroth et al., 2001].

Ghrelin

Ghrelin ist ein Peptidhormon von 28 AS Länge, welches überwiegend im Epithel des Magenfundus, jedoch auch in der Hypophyse und im Hypothalamus, synthetisiert wird. Nach Abspaltung einiger Aminosäuren und damit Überführung in seine aktive Form fungiert das Hormon als endogener Ligand für einen Rezeptor (GHS-Rezeptor, Growth Hormone Secretagogue Rezeptor), der die Freisetzung von GH im Hungerzustand oder bei Schlafmangel stimuliert [Kojima et al., 1999; Garcia et al., 2005].

Regulationsmechanismen

Die Wirkung von GHRH, Ghrelin und Somatostatin ergibt sich aus der teils pulsatilen, teils tonischen Natur ihrer Sekretion. Auf hypothalamisch-hypophysärer Ebene sind Rückkopplungsmechanismen („short loop“) wirksam (so steigert die Sekretion von GH z. B. die Freisetzung von Somatostatin), welche die GH-Sekretion beeinflussen. Ein komplexes und bisher noch nicht vollständig verstandenes System von Neurotransmittern im Hypothalamus beeinflusst die Sekretion von GHRH, Ghrelin und Somatostatin [Nawroth et al., 2001]. So ist bekannt, dass Agonisten des α -Rezeptors sowie dopaminerge und serotoninerge Agonisten die GH-Sekretion ebenso stimulieren, wie Stress, Hypoglykämie, Schlaf- und Proteinmangel, während β -adrenerge Agonisten, Hyperglykämie und erhöhte freie Fettsäuren im Blut die GH-Sekretion inhibieren [Spinas et al., 2002, Kojima et al., 1999]. Die pulsatile Natur der GH-Sekretion beruht auf der Interaktion dieses Regulationsnetzwerks auf verschiedenen anatomischen und funktionellen Ebenen [Kossiakoff et al., 2004; Wieland et al., 1998; Behncken et al., 1999; Wells et al., 1993; de Vos et al., 1992].

1.2.3. Insulin-like-Growth-Faktor (IGF)

Die Wirkungen des GH sind entweder direkt oder werden indirekt durch den Insulin-like-Growth-Faktor-1 (IGF-1) vermittelt. IGF-1 ist ein einkettiges Peptid (70 AS), welches ebenso wie das IGF-2 dem Proinsulin strukturell sehr ähnlich ist. Es wird durch ein Gen, welches auf dem langen Arm von Chromosom 12 lokalisiert ist, kodiert. Anders als das GH mit hoher Speziespezifität ist das IGF-1 verschiedener Spezies sehr homolog. Das GH-abhängige IGF-1 der Zirkulation stammt überwiegend aus der Leber. Die IGF-Produktion findet aber auch in vielen anderen Geweben statt. IGF-1 bindet an einen membranständigen Rezeptor (Typ-1 IGF-R), der wie der Insulin-Rezeptor aus einem Heterodimer mit 2 α - und 2 β -Ketten besteht. Dieser ist in die intrazelluläre Signalkaskade mittels einer rezeptoreigenen Tyrosinkinase angekoppelt [Nawroth et al., 2001].

Regulation des IGF-Systems

Das IGF-System ist außerordentlich komplex reguliert. Die Konzentration des IGF-1 im Blut hängt unter anderem sowohl von der GH-Sekretion, als auch von nutritiven Faktoren und der Leberfunktion ab. IGF-1-Konzentrationen in der Zirkulation und die Sekretion von GH stehen mittels positivem oder negativem Feedback in einem Rückkopplungsverhältnis zueinander [Nawroth et al., 2001].

IGF-Bindungsproteine

IGF zirkulieren an Bindungsproteine (IGFBP) assoziiert. Es sind derzeit 6 Bindungsproteine (IGFBP 1-6) für IGF bekannt, welche in ihrer chemischen Struktur grundsätzlich ähnlich sind. Unterschiede ergeben sich hinsichtlich ihrer Größe, ihrem präferenziellen Bindungsverhalten für IGF-1 oder IGF-2, ihrer Fähigkeit, proteolytisch gespalten bzw. phosphoryliert werden zu können, ihrer Expression in Geweben, ihrer Konzentration in Körperflüssigkeiten, ihrer Fähigkeit an Strukturproteine zu binden, ihre Regulation durch Hormone u.a.m.

IGFBP verlängern die Halbwertszeit der IGF-Proteine, die in „freier“ Form nur wenige Minuten beträgt, auf ca. 12 Minuten und spielen für die Präsentation von IGF an ihren Rezeptoren in verschiedenen Geweben eine zentrale Rolle. In der Zirkulation erscheint IGF-1 (und IGF-2) vordringlich an IGFBP-3 (53 kDA) gebunden (binärer Komplex) und formt mit ALS (acid-labile-subunit, 85 kDA) einen ternären Komplex (150 kDA). IGFBP-3 und ALS werden abhängig von GH in der Leber gebildet. Der ternäre Komplex kann die Zirkulation nicht verlassen und stellt die einzige Depotform für die IGFs dar, für die kein intrazelluläres Reservoir existiert [Nawroth et al., 2001].

1.2.4. Wirkmechanismus und metabolischer Einfluss von GH

Der erste Schritt der GH-Wirkung ist die spezifische Bindung an einen Membranrezeptor (GH-R), welcher zur Superfamilie der Zytokinrezeptoren gehört. Das Rezeptorprotein besteht aus einer extrazellulären (247 AS), einer transmembranen (24 AS) sowie einer intrazellulären Domäne (397 AS), welche mit der intrazellulären Signalkaskade gekoppelt ist. Die Interaktion von GH mit dem Rezeptor erfolgt in 2 Schritten.

Zunächst bindet GH mit einer hochaffinen Bindungsstelle an die äußere Domäne eines Rezeptormoleküls. Dann assoziiert sich ein zweites Rezeptormolekül mit einer anderen Bindungsstelle des bereits ligierten GH-Moleküls. Wenn diese Dimerisierung zweier GH-Rezeptoren erfolgt ist, wird die intrazelluläre Signalkaskade aktiviert. Die Rezeptor-Dimerisierung aktiviert die assoziierte Tyrosinkinase JAK2 und führt zur Tyrosin-Phosphorylierung des Rezeptors. Die extrazelluläre Domäne des Rezeptors, ein einsträngiges Glykoprotein (60 kDA), kann im Menschen durch Proteolyse abgespalten werden und zirkuliert als hochaffines Bindungsprotein für GH (GH-BP) im Serum. Man nimmt an, dass die Konzentration des GH-BP in der Zirkulation den Rezeptorstatus eines Individuums reflektiert. Etwa 15-35 % des zirkulierenden GH sind an GH-BP gebunden. Die physiologische Bedeutung der GH-Bindung an GH-BP, durch welche die Halbwertszeit von GH verlängert wird, ist noch nicht vollkommen geklärt. Da die GH-Bindung an GH-BP reversibel ist, mag GH-BP für den Transport von GH zu Zielgeweben eine Rolle spielen [Kossiakoff et al., 2004; Wieland et al., 1998; Behncken et al., 1999; Wells et al., 1993; de Vos et al., 1992].

Die metabolischen GH-Wirkungen können schematisch in direkte und indirekte sowie sofortige und mit Verzögerung auftretende Wirkungen eingeteilt werden [Nawroth et al., 2001; Moeller, 1993; Jørgensen et al., 2005 a]. Die Effekte sind komplex, da sie von der metabolischen Grundsituation und dem hormonellen Milieu abhängig sind. In Tabelle 1.3. [Nawroth et al., 2001] sind die GH- und IGF-1-Wirkungen gegenüberstellend zusammengefasst:

GH	IGF-1
IGF-1 ↑	GH ↓
IGFBP-1 ↑	IGFBP-3 ↓
Insulin ↑	Insulin ↓
Insulin-Sensitivität ↓	Insulin-Sensitivität ↑
Glukose ↑	Glukose ↓
Glukose-Toleranz ↓	
Lipolyse ↑	Lipolyse ↑

Tab. 1.3.: Metabolische Wirkungen von GH und IGF-1 [Nawroth et al., 2001]

GH und der Glukosestoffwechsel

Dem insgesamt als insulinantagonistisch anzusehenden direkten Effekt von GH steht der indirekte insulinähnliche Effekt des GH-abhängigen IGF-1 entgegen. Beim GH-Mangel ist die Nüchternglukose vermindert; insbesondere Kinder neigen zu einer Hypoglykämie. Gleichzeitig besteht eine verminderte Insulinsekretion, eine erhöhte Insulintoleranz und eine verminderte Glukosetoleranz. Die endogene (hepatische) Glukoseproduktion ist vermindert. Diese Veränderungen sind nach Substitution von GH reversibel, wobei sowohl die endogen Glukoseproduktion als auch die Glukoseverwertung gesteigert sind [Nawroth et al., 2001; Jørgensen et al., 2005 a+b; Yuen et al., 2006].

GH und der Fettstoffwechsel

Ein direkter Effekt von GH besteht auf den Stoffwechsel von Adipozyten. GH stimuliert die Proliferation von Vorläuferzellen der Adipozyten, während IGF-1 diese Zelllinie in einem höheren Entwicklungsstadium stimuliert. Diese Hypothese zur Entwicklungsstand-abhängigen Modulation von GH und IGF-1 wurde von Green et al. [Green et al., 1985] als „dual effector theory“ am Beispiel der Adipozytenproliferation beschrieben. Die Gabe von GH induziert einen durch Lipolyse bedingten Anstieg der freien Fettsäuren (FFA) im Blut. Gleichzeitig stimuliert GH die Lipoproteinlipase (LPL), welche die Aufnahme von FFA im Gewebe und die Lipidoxidation in Bezug auf die Fettmasse des Körpers fördert. In der Situation des Fastens, in der GH erhöht und IGF-1 sowie Insulin vermindert sind, werden dadurch vermehrt Fettdepots abgebaut und ein Proteinabbau vermindert. Die Wirkungen von GH auf das Fettgewebe sind regional im Körper unterschiedlich. In der Situation des GH-Mangels kommt es, insbesondere beim Erwachsenen, zu einer abdominellen Fettgewebsvermehrung, die unter GH-Gabe rasch reversibel ist. Insbesondere beim Erwachsenen mit GH-Mangel ist das Low-density-Lipoprotein (LDL)-Cholesterin vermehrt [Nawroth et al., 2001; Jørgensen et al., 2005 a+b; Yuen et al., 2006].

GH und der renale Wasser- und Elektrolythaushalt

Sowohl die genaue Rolle des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), als auch die Bedeutung von atrialem natriuretischen Peptid (ANP) und

Prostaglandinen im Zusammenwirken mit GH sind derzeit Gegenstand der Forschung [Dimke et al., 2007; Hansen et al., 2001].

GH führt als Akutwirkung, wahrscheinlich durch eine Aktivierung des RAAS [Dimke et al., 2007; Hansen et al., 2001], zu einer vermehrten Wasser- und Elektrolytrückresorption in den Nierentubuli und damit verminderten renalen Ausscheidung.

Dimke et al. beschreibt in einer aktuellen Studie [Dimke et al., 2007] die unterschiedlichen akuten und chronischen Effekte von hGH auf die renale Wasser- und Elektrolytexkretion. Eine akute hGH-Substitution bei vormals GH-defizienten Patienten führte im untersuchten Kollektiv zu einer verminderten renalen Wasser- und Elektrolytexkretion, wobei die chronischen Effekte einer hGH-Therapie einen komplexeren Wirkmechanismus (mit primären und sekundären Einflussfaktoren) und eher einen kompensatorischen Effekt auf den Salz- und Wasserhaushalt aufwiesen [Dimke et al., 2007].

HGH steigert zudem die glomeruläre Filtrationrate (GFR), eine Wirkung, die wahrscheinlich durch IGF-1 moduliert wird. Es ist noch nicht endgültig geklärt, ob die Flüssigkeitsretention Ursache oder Folge der erhöhten GFR ist [Nawroth et al., 2001].

Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass die Effekte von GH auf den Salz-Wasser-Haushalt multifaktoriell sind. Klinisch bedeutsame Wirkungen sind beim Erwachsenen stärker ausgeprägt [Dimke et al., 2007; Hansen et al., 2001; Nawroth et al., 2001].

GH und Knochen

Verschiedene Hormone, wie Schilddrüsenhormone, Sexualhormone und Glukokortikoide, sind zusammen mit dem GH für das postpartale Längenwachstum verantwortlich. Das GH wird hierbei als wichtigster Regulator des Knochenstoffwechsels betrachtet. Es stimuliert unter anderem das Wachstum des Epiphysenknorpels durch Proliferation der Chondrozyten [Mohan et al., 1991; Okasaki et al., 1995; Wong et al., 1990].

Zur Erklärung der Wirkungsweise wurde 1985 die Somatomedin-These durch Green et al. zur „dual effector theory“ ergänzt [Green et al., 1985], welche den Einfluss von GH und IGF-1 auf die verschiedenen Entwicklungsstufen von Adipozyten darlegt. Während das GH die Vorstufe der Präadipozyten stimuliert,

beeinflusst IGF-1 erst die spätere Entwicklung der Adipozyten [Mohan et al., 1991; Okasaki et al., 1995; Wong et al., 1990].

Isakson et al. [Isakson et al., 1987] untersuchten die Effekte der „dual effector theory“ auch am Modell der Wachstumsfuge. Sie nahmen an, dass die proliferative Wirkung des GH auf die Chondrozyten des Stratum germinativum vor allem durch eine Induktion der lokalen IGF-2-Synthese vermittelt wird. Gleichzeitig stimuliert das GH die lokale Proliferation von IGF-1, das vor allem die Hypertrophie der Knorpelzellen in der Zone des Säulenknorpels bewirkt.

Der Knochenaufbau wird über 2 verschiedene Wege stimuliert: via einer direkten Interaktion mit GH-Rezeptoren auf Osteoblasten und über Stimulation der IGF-1-Produktion in Leber und Skelett. GH stimuliert jedoch nicht nur die Proliferation der Osteoblasten auf direktem Weg, sondern auch deren Differenzierung in phänotypische Funktionen, wie z.B. alkalische Phosphatase (AP), Osteocalcin und Typ1 Kollagen [Ohlsson et al., 1998; Ernst et al., 1988; Sloopweg MC, 1993; Kassem et al., 1993; Sloopweg et al., 1988; Morel et al., 1993; Chenu et al., 1990]. Im Gegensatz zur GH-abhängigen IGF-Konzentration in der Zirkulation wird die IGF-1-Produktion im Knochen jedoch auch noch von anderen Faktoren wie z.B. Kortisol oder Parathormon beeinflusst [Slowin et al., 1996; Canalis et al., 1989].

Die Bioaktivität von IGF in Knochengewebe wird von verschiedenen IGF-BPs, hauptsächlich von IGF-BP-3 und-4, moduliert. Einige der GH-Wirkungen am Knochen scheinen durch die lokale Regulation der IGF-BP-Produktion in Osteoblasten bestimmt zu werden [Hayden et al., 1995]. Doch auch humane Osteoklasten exprimieren funktionelle IGF-Rezeptoren [Green et al., 1985]. Sowohl IGF-1 als auch Interleukin-6 sind GH-reguliert an der Osteoklastenformation beteiligt, welche sowohl inhibitorische als auch stimulierende Mechanismen aufweist [Ohlsson et al., 1998], offensichtlich abhängig von Kulturdifferenzierungen.

In einer Studie von Wilhelm et al. wurde der Effekt einer therapeutischen Substitution von hGH auf Knochenstoffwechsel, Knochendichte und Knochenqualität bei Wachstumshormon-defizienten Patienten über den Beobachtungszeitraum von 7 Jahren untersucht [Wilhelm et al., 2004]. Als Parameter des Knochenstoffwechsels wurden der osteoanabole Marker PICP (carboxyterminales Propeptid des Typ-I-Prokollagens) und der osteokatabole Marker ICTP (“type I collagen carboxyterminal cross-linked telopeptide”) im Serum

untersucht. Die Knochendichte wurde an der Lendenwirbelsäule mittels Dual-Photonen-Absorptiometrie und am Unterarm mittels Single-Photonen-Absorptiometrie gemessen. Als ein von der Knochendichte unabhängiger Parameter der Knochenqualität wurde die apparente phalangeale Ultraschalltransmissionsgeschwindigkeit bestimmt. Nach einem initial diskreten Verlust an Knochendichte im 1. Therapiejahr konnte in dieser Studie 2004 ein langfristiger Anstieg der Knochendichte unter hGH-Therapie mit Ausbildung eines stabilen Plateaus nach 5 Jahren gezeigt werden [Wilhelm et al., 2004].

GH und Haut

Die menschliche Haut und deren Anhangsgebilde exprimieren GH-Rezeptoren und sind daher auch direktes GH-Zielorgane. Bei Patienten mit einer GH-Defizienz zeigt sich eine dünne und trockene Haut. Verschiedene Studien [Tanriverdi et al., 2006; Borlu et al., 2007] haben den Einfluss von hGH im Rahmen einer Substitutionstherapie bei GH-defizienten Patienten auf die Hautbeschaffenheit beschrieben. So ließ sich ein deutlich verminderter Hauttalgehalt an der Stirn und eine verminderte dermale Hydratation an Stirn und Unterarm bei den betroffenen Patienten mit einer GH-Defizienz nachweisen. Nach 6 Monaten substituierender Therapie mit hGH kam es zu einem statistisch signifikanten Anstieg des Hauttalgehaltes an der Stirn, jedoch zu keiner Beeinflussung der Hydratation der Haut an Unterarm und Stirn [Tanriverdi et al., 2006; Borlu et al., 2007].

Ben-Shlomo et al. [Ben-Shlomo et al., 2006] beschrieben in ihrer Studie den Einfluss des GH auf die Haut und Hautanhangsgebilde bei Patienten mit einem GH-Überschuss im Rahmen einer Akromegalieerkrankung. So beschrieben die Autoren eine teigige, aufgedunsene Hautbeschaffenheit, ausgelöst durch eine verstärkte Akkumulation von dermalen Glykosaminoglykanen und Flüssigkeitseinlagerungen bei den betroffenen Patienten. Lokalisiert waren diese Veränderungen verstärkt im Gesichtsbereich sowie an Händen und Füßen. Zudem ließen sich eine sehr ölige Haut, Hypertrichosis sowie eine vermehrte Schweißneigung als gemeinsame Merkmale des Krankheitsbildes beobachten. Als auffallend waren auch eine erhöhte Prävalenz für das erythrosquamöse dermale Erscheinungsbild einer Psoriasis vulgaris und verstärkte Hautpigmentierungen zu verzeichnen [Ben-Shlomo et al., 2006].

Auch Ferguson et al. beschrieben in ihrer Studie eine massive Zunahme der Hautdicke bei Patienten mit einem GH-Überschuss im Rahmen einer Akromegalieerkrankung, die sich unter erfolgreicher Therapie der Grunderkrankung zurückbildete [Ferguson et al., 1983].

Gerade diese beiden Extremdarstellungen der GH-Defizienz [Tanriverdi et al., 2006; Borlu et al., 2007] gegenüber dem GH-Überschuss [Ben-Shlomo et al., 2006; Ferguson et al., 1983] und ihre Konsequenzen auf die Haut zeigen die Vielfältigkeit und Komplexität des metabolischen Einflusses von GH auf, der bis heute noch nicht vollständig verstanden ist.

1.2.5. Ursachen und Klinik des GH-Mangels beim Erwachsenen

Häufige Ursachen des GH-Mangels beim Erwachsenen sind zusammenfassend in Tabelle 1.4. [Nawroth et al., 2001; Pfäffle et al., 2000] dargestellt:

Angeborener GH-Mangel

1. Idiopathisch
2. Fehlanlage der Hypophyse
Hypophysenaplasie
Hypophysenhypoplasie
Mittelliniendefekte des Gehirns
3. Genetisch bedingt
 - *Isolated Growth hormone deficiency (GHD)*:
Mikromutationen im GH- und/oder GHRH-Rezeptor
 - *Combined pituitary hormone deficiencies (CPHD)*:
Pit-1-, Prop-1-, HesX1-Gendefekte
4. Pränatale Infektionen

Erworbener GH-Mangel

1. Tumoren von Hypophyse und /oder Hypothalamus
2. Sekundär nach
Trauma
Infektion
ZNS-Bestrahlung

Funktioneller GH-Mangel

1. Psychosoziale Deprivation
2. Bioinaktives GH
3. GH-Resistenz
GH-Rezeptor-Defekt (Laron-Syndrom)
Post-GH-Rezeptordefekt
Genetisch bedingte IGF-1-Synthesestörung
Erworbene GH-Resistenz (Hepatopathie,
Katabolismus, Urämie)

Tab. 1.4.: Ursachen des GH-Mangels [Nawroth et al., 2001; Pfäffle et al., 2000]

In der nachfolgend angeführten Tabelle 1.5. ist vereinfacht die Klinik beim adulten GH-Mangel dargestellt [Nawroth et al., 2001].

Vermehrtes Körperfett
Veränderte Körperfettverteilung (Abdomen > Peripherie)
Verminderte Muskelmasse
Verminderte Muskelkraft
Verminderte Herzleistung
Verminderte Knochendichte
LDL-Cholesterin > HDL-Cholesterin
Verminderte Leistungsfähigkeit
Soziale Isolation

Tab. 1.5.: Syndrom des GH-Mangels beim Erwachsenen [Nawroth et al., 2001]

Das klinische Gesamtbild entspricht demjenigen eines prämaturnen Alterungsprozesses. Muskelmasse und körperliche Leistungsfähigkeit sind vermindert, die Fettmasse ist erhöht. Es stellt sich eine Osteopenie ein. Die Patienten sind adynam, zeigen eine verminderte berufliche Leistungsfähigkeit und tendieren zur sozialen Isolierung. Hypercholesterinämie (hauptsächlich Erhöhung des LDL-Cholesterins [Jørgensen et al., 2005]) und Artherosklerose sind mit einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität verbunden. Bei Patienten mit GH-Mangel schon seit der Kindheit und GH-Substitution bis zum Ende des Wachstums sind die Symptome meist stärker ausgeprägt als bei Patienten, die den GH-Mangel erst im Erwachsenenalter erworben haben [Rosén et al., 1990].

1.2.6. Diagnose und Therapieindikation des GH-Mangels

Bei Patienten mit nachgewiesener Hypothalamus-Hypophysen-Erkrankung, nach kranialer Bestrahlung, traumatischer Hirnschädigung oder bei klinischem Verdacht sollte eine Abklärung hinsichtlich eines GH-Mangels erfolgen [Lugner A, 2007; Consensus guidelines for diagnosis and treatment of adults with growth

hormon deficiency I, 1998; Consensus guidelines for diagnosis and treatment of adults with growth hormone deficiency II, 2007].

Da zahlreiche Faktoren die Konzentration des basalen GH und des IGF-1 beeinflussen (Body Mass Index, Stress, Alter, Geschlecht, Arzneimittel, Krankheiten), sind beide Parameter allein für die Diagnose der GH-Defizienz nicht uneingeschränkt geeignet. Bei Erwachsenen sollte die Diagnose daher mittels dynamischer Untersuchungen erfolgen. Diese Untersuchungen sollte durchgeführt werden, während die Patienten bereits einen stabilen und adäquaten Hormonersatz für andere Hormondefizite erhalten [Lugner A, 2007].

Der meist verwendete Stimulationstest zur Detektion von GH-Defizienz bei Erwachsenen ist der Insulin-Hypoglykämie-Test. Er ist jedoch bei Patienten mit bekannten kardiovaskulären Erkrankungen oder Epilepsie kontraindiziert [Consensus guidelines for diagnosis and treatment of adults with growth hormone deficiency, 1998; Consensus guidelines for diagnosis and treatment of adults with growth hormone deficiency II, 2007]. Da diese Erkrankungen bei GH-defizienten Patienten weit verbreitet sind, hat sich der kombinierte Arginin-GHRH-Test als Alternativmethode durchgesetzt [Zarkovic et al., 2003; Biller et al., 2002; Consensus guidelines for diagnosis and treatment of adults with growth hormone deficiency II, 2007]. Ein weiterer Vorteil dieser Tests besteht darin, dass sich mit ihnen GH-Defizienz bei adipösen und älteren Patienten besser feststellen lässt als mit anderen Tests [Lugner A, 2007].

Nachfolgend werden der Insulin-Hypoglykämie-Test und der Arginin-GHRH-Test kurz im Ablauf vorgestellt:

Insulin-Hypoglykämie-Test:

Durchführung. Vor Beginn des Tests wird eine Blutentnahme zur Erfassung der Basiswerte durchgeführt. Danach werden 0,1 E Human-Insulin/kg KG i.v. appliziert. Infolge werden unten aufgeführte Hormone nach 30, 60, 90 und 120 Minuten bestimmt.

Abnahmezeitpunkt	Material	untersuchte Parameter
-30 min	EDTA-Blut	ACTH, Adrenalin (EDTA-Plasma), Dopamin (EDTA-Plasma)
	Serum	C-Peptid, Cortisol, Glukose (Heparin-Plasma), hGH, Prolaktin
	Sondermaterial	Glucagon
0 min	EDTA-Blut	ACTH, Adrenalin (EDTA-Plasma), Dopamin (EDTA-Plasma), Noradrenalin (EDTA-Plasma)
	Serum	C-Peptid, Cortisol, Glukose (Heparin-Plasma), hGH, IGF-1, Prolaktin
	Sondermaterial	Glucagon
30 min	EDTA-Blut	ACTH, Adrenalin (EDTA-Plasma), Dopamin (EDTA-Plasma), Noradrenalin (EDTA-Plasma), Normoblasten
	Serum	C-Peptid, Cortisol, Glukose (Heparin-Plasma), hGH, Prolaktin
	Sondermaterial	Glucagon
60 min	EDTA-Blut	ACTH, Adrenalin (EDTA-Plasma), Dopamin (EDTA-Plasma), Noradrenalin (EDTA-Plasma)
	Serum	C-Peptid, Cortisol, Glukose (Heparin-Plasma), hGH, Prolaktin
	Sondermaterial	Glucagon
90 min	EDTA-Blut	ACTH, Adrenalin (EDTA-Plasma), Dopamin (EDTA-Plasma), Noradrenalin (EDTA-Plasma)

	Serum	C-Peptid, Cortisol, Glukose (Heparin-Plasma), hGH, Prolaktin
	Sondermaterial	Glucagon
120 min	EDTA-Blut	ACTH, Adrenalin (EDTA-Plasma), Dopamin (EDTA-Plasma), Noradrenalin (EDTA-Plasma)
	Serum	C-Peptid, Cortisol, Glukose (Heparin-Plasma), hGH, Prolaktin
	Sondermaterial	Glucagon

Tab. 1.6. Durchführung des Insulin-Hypoglykämie-Test [Leitlinien Funktionstest Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH, Standort Marburg, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik-Zentrallaboratorium]

Arginin-GHRH-Test:

Hierbei wird erneut vor Testbeginn eine Nüchternblutentnahme durchgeführt. Auch während des Tests sollten keine Kohlenhydrate zugeführt werden. Nach erfolgter Blutentnahme werden 0,5 g Arginin-HCl-Stammlösung/kg Körpergewicht (höchstens 30 g) kontinuierlich über 25-30 Minuten intravenös appliziert. Zudem werden als Bolus 1 µg GHRH/kg Körpergewicht intravenös verabreicht. Es folgen Blutentnahmen zur Bestimmung unten genannter Hormone nach 30, 60, 90 und 120 Minuten.

Abnahmezeitpunkt	Material	untersuchte Parameter
-30 min	Serum	hGH
0 min	Serum	hGH, IGF-1
30 min	Serum	hGH
60 min	Serum	hGH
90 min	Serum	hGH
120 min	Serum	hGH

Tab. 1.7.: Durchführung des Arginin-GHRH-Test [Leitlinien Funktionstest Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH, Standort Marburg, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik-Zentrallaboratorium]

Der Grenzwert für die Diagnose einer schweren GH-Defizienz beim Erwachsenen liegt im Insulin-Hypoglykämie-Test bei $< 3 \mu\text{g/l}$ messbarem GH-Anstieg nach Stimulation [Consensus guidelines for diagnosis and treatment of adults with growth hormone deficiency II, 2007].

Im Arginin-GHRH-Test variieren die Grenzwerte je nach BMI-Wert der Patienten. Bei einem BMI-Wert $< 25 \text{ kg/m}^2$ liegt der Grenzwert des erwarteten GH-Anstieges nach Stimulation bei $< 11 \mu\text{g/l}$, bei einem BMI-Wert zwischen $25\text{-}30 \text{ kg/m}^2$ bei $< 8 \mu\text{g/l}$. Liegt ein BMI-Wert $> 30 \text{ kg/m}^2$ vor, beträgt der Grenzwert des GH-Peaks $< 4 \mu\text{g/l}$ [Consensus guidelines for diagnosis and treatment of adults with growth hormone deficiency II, 2007].

Ein positives Testergebnis in einem der verwendeten Tests reicht zur Diagnosestellung einer GH-Defizienz aus. Gerade traumatische Hirnschädigungen können jedoch erst nach einer längeren Latenzzeit zu einer signifikanten GH-Defizienz führen und daher unmittelbar nach dem Ereignis unauffällige Testergebnisse liefern. In diesem Fall ist eine mehrfache Testwiederholung zur endgültigen Diagnosestellung unverzichtbar. Die Entwicklung von einer suffizienten GH-Produktion hin zu einer schweren GH-Defizienz ist oftmals ein langsamer und kontinuierlicher Prozess und erfordert daher bei Verdacht eine engmaschige Kontrolle. Eine schwere GH-Defizienz ist eine dringende Behandlungsindikation [Consensus guidelines for diagnosis and treatment of adults with growth hormone deficiency II, 2007].

1.2.7. GH-Substitutionstherapie

Nach Indikationsstellung erfolgt die substituierende Behandlung des diagnostizierten GH-Mangels mit rekombinantem humanem GH (hGH).

Der GH-Mangel hat bei Behandlungsbeginn in der Regel schon über einen längeren Zeitraum (oft Jahre) bestanden. Ob die durch prolongierten GH-Mangel entstandenen strukturellen und funktionellen Veränderungen im Organismus durch eine substituierende GH-Therapie allein voll kompensierbar sind, ist nicht klar. Im strengen Sinn würde die GH-Substitutionstherapie bedeuten, dass die Behandlung die physiologische GH-Sekretion qualitativ und quantitativ imitiert. Dies ist bei der aus Praktikabilitätsgründen üblichen einmal täglichen subkutanen Applikationsform jedoch nicht der Fall. Diese einmalige Applikation führt zu einem Anstieg der GH-Konzentration im Blut mit einem Maximum nach ca. 4 Stunden und dem Erreichen des Ausgangsniveaus nach ca. 12 Stunden. Andererseits ist jedoch unklar, ob das natürliche pulsatile Sekretionsmuster für alle GH-Wirkungen gleichermaßen von Bedeutung ist. Unter den genannten Einschränkungen begrenzt sich die Fragestellung nach der richtigen Substitutionstherapie auf die injizierte Tagesdosis und deren Zeitpunkt. Die abendliche Injektion scheint nicht nur besonders praktisch zu sein, was der Compliance bei Langzeittherapie zugute kommt, sondern auch den metabolischen Bedürfnissen des Organismus weitgehend angemessen zu sein.

Die übliche Anfangsdosis bei Erwachsenen liegt bei 0,15-0,3 mg hGH pro Tag. Danach wird schrittweise, gemessen an alters- und geschlechtsspezifische IGF-1-Serumkonzentrationen, die erforderliche Erhaltungsdosis für die Dauertherapie ermittelt. Diese liegt bei Erwachsenen meist bei 0,15-0,70 mg hGH pro Tag. Nur selten werden höhere Dosen benötigt.

Beobachtete Nebenwirkungen der Therapie wie Ödemneigung sowie Muskel- und Gelenkschmerzen treten insbesondere bei zu hoher Dosierung oder zu schneller Dosissteigerung auf. Wegen der erhöhten Inzidenz kolorektaler Karzinome und Schilddrüsenkarzinome bei Patienten mit Akromegalie und der zahlreichen Berichte über ein erhöhtes Risiko für die häufigsten Karzinome (Brust, Dickdarm, Prostata, Lunge) bei Patienten mit einer hohen GH/IGF-1-Konzentration [Cohen et al., 2000; Marchisotti et al., 2005] wurde die Inzidenz von Karzinomen sowie die Rezidivrate von Hypophysentumoren bei Patienten unter GH-Substitutionstherapie

besonders aufmerksam beobachtet. Bisher wurde jedoch kein Hinweis auf ein erhöhtes Karzinom- oder Rezidivrisiko gefunden [Jenkins et al., 2006]. Laut aktueller Datenlage, ist die GH-Substitutionstherapie bei GH-defizienten Patienten nicht bedenklich [Lugner A, 2007].

Da zur Verlaufsbeobachtung der sich ändernden Parameter keine einfachen und leicht zu wiederholenden Messgrößen, wie in der Therapie von Kindern und Jugendlichen die Körperlänge, zur Verfügung stehen, wird die GH-Dosis derzeit individuell nach den gemessenen IGF-1-Serumkonzentrationen im Blut so angepasst, dass dieser im Normbereich für das jeweilige Alter liegt [Nawroth et al., 2001].

Die Bestimmung der IGF-1-Serumkonzentration sollte in der Anfangsphase der GH-Substitutionstherapie in 1-2-monatigen Abständen kontrolliert werden. Nach Erreichen des individuellen Ziel-IGF-1-Wertes ist eine Spiegelbestimmung in 6-12-monatigen Abständen ausreichend. Bei GH-defizienten Patienten, die noch eine andere Substitutionstherapie erhalten, ist bei jeder Dosisänderung dieser Therapie die IGF-1-Serumkonzentration zu kontrollieren [Lugner A, 2007].

Wegen der Komplexität der GH-Wirkungen, der Dauer der Behandlung, der relativen Seltenheit des GH-Mangels in allen Altersstufen und der vielen noch offenen Fragen wird angeraten, betroffene Patienten nur in Zentren mit Erfahrung und eingebunden in ein übergreifendes Qualitätskontrollprogramm zu behandeln [Nawroth et al., 2001].

Nachfolgend wird kurz das laborchemische Prinzip der IGF-1-Bestimmung zur GH-Therapiekontrolle dargestellt. Hierbei handelt es sich um ein radioimmunologisches Verfahren zur Messung von proteingebundenem IGF-1 in der Blutzirkulation.

Durchführung: Abnahme von EDTA-Blut, sofortige Plasmagewinnung, dabei ist eine Extraktion von IGF-1 zur Trennung von seinen 6 Bindungsproteinen (IGFBP 1-6) sinnvoll.

Aussage:

- Normalwerte sind methoden-, alters- und geschlechtsabhängig und nicht standardisiert. Adoleszenten haben Werte, die wie bei der Akromegalie erhöht sind. Anhaltspunkte: Männer unter 40 Jahren 63-80 µg/l, Frauen unter 40 Jahren 113-450 µg/l. Erniedrigte IGF-1-Werte treten bei Mangelernährung, schweren Allgemeininfektionen, Fasten und Hypothyreose auf.
- In der Schwangerschaft ist die Interpretation der IGF-1-Werte aufgrund der stimulierenden Wirkung des in diesem Zustand erhöhten Östrogenspiegels problematisch [Reinwein et al, 2002].

Zahlreiche Studien haben eindeutig gezeigt, dass die GH-Therapie die Körperzusammensetzung verbessert. Die fettfreie Körpermasse wird erhöht und die Körperfettmasse gesenkt, wobei das Körpergewicht mehr oder weniger stabil bleibt [Fassbender et al, 2005; Jørgensen et al., 1989; Salomon et al., 1989; Binnerts et al., 1992; Rosenfalck et al., 2000]. Diese Wirkung ist auch nach einer Behandlungsdauer von 10 Jahren erhalten [Gibney et al., 1999]. Fassbender et al., zeigten in Ihrer Studie 2005 in diesem Zusammenhang eine signifikante Senkung pathologisch erhöhter Leptinspiegel unter hGH-Therapie bei GH-defizienten Patienten als mögliche Erklärungsursache der Veränderung der Körperzusammensetzung unter hGH-Therapie auf [Fassbender et al., 2005].

Außerdem wurde in vielen Studien eine Zunahme der Knochenmineralisation nachgewiesen [Kann et al. 2002; Wilhelm et al., 2004; Binnerts et al., 1992; Kotzmann et al., 1998; Bex et al., 2002, Fassbender et al., 2005]. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass die Knochendichte im ersten Jahr - besonders nach 6 Monaten - deutlich abnehmen kann [Lugner A, 2007; Wilhelm et al., 2004]. Gewöhnlich lässt sich erst im zweiten Behandlungsjahr eine Zunahme der Knochenmineraldichte beobachten, und diese Wirkung setzt sich im dritten und vierten Jahr fort [Lugner A, 2007, Fassbender et al., 2005].

Buchfelder et al. legten in einer 5-Jahres-Beobachtungsstudie 2007 zudem dar, dass eine suffiziente GH-Substitutionstherapie beim GH-defizienten Patienten zu keiner signifikanten Zunahme der Rezidiv- oder Progressrate von hormoninaktiven Hypophysentumoren führt [Buchfelder et al., 2007] und damit, laut aktueller Studienlage, keine Kontraindikation zur hGH-Therapie darstellt.

Eine günstige Wirkung auf das kardiovaskuläre Risikoprofil, Lipid- und Blutzuckerkonzentration, sowie Blutdruck wurde ebenfalls in vielen Studien an Patienten, die eine GH-Substitutionstherapie erhielten, nachgewiesen [Binnerts et al., 1992; Rosenfalck et al., 2000; Al-Shoumer et al., 1998; Colao et al., 2001]. Echokardiographische Untersuchungen ergaben eine Korrektur der GH-Defizienzbedingten Dysfunktionen (reduzierte linksventrikuläre Masse, verminderte Auswurffraktion, pathologische linksventrikuläre diastolische Füllung) unter Therapie [Colao et al., 2001; Fassbender et al., 2005]. Zudem liegen Berichte über eine Abnahme der erhöhten Intima-Media-Dicke in der Carotis und Femoralarterie nach Einleitung einer GH-Substitutionstherapie und über eine Normalisierung der vaskulären Reagibilität bei GH-defizienten Patienten vor [Colao et al., 2001; Pfeifer et al., 1999].

Der endgültige Beweis, dass sich die GH-Therapie nicht nur günstig auf die Surrogatparameter auswirkt, sondern bei GH-defizienten Patienten auch die Lebenserwartung erhöht, steht bis jetzt noch aus [Lugner A, 2007]. Eine Verbesserung der Lebensqualität von GH-defizienten Patienten durch die Therapie konnte jedoch in zahlreichen Studien nachgewiesen werden [Fassbender et al., 2005; Burmann et al., 1995; Hernberg-Ståhl et al., 2001; Mc Gauley et al., 1990].

Pharmako-ökonomische Studien haben auch gezeigt, dass die Patienten nach Einleitung einer GH-Ersatztherapie weniger medizinische Dienstleistungen (Arztbesuche, Krankenhausaufenthalte, Krankschreibungen) in Anspruch genommen haben [Hernberg-Ståhl et al., 2001; Saller et al., 2006]. Somit häufen sich in den letzten 20 Jahren seit Beginn der GH-Substitutionstherapie die Hinweise dafür, dass die GH-Defizienz eine starke Beeinträchtigung für Gesundheit und Allgemeinbefinden der betroffenen Patienten darstellt und nach individueller Indikationsstellung mit der entsprechenden Ersatztherapie behandelt werden sollte [Growth Hormon Research Society, 2000; Lugner A, 2007].

2. Ziel der Untersuchung

Ein Zusammenhang zwischen der individuellen gemessenen Knochendichte sowie Knochenelastizität und dem COLIA1-SP1-Polymorphismus konnte schon in vorangegangenen Studien [Kann et al, 2002; Ralston et al., 2006; Hitraya et al., 1998; Saitta et al., 2000; Chappard et al., 1992; Robinson et al., 1997] mehrfach gezeigt werden. So konnten Ralston et al. 2006 in einer großen Multicenterstudie (n = 20.786) die Assoziation des selteneren TT-Genotypen des COLIA1-SP1-Polymorphismus mit einer reduzierten Knochendichte und Prädisposition zu spontanen osteoporotischen Wirbelkörperfrakturen bei Frauen darlegen [Ralston et al., 2006].

Knochen und Haut bestehen überwiegend aus Kollagen Typ 1. Wenn Veränderungen der Kollagenstruktur im Knochen, assoziiert mit dem COLIA1-SP1-Polymorphismus, einen beschriebenen nachweisbaren Effekt auf die Beschaffenheit des Knochens haben, liegt die Fragestellung nahe, ob sich ein ähnlicher Effekt auch an der Haut nachweisen lässt. Zu dieser Fragestellung wurden bis jetzt unseres Wissens nach noch keinen Daten veröffentlicht. Daher widmet sich diese Studie der Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs des jeweils exprimierten Genotyps des COLIA1-SP1-Polymorphismus mit der individuell benötigte Dosis von subkutan appliziertem hGH bei GH-defizienten Patienten.

Weitere Fragestellung dieser Studie war, ob sich eine Assoziation des COLIA1-SP1-Polymorphismus mit erhobenen klinischen Daten (BMI, Körpergröße, Körpergewicht, Alter) und Befunden (ätiologisch zugrunde liegende Erkrankung des GH-Mangels) aufzeigen lässt.

Vor Bearbeitung dieser Fragestellungen musste jedoch untersucht werden, ob die Verteilung des COLIA1-SP1-Polymorphismus in dem in dieser Studie untersuchten Patientenkollektiv (Erwachsene mit nachgewiesenem GH-Mangel unter rekombinanter humaner Wachstumshormontherapie der deutschen KIMS-Anwendungsbeobachtung) von der Verteilung des COLIA1-SP1-Polymorphismus in der gesunden europäischen Bevölkerung abweicht oder vergleichbar ist.

Nachfolgend werden die untersuchten Fragestellungen in bearbeiteter Reihenfolge dieser Studie noch einmal kurz zusammengefasst:

1. Zeigt sich eine abweichende Verteilung des COLIA1-SP1-Polymorphismus in dem hier untersuchten Patientenkollektiv im Vergleich zur gesunden europäischen Bevölkerung in Konkordanz zum Hardy-Weinberg-Equilibrium?
2. Besteht eine Assoziation des COLIA1-SP1-Polymorphismus mit klinischen Daten und Befunden bei den untersuchten Personen?
3. Besteht ein COLIA1-SP1-Polymorphismus-assoziiertes Effekt auf die individuell benötigte hGH-Dosis bei einer subkutan applizierten hGH-Substitutionstherapie bei GH-defizienten Erwachsenen?

3. Material und Methoden

3.1. Patientenkollektiv

Die deutsche KIMS Pharmacogenetics Study ist eine Unterstudie der Pfizer International Metabolic Study, welche ca. 10 000 erwachsene Patienten mit GH-Mangel unterschiedlicher Ätiologie beobachtet. Ein überwiegender Teil dieses Kollektivs erhält eine hGH-Substitutionstherapie.

Das in dieser Studie untersuchte Patientenkollektiv stammt aus der deutschen KIMS Pharmacogenetics Study. Es handelt sich hierbei um eine prospektive Studie zur Typisierung von Genen der GH-IGF-1-Achse und nachfolgender Hormonachsen. Ein besonderer Fokus der Untersuchung liegt auf der Korrelation unterschiedlicher Genotypen mit differierendem Ansprechen auf hGH unter Therapie und assoziierten Begleiterkrankungen.

Die Genehmigung der deutschen KIMS Pharmacogenetics Study durch eine lokale Ethik-Kommission sowie schriftliche Einwilligungserklärungen jedes untersuchten Patienten liegen vor:

1. Juristisches Gutachten: Gutachten bzgl. Der Zulassung der Errichtung einer DNA-Datenbank 28.04.2000, Anwaltsbüro Straeter, Bürenstraße 33, 53173 Bonn
2. Positives Ethikvotum der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz vom 08.11.2000 des Antrages: "DNA-Bank von Patienten mit Erkrankungen der Hypophyse in KIMS (KABI-International metabolic survey)"
3. Positives Ethikvotum des Fachbereichsrates Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg vom 30.04.2003

Einschlusskriterien der Studie waren die gesicherte Diagnose eines GH-Mangels bei einem Mindestalter von 18 Jahren (im Durchschnitt 50 ± 13 Jahre) und die Indikation zur Behandlung mit hGH nach gültigen Kriterien. Gemäß aktuell gültigen Leitlinien [Growth Hormon Research Society, 2000] wiesen alle Patienten einen kombiniert hypophysären Hormonmangel mit mindestens einer zusätzlichen Defizienz einer hypophysären Achse auf, welche adäquat therapiert wurde.

HGH (in allen Fällen Genotropin®) wurde einmal täglich subkutan injiziert. Die Menge der tägliche applizierten Substanz variierte in Anpassung an alters- und geschlechtsspezifische IGF-1-Serumkonzentrationen des jeweiligen Patienten, welche zentral (Pfizer, Stockholm, Schweden) in einem Labor mit einem Assay bestimmt wurde.

Dem Einschluss in die Studie musste eine mindestens 12-monatige Therapie mit hGH vorangegangen sein. Dadurch konnten anfängliche starke IGF-1-Serumkonzentrations-Schwankungen und Therapieanpassungen in der Studie minimiert werden. Die Auftitration der erforderlichen hGH-Dosis nach alters- und geschlechtsspezifischen IGF-1-Serumkonzentrationen musste beendet sein.

Von 247 Patienten der deutschen KIMS Pharmacogenetics Study lagen Blutproben und damit verwertbares DNA-Material vor. Der Genotyp dieser 247 fortlaufend in die Studie aufgenommenen Patienten wurde bestimmt (Kollektiv 1, siehe unten).

Die klinischen Daten werden unabhängig in mehreren deutschen Zentren gesammelt, die sich an der deutschen KIMS Studie beteiligen (Pfizer International Metabolic Study). Bei 122 (Kollektiv 2, siehe unten) der 247 auf die Genotypform des COLIA1-SP1-Polymorphismus analysierten Patienten wurden alle der oben genannte Einschlusskriterien, einschließlich der IGF-1-Auftitration, gemessen an alters- und geschlechtsspezifische IGF-1-Serumkonzentrationen, erfüllt und es konnten die Daten aus der KIMS Datenbank (Pfizer International Metabolic database) für das Jahr 2005 verwendet werden:

- Geschlecht (weiblich/männlich)
- Ätiologie des GH-Mangels
- Alter (in Jahren)
- Gewicht (kg)
- Größe (cm)
- Body Mass Index (BMI) (Gewicht/Größe²)
- Dosis des täglich applizierten GH (mg pro Tag)
- Dauer der GH-Therapie (in Monaten)
- IGF-1-Serumkonzentration (ng/ml)
- IGF-1 standard deviation score (SDS)
- Quotient aus IGF 1-Serumkonzentration und applizierter GH-Dosis (IGF-1/GH) (ng/ml/mg/d)

Einschlusskriterien Patientenkollektiv 1:

- Manifeste GH-Mangel
- Indikation zur hGH-Therapie gemäß gültigen Leitlinien [Growth Hormon Research Society, 2000]
- Mindestalter von 18 Jahren
- 12-monatige hGH-Therapie vor Einschluss in Studie
- Einverständnis zur Teilnahme an Studie
- Beendigung der Auftitration der erforderlichen hGH-Dosis nach alters- und geschlechtsspezifischen IGF-1-Serumwerten
- Vorliegendes DNA-Material

Einschlusskriterien Patientenkollektiv 2:

Siehe Patientenkollektiv 1, zusätzlich Vorliegen folgender Daten aus der KIMS Datenbank (Pfizer International Metabolic database) für das Jahr 2005:

- Ätiologie des GH-Mangels
- Gewicht (kg)
- Größe (cm)
- Body Mass Index (BMI) (Gewicht/Größe²)
- Dosis des täglich applizierten GH (mg pro Tag)
- Dauer der GH-Therapie (in Monaten)
- IGF-1-Serumkonzentration (ng/ml)
- IGF-1 standard deviation score (SDS)
- Quotient aus IGF1-Serumkonzentration und applizierter GH-Dosis (IGF-1/GH) (ng/ml/mg/d)

3.2. Materialien

Technische Geräte oder Hilfsmittel:

- Thermo Stat plus ; Firma Eppendorf, Hamburg
- RM 5 Assistent 348; Firma Labotec, Wiesbaden
- Vortex-Genie®2; Scientific, Wiesbaden
- Zentrifuge 5417R; Firma Eppendorf, Hamburg
- Mastercycler gradient; Firma Eppendorf, Hamburg
- Mikrowelle; Firma Exquisit
- EC 3000-90; Firma E-C Apparatus Corporation,
- Savant HG 330 Electrophoretic Gel System
- Herafreeze –80 °C; Firma Heraeus Sepatech GmbH
- Video Graphic Printer UP 895-CE; Firma Sony
- Personalcomputer; Firma Max Data 52 x Max
- Universal Hood-SN 75/S; Firma Bio-Rad-Laboratories, Segrate(Milan), Italien
- Schutzbrille; Firma Uvex
- Gelschale

Verbrauchsmaterialien:

- Messbecher 600 ml; Firma Schott Duran, Hofheim am Taunus
- Messbecher 250 ml; Firma Schott Duran, Hofheim am Taunus
- Standarttips 100 µl; Firma Eppendorf, Hamburg
- ep.T.I.P.S. Filter 2-100 µl; Firma Eppendorf, Hamburg
- ep.T.I.P.S. Filter 50-1000 µl; Firma Eppendorf, Hamburg
- ep.T.I.P.S. Standart 50-1000 µl; Firma Eppendorf, Hamburg
- ep.T.I.P.S. Filter 2-20 µl; Firma Eppendorf, Hamburg
- Safe-Lock Tubes PCR-clean 1,5 ml und 2 ml; Firma Eppendorf, Hamburg
- Filterspitzen 1-100 µl, DNA-,RNA-se-Frei, Steril, Firma Ratiolab GmbH
- Q-Tips; Firma Elida Fabergé, Hamburg
- Edding 3000 und Edding 400, permanent Marker, schwarz
- Safe Skin PFE Powder-free Latex-Handschuhe; Firma Kimberly-Clark
- Safe Hand Gloves Latex; Firma Intermedia GmbH, Mainz
- Rotiprotect Nitril-Handschuhe (Ethidiumbromid-beständig); Firma Roth, Karlsruhe
- NobaGlove®-Nitril puderfrei; Firma NOBA Verbandmittel Danz GmbH und Co KG, Wetter
- Kleenex facial tissues; Firma Kimberly-Clark

Chemikalien:

- Erylyse: 109,5 g Sucrose (Sacharose; Firma Merck, Darmstadt) in 600 ml H₂O
10 ml Triton-X-100 (Firma Behring)
100 ml 0,5 M Na₂EDTA (Firma Roth, Karlsruhe)
auf 1000 ml auffüllen
- Lysin-Puffer
- Protease K-Solution ; Firma Invitrogen™life technologies
- SDS-10 %; Firma Gibco BRL
- Chloroform/Trichlormethan; Firma Roth, Karlsruhe
- Isoamyl-Alkohol C₅H₁₂O; Firma Sigma®
- Na-Acetat; Firma Calbiochem

- 100 % Ethanol absolut; Firma Riedel-de-Häen@Laborchemikalien GmbH&Co
- 70 % Ethanol; Firma Roth, Karlsruhe
- TE⁻⁴; Firma Roth, Karlsruhe
- PCR-Mix: Red Taq Ready Reaction Mix PCR; Firma Sigma®
- steriles H₂O, Aqua inieciabile; Firma Braun-Melsungen-AG, Melsungen
- 10 x und 1x TBE (Trisaminomethan-Borat-Ethyldiamin-Tetraessigsäure) Firma Gibco BRL
- VDR FOK Primer; (synthesed by GIBCO BRL) Firma Genterprise GmbH, Mainz
 SP1 Forward: 5'-TAACTTCTGGACTATTTGCGGACTTTTTGG-3'
 SP1 Reverse: 5'-GTCCAGCCCTCATCCTGGCC-3'
- Restriktionsenzyme MSC1 Ro534L 3,000 U/ml, Recombinant; Firma Biolabs Inc., New England
- Blue Orange Loading Dye; Firma Promega
- 1 kb DNA-Ladder; Firma Promega
- NuSieve® 3:1 Agarose; Firma FMC-Bio Products, Rockland, Maine, USA
- Ethidiumbromid 1 %-Lsg (10 mg/ml); Firma Roth, Karlsruhe
- Sterilium zur Hände-Desinfektion; Firma Bode

3.3. Methoden

Zur Darstellung des COLIA1-SP1-Polymorphismus der Studienpatienten mussten wir vorab deren genetisches Material gewinnen. Hierzu wurde aus dem zugesandtem EDTA-Blut DNA der Patienten isoliert und mittels PCR vervielfältigt. Danach konnten die unterschiedlichen Genotypen des COLIA1-SP1-Polymorphismus (GG, GT, GT) mit Hilfe einer Gel-Elektrophorese aufgetrennt und abgelesen werden. Nachfolgend sind die unterschiedlichen Verarbeitungsschritte kurz in Reihenfolge des Laborablaufes aufgeführt:

DNA-Isolierung:

Zell-Lyse:

- Schritt 1: Auftauen des tiefgefrorenem EDTA-Blutes der Patienten und Beschriften von 2 ml Safe-Lock-Eppendorf-Tubes mit Patientennummern
- Schritt 2: 1000 µl Patienten-EDTA-Blut
+1000 µl Erylyse, Lagerung bis zur Benutzung auf Eis
(Zusammensetzung siehe 3.3), jeweils in ein 2 ml Safe-Lock-Gefäß pipettieren
- Schritt 3: Inkubation im Thrombostat für 3 Stunden bei – 4 °C
- Schritt 4: Bei 0 °C und 14000 U 10 Minuten lang zentrifugieren
- Schritt 5: Überstand mit 1000 µl- DNA-Pipette abpipettieren und am Boden gelegenes Pellet in 1000 µl Erylyse resuspendieren
- Schritt 6: Vorgang aus Schritt 5 mind. 3 x wiederholen bis Lös. hellrosa erscheint
- Schritt 7: Bei 0 °C und 14000 U 10 Minuten lang zentrifugieren
- Schritt 8: Überstand mit 1000 µl DNA-Pipette abpipettieren
- Schritt 9: 500 µl Lysinpuffer
+15 µl Protease K
+60 µl SDS-10 % in jedes Gefäß zugeben und leicht mischen
- Schritt 10: Bei 65 °C über Nacht inkubieren

Extraktion:

- Schritt 1: 500 µl Buffer-Saturated-Phenol pro Probe hinzugeben
- Schritt 2: 2 Minuten mischen
- Schritt 3: Bei 0 °C und 14000 U 10 Minuten lang zentrifugieren
- Schritt 4: jeweils 3x 1,5 ml Safe-Lock-Eppendorf-Tubes pro Patientenprobe mit Patientenummer beschriften
- Schritt 5: Weißlichen Überstand der Proben in eines der beschrifteten Gefäße abpipettieren
- Schritt 6: 500 µl Chloroform-Isoamyl-Alkohol
(Lagerung bis zur Benutzung auf Eis)
Mischungsverhältnis: 24:1 ; d.h. 23 ml Chloroform + 1 ml Isoamyl-Alkohol
- Schritt 7: 2 Minuten mischen

Schritt 8: Bei 0°C und 14000 U 10 Minuten lang zentrifugieren

Schritt 9: weißlichen Überstand in jeweils 2. vorbereitetes Gefäß abpipettieren

Replikation:

Schritt 1: 60 µl Na-Acetat pro Probe hinzugeben und vorsichtig mischen

Schritt 2: 1000 µl Ethanol absolut 100 % hinzugeben und kräftig schütteln

Schritt 3: In ein vorbereitetes Gefäß jeweils 1000 µl Ethanol 70 % vorlegen

Schritt 4: Sichtbaren DNA-Faden aus 2. Gefäß mit einer sterilen Pipettenspitze entnehmen und in 3. vorbereitetes Gefäß mit Ethanol 70 % geben

Schritt 5: Bei 0°C und 14000 U 10 Minuten lang zentrifugieren

Schritt 6: Klaren Überstand mit 1000 µl DNA-Pipette abpipettieren und verwerfen
evt. Ethanol-Rückstände vorsichtig mit Q-Tips aufnehmen, sodass nur der sichtbare DNA-Faden im Gefäß verbleibt

Schritt 7: 200 µl TE⁻⁴ hinzugeben

Schritt 8: Bei 37°C 1 Stunde lang im Thrombostaten inkubieren

Schritt 9: siehe Punkt 4.2 Lagerung bei - 80 °C

Kryokonservierung der isolierten DNA:

Die, wie in Punkt 4.1 beschrieben, isolierte DNA wurde bei -80°C in einer Tiefkühltruhe bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Diese Tiefkühltruhe ist alarmgesichert und gewährleistet durch Anschluss an ein Notstromaggregat permanente Temperaturkontrolle.

Replikation der isolierten DNA mittels PCR:

Prä-PCR:

Vorbereitungen:

- Zentrifuge auf 0°C vorkühlen
- Thrombostaten auf 37°C vorheizen
- Cycler einstellen: Deckel (Lid) auf 105°C, Block (Incubate) auf 94°C einstellen
- PCR-Reaktionsgefäße mit Patientenummer beschriften
- Reagenzien auftauen
- 1 Negativkontrolle (Mix ohne DNA) und 1 Positivkontrolle (gutes PCR-Ergebnis in vorangegangenen Durchläufen) beschriften

Herstellen des PCR-Mix:

12,5 µl REDTaq Ready Mix

2 µl Forward Primer

5'-TAACTTCTGGACTATTTGCGGACTTTTTGG-3'

2 µl Reverse Primer

5'-GTCCAGCCCTCATCCTGGCC-3'

10 µl isolierte DNA

6,5 µl steriles H₂O

insgesamt 27 µl in jeweils ein beschriftetes PCR-Reaktionsgefäß pipettieren.

Jedes PCR-Reaktionsgefäß gut verschließen und im vorgeheizten Cycler inkubieren.

Einstellung des Thermocyclers:

Aufheizen des Cyclers auf 96 °C für 5 Minuten

- Temperaturabfolge: 94 °C → 60 °C → 72 °C für jeweils 40 Sekunden
- Wiederholung der Temperaturabfolge über 35 Cyclen
- 72 °C über 5 Minuten
- Lagerung der PCR-Produkte im Cycler bei 4 °C

Digestion:

Vorbereitung:

Auftauen von Restriktionsenzymen, Puffer, Leiter-DNA, Ladepuffer und Aqua dest. steril

Schritt 1: Restriktionslösung herstellen und für 29 Proben (5 Proben als Reserve im Überschuss herstellen) berechnen:

Pro Probe: 1,8 µl NE Buffer 4

+ 1 µl MSCI Restriktionsenzyme in 0,2 ml Eppendorfhütchen mischen

Gesamtmenge + Überschuss: 52,2 µl Puffer + 29 µl Restriktionsenzyme

Schritt 2: 2,8 µl hergestellte Restriktionslösung (pro DNA-Probe) zum PCR-Mix hinzugeben

Schritt 3: Inkubation im Thrombostaten bei 37 °C für 30 Minuten

Gel-Elektrophorese der replizierten DNA:

Vorbereitung:

Schritt 1: Flächen desinfizieren

Schritt 2: Gelkammer zusammenstecken

Schritt 3: Herstellung der Leiter-DNA:

5 µl Leiter-DNA

+ 2,5 µl Lade-Puffer

+ 7,5 µl Aqua dest., steril

Gel-Herstellung:

Schritt 1: 3 g NuSieve 3:1 Agarose + 100 ml 1x TBE + 5 µl Ethidiumbromid in Erlenmeyerkolben mischen

Schritt 2: Erwärmung in der Mikrowelle bis Flüssigkeit klar ist

Schritt 3: Mehrmals kurz aufkochen, danach etwas abkühlen lassen

Schritt 4: Luftblasenfrei in die vorbereitete Gelkammer gießen

Schritt 5: Kämme in die Gelkammer stecken

Schritt 6: Gel ca. 30 Minuten lang aushärten lassen

Schritt 7: Gel in der Gelwanne in das Elektrophorese-Bad geben und mit 1x TBE-Flüssigkeit bedecken (Flüssigkeitsspiegel mind. 1 cm über Gel)

Gel Belegung:

Belegung des Gels von links nach rechts in der Reihenfolge:

7 µl Leiter-DNA → jeweils 7 µl PCR-Produkt der Patientenproben → 7 µl Positiv-Kontrolle → 7 µl Negativ-Kontrolle → 7 µl Leiter-DNA

Gel-Elektrophorese:

Die Produkte aus der PCR wurden nun in dem horizontalen 1%igen ethidiumbromidhaltigen Agarosegel in einer mit Trisaminomethan-Borat-Ethyldiamin-Tetraessigsäure Puffer gefüllten Laufkammer elektrophoretisch aufgetrennt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 150 Volt und einer maximalen Stromstärke von 200 mAmpere und 27 Watt für ca. 50 Minuten. Die Visualisierung und Dokumentation erfolgte basierend auf der Wechselwirkung von doppelsträngiger DNA mit Ethidiumbromid und dessen Fluoreszenz unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm (Abb. 1.3.).

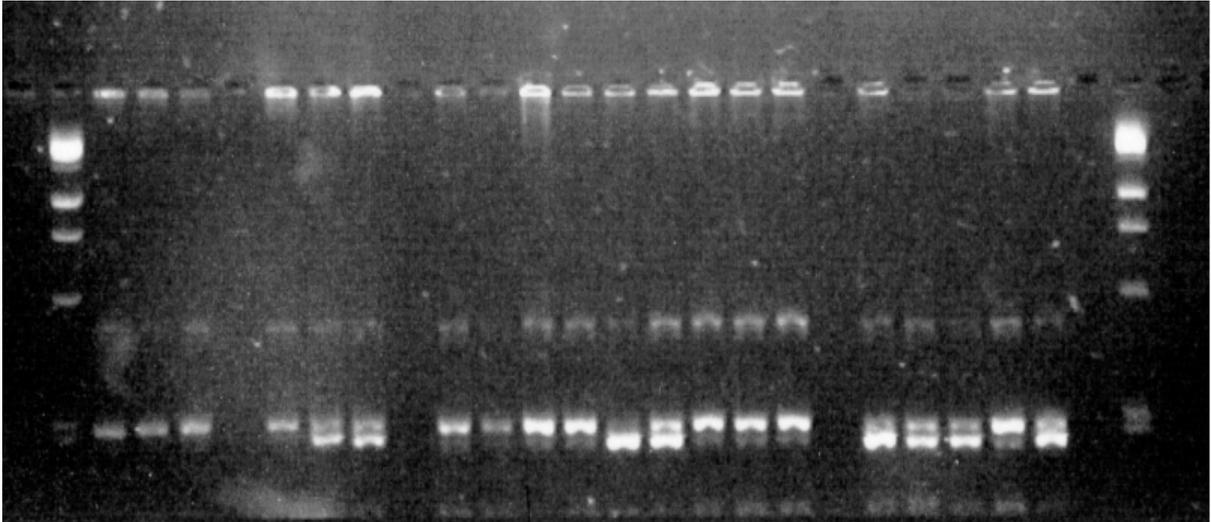


Abb. 1.3.: Ergebnis der Gel-Elektrophorese der unterschiedlichen Genotypen im ausgewählten Beispiel

In der in Abb. 1.3. exemplarisch gezeigten Darstellung der Gel-Elektrophorese zeigt sich 12 mal der Genotyp GG (60% bei 20 verwertbaren Proben, erkennbar an der einheitlichen Endlinie mit verkürzter Laufstrecke z.B. 2. von rechts nach Eichlinie), 7 mal der Genotyp GT (35%, erkennbar an der geteilten Endlinie der zwei Allel-Typen G und T, z. B. 1., 3., 4. von rechts nach Eichlinie) und lediglich 1 mal der Genotyp TT (5%, z.B. 10. von rechts nach Eichlinie).

3.4. Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden erstellt unter Benutzung von SPSS für Windows (11.5; SPSS-Inc., Chicago, USA).

Die Verteilung der Genotypen wurde mittels des Hardy-Weinberg Equilibriums (Chi-Quadrat-Test) mit Hilfe des HWE-Statistikprogrammes untersucht.

Im Falle von nicht normal verteilten Daten (z. B. applizierte GH-Dosis, Behandlungsdauer, IGF-1/GH-Quotient) wurden als nichtparametrische Tests der Mann-Whitney-U-Test und die Kruskal-Wallis-Analyse verwendet. Normal verteilte Daten wurden mithilfe des parametrischen t-Tests für unverbundene Stichproben analysiert. Hierbei wurden jeweils Mittelwert und Standardabweichung der Daten berechnet. Zur Berechnung von Korrelationen diente der Koeffizient nach Spearman. Ein p-Wert von ≤ 0.05 wurde als signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1. Verteilung des COLIA1-SP1-Polymorphismus im Patientenkollektiv im Vergleich zur gesunden europäischen Bevölkerung

Die COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotyp Frequenzen der untersuchten 247 Patienten unterliegen dem Hardy-Weinberg Equilibrium ($p=0,337$). So wurden bei 158 Patienten des Untersuchungskollektives der homozygote Genotyp GG (entspricht 64 % der Anzahl der untersuchten Patienten), bei 76 Patienten der heterozygote Genotyp GT (entspricht 30,7 % der Anzahl der untersuchten Patienten) und bei 13 Patienten der homozygote Genotyp TT (entspricht 5,3 % der Anzahl der untersuchten Patienten) generiert.

Die Allel-Frequenz für das G-Allel beträgt 79,4 %, für das T-Allel 20,6 %.

Quelle	n (%)	GG (%)	GT (%)	TT (%)
Kollektiv 1	247 (100)	158 (64)	76 (30,7)	13 (5,3)
Kann et al.	740 (100)	477 (64,5)	233 (31,4)	30 (4)
Nguyen et al.	677(100)	433 (63,9)	210 (31)	34 (5)
Ralston et al.	248 (100)	160 (64,5)	74 (29,8)	14 (5,6)

Tab. 1.8.: Verteilung der Genotypen im gesamten Untersuchungskollektiv (Kollektiv 1) gegenüber der Normalbevölkerung [Kann et al., 2002, Ralston et al., 2006; Nguyen et al., 2005]

In diesem Patientenkollektiv zeigte sich eine vergleichbare Verteilung der COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotypen (GG; GT, TT) im eingeschlossenen Patientenkollektiv zu vorangegangenen Studien [Kann et al., 2002, Ralston et al., 2006; Nguyen et al., 2005]. Die Patienten aller hier angeführten Studien stammen aus Europa. Das Kollektiv, welches Kann et al. 2002 analysierten, stammte aus Holland. Ralston et al. rekrutierten für seine Studie 2006 Patienten aus verschiedenen europäischen Ländern. Das Untersuchungskollektiv von Nguyen et al. 2005 wurde überwiegend aus dem kaukasischem Raum zusammengestellt.

Zur weiteren statistischen Analyse erfüllten jedoch nur von 122 der 247 typisierten Patienten die Einschlusskriterien (siehe Punkt 5) und konnten alle notwendigen Daten nachweisen.

Die Genotyp Frequenzen dieser 122 Patienten liegen grenzwertig außerhalb des Hardy-Weinberg Equilibriums ($p=0,048$). Der GG-Genotyp findet sich hier in 77 Fällen (63,1 %), der TT-Genotyp in 10 Fällen (8,2 %) und der GT-Genotyp in 35 der 122 untersuchten Patienten (28,7 %). Die Allel-Frequenz in dieser Gruppe beträgt 77,5 % für das G-Allel und 22,5 % für das T-Allel.

Die Genotypverteilung und die Häufigkeiten der ermittelten Allel-Frequenzen im untersuchten Patientenkollektiv (Kollektiv 2) entspricht anerkannten veröffentlichten Studien [Kann et al., 2002; Ralston et al., 2006; Nguyen et al., 2005].

Quelle	n (%)	GG (%)	GT (%)	TT (%)
Kollektiv 2	122 (100)	77 (63,1)	35 (28,7)	10 (8,2)
Kann et al.	740 (100)	477 (64,5)	233 (31,4)	30 (4)
Nguyen et al.	677(100)	433 (63,9)	210 (31)	34 (5)
Ralston et al.	248 (100)	160 (64,5)	74 (29,8)	14 (5,6)

Tab. 1.9.: Verteilung der Genotypen des fortführend analysierten Patientenkollektivs (Kollektiv 2) gegenüber der Normalbevölkerung [Kann et al., 2002; Ralston et al., 2006; Nguyen et al., 2005]

4.2. Assoziation mit klinischen Befunden

Die unterschiedlichen Ätiologien des Wachstumshormonmangels im Gesamtkollektiv und in den unterschiedlichen COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotypgruppen zeigt Tabelle 1.10..

COLIA1-SP1-Genotypen					
Ätiologie	Gesamt	GG	GT	TT	p-Wert*
n (%)	122 (100)	77 (63,1)	36 (28,7)	10 (8,2)	0.107*
Adenom	72 (59,0)	40 (51,9)	25 (71,4)	7 (70,0)	
Kraniopharyngeom	17 (13,9)	12 (15,6)	4 (11,4)	1 (10,0)	
Idiopathisch / Angeboren	10 (8,2)	8 (10,4)	2 (5,7)		
Sheehan Syndrom	5 (4,1)	3 (3,9)	1 (2,9)	1 (10,0)	
Trauma	4 (3,3)	2 (2,6)	2 (5,7)		
Andere Ätiologien**	14 (11,5)	12 (15,6)	1 (2,9)	1 (10,0)	

Tabellen-Legende:

* p-Wert für unterschiedliche COLIA1-SP1-Genotypen (Kruskal-Wallis)

**Andere Ätiologien:

- GG: Clivus Chordom, Empty Sella, Enzephalitis, Epidermoidzyste, Hamartom, intra-/suprasellärer Abszess, limbozytäre Hypophysitis (n=2), Rathke Zyste (n=2), unbekannt (n=2)

- GT: Rathke Zyste

- TT: Bestrahlung

Tab. 1.10.: Ätiologien des GH-Mangels bei 122 Patienten in Abhängigkeit von ihren COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotypen

Hierbei zeigte sich bei 59 % aller 122 untersuchten Patienten Hypophysenadenome als ursächliche Erkrankung des GH-Mangels. Selektiert auf die verschiedenen Genotypen des COLIA1-SP1-Polymorphismus betrachtet, liegt der errechnete Prozentsatz eines Adenoms als ursächliche Erkrankung teilweise noch höher (GT 71,4 %, TT 70,0 %). Tumoren aller Art zusammengefasst (in diesem Kollektiv Hypophysenadenome und Craniopharyngiome) waren ursächlich in 72,9 % der untersuchten Fälle für den GH-Mangel.

Als zweithäufigste Ätiologie nach Tumoren jeder Art ist eine angeborene oder idiopathische Genese zu benennen. Seltener Ursachen des GH-Mangels waren die postpartale Nekrose des Hypophysenvorderlappens im Rahmen eines Sheehan-Syndroms (Gesamt 4,1 %, GG-Genotypen 4,1 %, bei GT 3,9 % und bei TT 10 %, jedoch bei einer Stückzahl von 10) und die traumatische Genese (Gesamt 3,3 %, GG 2,6 %, GT 5,7 %, TT keine).

Beim Vergleich der ätiologischen Grunderkrankung des GH-Mangels bei den verschiedenen COLIA1-SP1-Polymorphismen (GG vs. GT vs. TT) zeigte sich im untersuchten Kollektiv jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,107$) in der Ursachenzusammensetzung (Tab. 1.10.).

Allgemeine Patientenmerkmale, wie Alter, Geschlecht, Gewicht, Größe und BMI des kompletten Kollektivs, sowie unterteilt nach einzelnen Genotypen, sind in Tabelle 1.11. dargestellt.

Es zeigten sich hier in keinem der genannten Merkmale signifikante Unterschiede zwischen den COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotypen.

Es lag ein nahezu ausgeglichenes Geschlechterverhältnis vor (Männer 54,1 %, Frauen 45,9 %). Das Durchschnittsalter der in dieser Studie eingeschlossenen Patienten lag bei 50 ± 13 Jahren. Sowohl Größe, als auch Körpergewicht lagen im europäischen Normbereich dieser Altersgruppe (Körpergröße $169,9 \pm 9$ cm mit $p=0,065$, Körpergewicht $84,7 \pm 16,9$ kg, $p=0,139$ mit einem durchschnittlichen BMI-Wert der Patienten von $29,3 \text{ kg/m}^3$, $p=0,885$) [Ohlsson et al., 1998; Kromeyer-Hauschild et al., 2007; Glaesmer et al., 2002].

COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotypen					
Anthrop. Merkmale	Gesamt	GG	GT	TT	p-Wert*
n (%)	122 (100)	77 (63,1)	36 (28,7)	10 (8,2)	0.048 [†]
Geschlecht					0.117 [°]
- Männer	66 (54,1)	37 (48,4)	21 (60)	8 (80)	
- Frauen	56 (45,9)	40 (51,9)	14 (40)	2 (20)	
Alter (Jahren)	$50,0 \pm 13,0$	$49,2 \pm 13,0$	$52,0 \pm 13,6$	$49,7 \pm 11,0$	0.571*
Gewicht (kg)	$84,7 \pm 16,9$	$82,9 \pm 16,0$	$86,1 \pm 18,8$	$93,7 \pm 14,7$	0.139*
Größe (cm)	$169,9 \pm 10,2$	$166,6 \pm 10,2$	$170,9 \pm 9,9$	$176,3 \pm 9,4$	0.065*
BMI (kg/m ²)	$29,3 \pm 5,4$	$29,1 \pm 5,4$	$29,4 \pm 5,8$	$30,1 \pm 4,7$	0.865*

Tabellen-Legende:

Werte (ausgenommen Geschlecht) sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD))

[†] p-Wert (Hardy-Weinberg-Equilibrium)

* p-Wert (Kruskal-Wallis)

[°] p-Wert (One-Way-Anova)

Tab. 1.11.: Anthropometrische Merkmale der Patienten bezogen auf die unterschiedlichen COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotypen

Diese Ergebnisse erwiesen sich auch als konstant bei der Gegenüberstellung der GG-homozygoten Genotypen versus einer T-Allel exprimierenden Genotyp Gruppe, bestehend aus den GT-heterozygoten Genotypen und den TT-homozygoten Genotypen (Tabelle 1.12.).

COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotypen			
Anthrop. Merkmale	GG-Homozygote	GT und TT kombiniert	p-Wert*
n (%)	77 (63,1)	45 (36,9)	
Geschl. Männer (%),/ Frauen (%)	37 (48,1) / 40 (51,9)	29 (64,4) / 16 (35,6)	0.081*
Alter (Jahren) ^a	49,2 ± 13,0	52,0 ± 13,0	0.349'
Gewicht (kg) ^a	82,9 ± 16,0	87,7 ± 18,1	0.139'
Größe (cm) ^a	166,6 ± 10,2	172,1 ± 10,0	0.069'
BMI (kg/m ²) ^a	29,1 ± 5,4	29,5 ± 5,6	0.706'

Tabellen-Legende:

^a Mittelwerte ± Standardabweichung (SD)

[°] Mediane ± Standardfehler

Tab. 1.12.: Anthropometrische Merkmale in Bezug auf die COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotyp Gruppen (GG-Homozygote vs. GT-Heterozygote plus TT-homozygote Genotypen)

GH-Therapie bedingte Merkmale in Bezug auf die unterschiedlichen COLIA1-SP1-Genotypen sind in den Tabellen 1.13. und 1.14. dargestellt. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede der IGF-1-Serumkonzentration (Gesamt $181,1 \pm 83,0$ ng/ml³ mit einem p-Wert von 0,991, GG vs. TT $p=0,984$), IGF-1-SDS-Werte (Gesamt $0,5 \pm 0,3$ mit $p=0,731$, GG vs. TT $p=0,786$) und der Dauer der hGH-Therapie in Monaten zwischen den drei Genotypgruppen (Durchschnitt Gesamt $64,0 \pm 2,9$ mit $p=0,206$, GG vs. TT $p=0,780$).

Bei der Betrachtung der IGF-1/GH-Ratio konnten jedoch statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen des COLIA1-SP1-Polymorphismus (GG, GT, TT) aufgezeigt werden. Diesen Ergebnissen widmet sich der nächste Abschnitt dieses Ergebnisteiles (6.3.).

COLIA1-SP1- Polymorphismus- Genotypen						
GH-Ther. bez. Merkm.	Gesamt	GG	GT	TT	p-Wert*	GG vs. TT
GH-Therapie Dauer (Monate) ^ε	64,0 ± 2,9	60,0 ± 3,6	76,0 ± 0,4	58,5 ± 11,2	0.206*	0.708°
hGH-Dosis (mg/Tag) ^ε	0,4 ± 0,02	0,4 ± 0,03	0,3 ± 0,04	0,2 ± 0,03	0.049*	0.026°
IGF-1-Serumkonz. (ng/ml) ¹	181,1 ± 83,0	180,4 ± 85,1	182,7 ± 89,3	180,9 ± 44,2	0.991 ^a	0.984"
IGF-1-SDS ¹	0,5 ± 1,3	0,4 ± 1,4	0,6 ± 1,2	0,5 ± 0,7	0.731 ^a	0,786"
IGF-1/GH ^ε	503,8 ± 44,1	460,0 ± 60,1	568,0 ± 72,1	842,5 ± 101,3	0.05*	0.036°

Tabellen-Legende:

¹ Mittelwert ± Standardabweichung (SD)

^ε Median ± Standardfehler (SEM)

* p-Wert (Kruskal-Wallis-Test)

° p-Wert (Mann-Whitney-U-Test)

^a p-Wert (One-Way-Anova)

" p-Wert (t-Test für unverbundene Stichproben)

Tab. 1.13.: GH-Therapie bezogene Merkmale in Bezug auf die COLIA1-SP1-
Polymorphismus-Genotypen

In Tab. 1.14. wurden noch einmal die Genotyp-Gruppen homozygot GG versus GT und TT kombiniert gegenübergestellt.

COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotypen			
GH-bedingte Merkmale	GG-Homozygote	GT und TT kombiniert	p-Wert*
n (%)	77 (63,1)	45 (36,9)	
Dauer der GH-Therapie (Monate) ^o	60,0 ± 3,6	71,0 ± 4,9	0.198*
hGH-Dosis (mg/Tag) ^o	0,4 ± 0,03	0,2 ± 0,03	0.026*
IGF-1-Serumkonzentration (ng/ml) ^a	180,4 ± 85,1	182,3 ± 80,1	0.903'
IGF-1-SDS ^a	0,4 ± 1,4	0,6 ± 1,1	0.441'
IGF-1/GH ^o	460,0 ± 60,1	650,0 ± 60,3	0.028*

Tabellen-Legende:

* p-Werte (t-Test für unverbundene Stichproben)

' p-Werte (Mann-Whitney-U-Test)

Tab. 1.14.: GH-bedingte Merkmale in Bezug auf die COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotyp Gruppen (GG-Homozygote vs. GT-Heterozygote plus TT-homozygote Genotypen)

4.3. GH-Therapie assoziierte Merkmale in Abhängigkeit vom COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotyp

Bei der Analyse der drei Genotypen (GG, GT, TT) mit Hilfe der Kruskal-Wallis-Analyse zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede in der Menge des verabreichten hGH ($p=0,049$) und in der IGF-1/GH-Ratio ($p=0,05$).

Genauer betrachtet bedeutet dies, dass die GG-homozygoten-Genotypen mit einer signifikant höheren hGH-Dosis behandelt werden mussten als die TT-homozygoten-Genotypen (GH-Dosis bei den GG-Genotypen $0,4 \pm 0,03$ mg/d (Mittelwert \pm Standardabweichung), TT $0,2 \pm 0,03$ mg/d (Mittelwert \pm Standardabweichung), p-Wert GG vs. TT $p=0,026$; Gesamt $0,049$; Tab. 1.14., sowie graphisch Abbildung 1.4.) bis zum Erreichen der alters- und geschlechtsspezifischen IGF-1-Serumkonzentration. Die GT-heterozygoten-Genotypen benötigten eine hGH-Dosis ($0,4 \pm 0,03$ mg/d), die zwischen den hGH-Dosen der GG- und der TT-Genotypen lag.

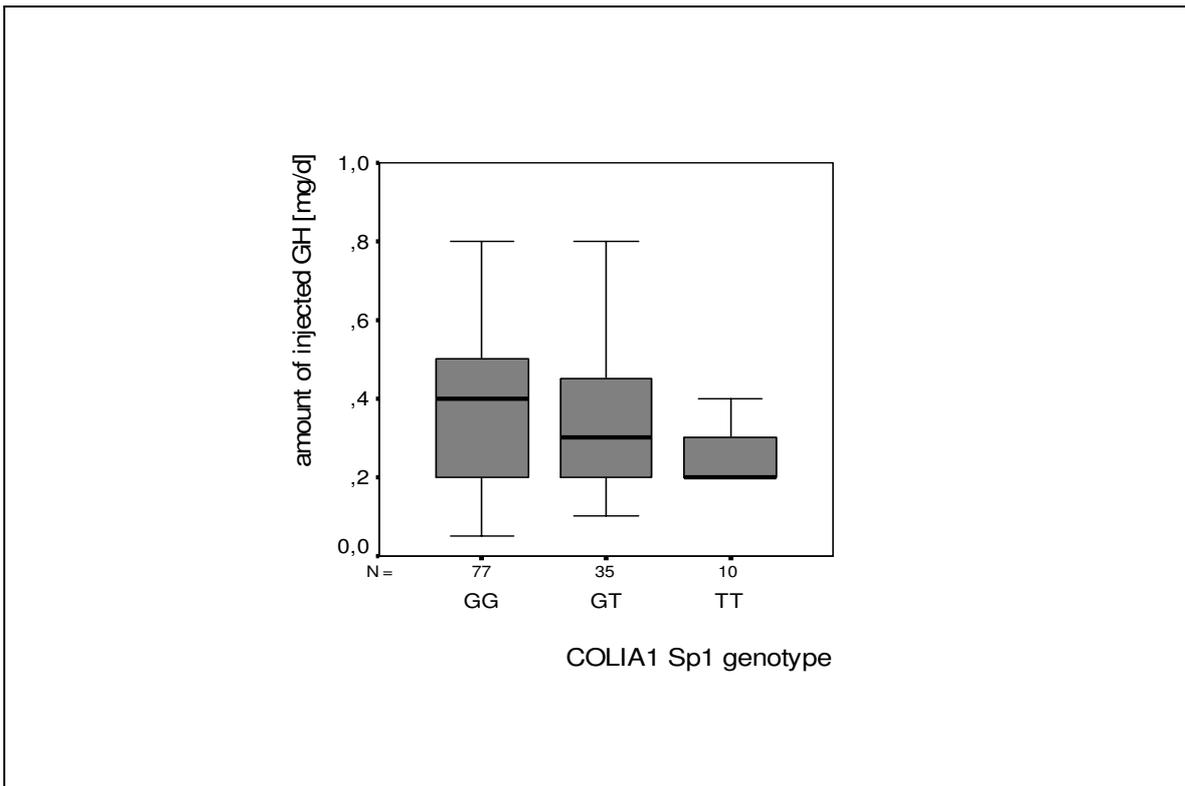


Abb. 1.4.: Dosis an injiziertem hGH bei den unterschiedlichen Genotypen

Dementsprechend war die IGF-1/GH-Ratio bei den GG-homozygoten-Genotypen signifikant niedriger als bei den TT-homozygoten-Genotypen (IGF-1/GH-Ratio beim GG-Genotypen $480 \pm 60,1$, bei TT-Genotypen $842,5 \pm 101,3$, $p=0,036$). Dies bedeutet, dass die GG-homozygoten-Genotypen eine höhere Dosis an hGH benötigten, um vergleichbare IGF-1-Serumkonzentrationen (gemäß alters- und geschlechtsspezifischen Normwerten) wie bei den TT-homozygoten-Genotypen zu erreichen (Abbildung 1.5.). Es zeigten sich hier Werte der GT-heterozygoten-Genotypen, die zwischen den GG- und TT-homozygoten-Genotypen lagen (IGF-1/GH-Ratio $588,0 \pm 72,1$).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei einer Gegenüberstellung der GG-homozygoten-Genotypen mit der T-Allel exprimierenden Genotypgruppe (GT, TT) (Tabelle 1.14.).

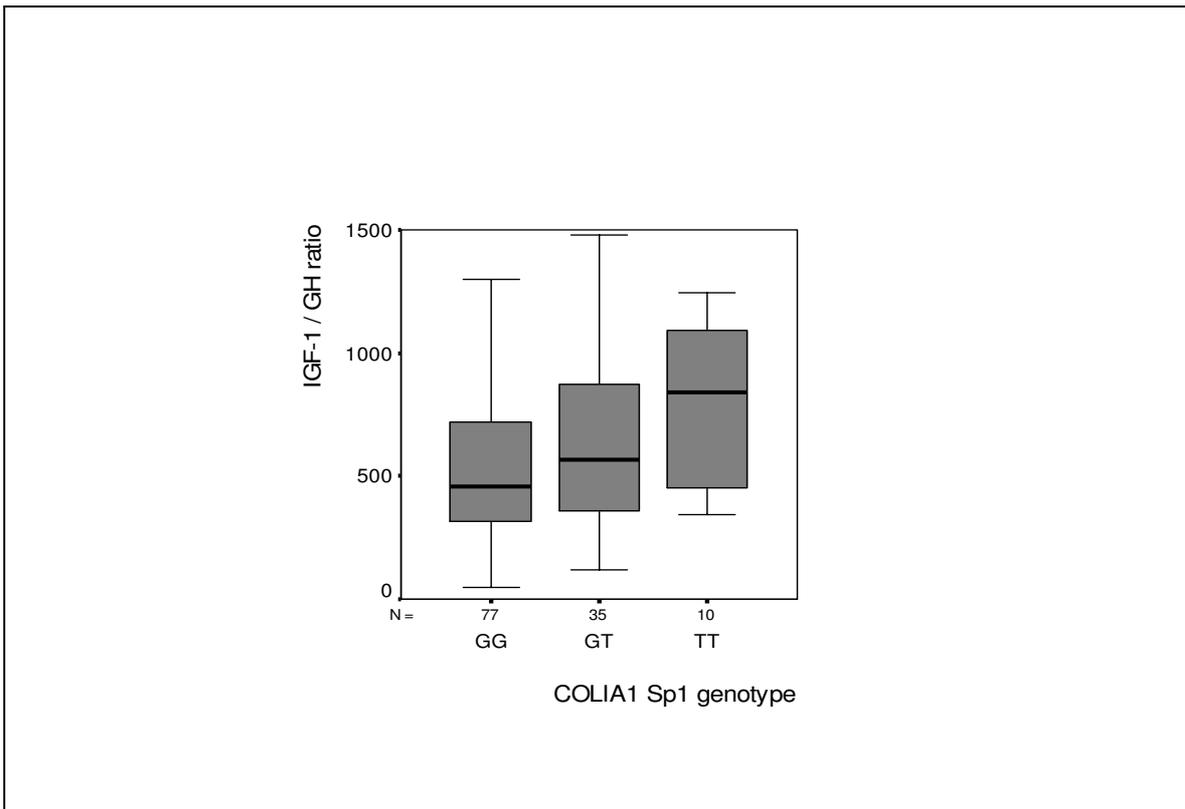


Abb. 1.5.: IGF-1/GH-Ratio bei den unterschiedlichen COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotypen

4.4. Korrelation zwischen anthropometrischen und GH-Therapie assoziierten Merkmalen

IGF-1-Serumkonzentration, IGF-1-SDS-Werte und die IGF-1/GH-Ratio korrelieren nicht signifikant mit Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht oder BMI der Patienten (Korrelationskoeffizient nach Spearman < 0.3).

Die Menge an verabreichtem hGH korrelierte ebenfalls nicht mit Geschlecht, Größe, Gewicht oder BMI, stand jedoch in negativer Beziehung zum Alter der Patienten (Korrelationskoeffizient nach Spearman -0.34 , $p=0,000$). Ältere Patienten benötigten niedrigere Dosen an hGH, wahrscheinlich aufgrund der physiologisch niedrigeren IGF-1-Serumreferenzwerte mit zunehmendem Alter. Die Dauer der GH-Therapie zeigte keinen statistisch signifikanten Bezug zu der applizierten hGH-Menge ($p=0,621$), der IGF-1 Serumkonzentration ($p=0,106$), den IGF-1 SDS-Werten ($p=0,933$) oder der IGF-1/GH-Ratio ($p=0,515$).

5. Diskussion

Die individuelle Ansprechbarkeit auf subkutan applizierte Substanzen und Hormone ist, nicht zuletzt durch den vielfältigen Einfluss exogener Faktoren, noch sehr wenig verstanden.

Einer der meist diskutierten exogenen Faktoren in der Fachliteratur bezüglich der Absorption subkutan applizierter Substanzen ist die Dicke des subkutanen Fettgewebes. So zeigte sich zum Beispiel bei Patienten, die eine kontinuierliche Peritonealdialyse benötigen, die Möglichkeit einer Dosisreduktion von täglich subkutan appliziertem Erythropoetin in Korrelation mit der individuellen eingeschränkten Hautfaltendicke sowie der Applikationsfrequenz des Erythrozyten-stimulierenden Medikamentes. Bei Patienten, die eine tägliche Injektion von Erythropoetin erhielten, wurde die Hautdicke des abdominalen Gewebes gemessen. Bei Patienten mit einer stark verminderter Hautfaltendicke (≤ 20 mm im Maximum) konnte die Dosis des Erythropoetins zur Behandlung der renalen Anämie bei gleicher Hb-Wirksamkeit um 36 ± 8 % reduziert werden [Brahm M, 1999]. In dieser Studie konnte daher der Einfluss der Hautdicke auf die benötigte Dosis subkutan applizierter Medikamente bestätigt werden.

Birkebaek et al. beschrieb die Unterschiede der Dicke der Kutis und Subkutis von Insulin-Injektionsstellen bei Kindern mit Diabetes mellitus Typ I. Dabei stellte er fest, dass Unwissenheit über die Hautdicke an der gewählten Injektionsstelle für das Insulinpräparat möglicherweise zu ungewollten Insulinablagerungen im Gewebe führen kann [Birkebaeck et al., 1998]. In seiner Studie an 47 Kindern, die an einem Diabetes mellitus Typ I litten, führte er Ultraschallmessungen an den verschiedenen Insulin-Injektionsstellen durch. Hierbei zeigte sich interindividuell sowie individuell an unterschiedlichen Stellen eine teilweise stark abweichende Gewebsdicke und damit auch Insulindepotbildung nach subkutaner Applikation. Nach Bestimmung der unterschiedlichen Gewebeeigenschaften mittels Ultraschall und subkutaner Luftbolusinjektionen zur Kontrolle, konnten, angepasst an das jeweilige Kind, spezielle Injektionsanleitungen (bezüglich Injektionsstelle, sowie Applikationswinkel, und Nadellänge) verfasst werden.

Die Hautdicke ist abhängig von Geschlecht sowie BMI der untersuchten Person [Shin et al., 2006], ebenso wie von zusätzlichen Faktoren. Dazu zählen zurückliegende Menopause in Jahren, Trainingsstunden pro Woche, Koffeingenuss, länger dauernde Therapie mit Schilddrüsenhormonen und/oder Glukokortikoiden [Whitmore et al., 1998].

Die individuelle Hautdicke wird möglicherweise jedoch auch zusätzlich von genetischen Faktoren beeinflusst. Zu dieser Fragestellung wurden bis zum aktuellen Zeitpunkt noch keine Untersuchungen veröffentlicht.

Bevor jedoch ein möglicher Effekt des COLIA1-SP1-Polymorphismus auf die Ansprechbarkeit auf subkutan injiziertes hGH, angepasst an die individuelle Dosis von hGH, titriert durch IGF-1-Serummessungen, diskutiert werden kann, muss der Einfluss von injiziertem hGH selbst auf Eigenschaften des Subkutangewebes im Allgemeinen betrachtet werden.

Die menschliche Haut exprimiert GH- [Oakes et al., 1992] und IGF-1-Rezeptoren [Tavakkol et al., 1992], und ist damit ein direktes GH-Zielorgan.

Gilhar et al. konnten nachweisen, dass monoklonale Antikörper gegen IGF-1 den Effekt von GH auf die Hautdicke von nackten Mäusen inhibieren, die zuvor eine Transplantation humaner Haut erhalten hatten [Gilhar et al., 1994]. Mit humaner Haut transplantierte Mäuse, die mit GH alleine behandelt wurden (ohne zusätzliche Gabe von Anti-IGF-1), zeigten eine statistisch signifikante Zunahme der Hautdicke unter der GH-Therapie. Hieraus schlossen Gilhar et al., dass IGF-1 als Regulator der GH-Wirkung, hier am Beispiel der dermalen GH-Wirkung, eine zentrale Rolle einnimmt.

Ebenso konnte auch durch Nabbarro [Nabbarro JD, 1987] der GH-Einfluss auf die Dicke des Subkutangewebes nachgewiesen werden. So wurde bei Patienten mit Akromegalie bei stark erhöhten Serum-GH-Werten eine signifikant vermehrte Dicke des Subkutangewebes gemessen. Unter erfolgreicher Therapie der Erkrankung reduzierte sich die Subkutangewebstdicke wieder nachweisbar. Ähnliche Ergebnisse in umgekehrter Auffälligkeit konnten auch histomorphologisch bei Patienten mit GH-Mangel nachgewiesen werden [Ferguson et al., 1983]. Hierbei zeigte sich eine reduzierte Dicke des

Subkutangewebes bei ebenfalls reduziertem kutanen Kollagengehalt [Lange et al., 2001].

Kinder mit GH-Mangel zeigten signifikant dünnere, fragilere und weniger elastische Haut vor Substitutionstherapie mit hGH als gesunde Kinder ohne GH-Mangel [Abramovici et al., 1983]. Nach einem Jahr Therapie mit hGH stieg die Hautdicke und Hautfestigkeit bei den behandelten Kindern mit GH-Mangel an, die Elastizität der Haut wurde jedoch nicht beeinflusst. Histomorphologische Veränderungen der Haut bei Patienten mit GH-Mangel konnten trotz Langzeit-Therapie mit hGH, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, weiterhin nachgewiesen werden und blieben auch lebenslang bestehen.

Die Feststellung, dass sich nach 6-monatiger hGH-Therapie bei Patienten mit GH-Mangel eine sonographisch sowie mechanisch nachweisbare Zunahme der Hautdicke zeigte, deutet daraufhin, dass die Kollagen Typ I-Synthese, stimuliert durch die applizierte hGH-Therapie, zu einer vermehrten Einlagerung von Kollagen Typ I in der Haut führt [Conte et al., 2000].

Nach dieser Betrachtungsweise könnte die Hautdicke und/oder Haut-Kollagen-Gehalt bei Patienten mit GH-Mangel von der individuellen Dauer der erhaltenen GH-Substitutionstherapie abhängig sein.

In der hier bearbeiteten Studie wurde der Effekt der verschiedenen COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotypen auf die differierenden Mengen an benötigtem subkutan appliziertem hGH untersucht, der wahrscheinlich durch Veränderungen des subkutanen Bindegewebes und der Gefäßwandstrukturen vermittelt wird. Dabei wurde versucht, den allgemeinen physiologischen Effekt von GH auf Hautstrukturen zu berücksichtigen, jedoch speziell die Unterschiede zwischen den Genotypen in den Vordergrund zu stellen.

Alle Patienten, die in diese Studie eingeschlossen wurden, erhielten eine substituierende hGH-Therapie für mindestens 12 Monate vor Einschluss (mittlere Behandlungsdauer mit hGH war 64 Monate \pm 2,9 Monate Standardabweichung).

In der Auswertung der gewonnenen Daten zeigte sich keine statistisch signifikante Beziehung zwischen Dauer der hGH-Therapie und Menge an injiziertem hGH, IGF-1-Serumkonzentrationen oder den IGF-1-SDS-Werten.

Subkutanes Gewebe besteht hauptsächlich aus Fettzellen und lockeren Verbindungen von Kollagen Typ I- Fasern. Unterschiede in der Dicke des Subkutangewebes sind daher am ehesten durch eine Zunahme von Fettzellen oder Kollagenfasern bedingt. Die Datenlage dieser Studie erbrachte keine statistisch signifikante Kohärenz zwischen der Menge von injiziertem hGH und BMI oder Gewicht der untersuchten Patienten.

Biomechanische Eigenschaften der Haut werden signifikant beeinflusst durch das Lebensalter des Patienten [Whitmore et al., 1998; Smalls et al., 2006; Böni et al., 2000]. Während des kutanen Alterungsprozesses vermindern sich epidermale, dermale und subkutane Gewebestrukturen [Böni et al., 2006]. Neben der Reduktion des Subkutangewebes kommt es auch zu einer Reduktion des subkutanen Fettgewebes und Verminderung der Kollagenproteinsynthese [Mann et al., 2001; Smalls et al., 2006].

Die Absorptionskapazität subkutan applizierter Substanzen ändert sich also auch während des Alterungsprozesses und erreicht im fortgeschrittenen Alter bei maximaler kutaner Gewebeabnahme ihre Höchstwerte. Die Menge an injiziertem GH war in dieser Studie signifikant niedriger bei Patienten mit hohem Lebensalter. Die Menge des applizierten hGH wurde hier jedoch auch an die physiologisch niedrigeren IGF-1-Serumkonzentration bei älteren Patienten angepasst. Daher ist unser Resultat bezüglich einer niedrigeren benötigten GH-Dosis zum Erreichen einer Ziel-IGF-1-Serumkonzentration vielmehr in dem physiologisch erniedrigten Hormonspiegeln von IGF-1 und damit leichter erreichbaren Ziel-Serumwerten als an altersassoziierten Hautveränderungen begründet. Der Hautkollagengehalt verringert sich jedoch nachgewiesenermaßen mit zunehmendem Alter und könnte daher unsere Ergebnisse beeinflussen [Böni et al., 2000; Uitto et al., 1998].

In unserer Studie konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Menge an appliziertem hGH und dem Geschlecht, der Größe, dem Gewicht oder errechnetem BMI der Patienten ermittelt werden.

Shin et al. konnte in einer anderen Studie eine Relation von BMI-Wert und Gewicht der Patienten zur jeweiligen Dicke des Subkutangewebes feststellen [Shin et al., 2006].

Anhand der bei dieser Studie gewonnenen Daten zeigte sich jedoch ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den bestimmten COLIA1-SP1-

Polymorphismus-Genotypen (GG, GT, TT) und der benötigten Menge an injiziertem hGH bei erwachsenen Patienten mit GH-Mangel, während die IGF-1-Serumwerte und die IGF-1-SDS-Werte unter den Genotypen nicht signifikant differierten. Eine graphische Darstellung dieser Daten zeigt die höchsten benötigten GH-Dosen bei den Patienten mit dem Genotyp GG, die niedrigsten bei den TT-Genotypen und eine mittlere benötigte Dosis bei dem Genotyp GT (IGF-1/GH-Ratio GG vs. TT $p=0,036$, siehe Abb. 1.4.).

Diese Darstellung deutet auf eine mögliche Korrelation der Menge der benötigten hGH-Dosis mit der Anzahl der T-Allele des COLIA1-SP1-Polymorphismus hin.

In Bezug auf die Assoziation des COLIA1-SP1-Polymorphismus mit Osteoporose konnte in Gel-Elektrophoreseuntersuchungen gezeigt werden, dass das T-Allel im Vergleich zum G-Allel eine höhere Affinität zu dem SP1 Bindungsprotein aufweist [Mann et al., 2001]. Diese Tatsache war verbunden mit einer größeren Anzahl von T-Allel-Transkripten in unverbundenen DNA-Strängen, extrahiert aus Knochenmaterial von Individuen, die einen heterozygoten Genotypen (GT) des COLIA1-SP1-Polymorphismus aufwiesen [Mann et al., 2001].

Analysen der Kollagen-Proteinproduktion zeigten eine verstärkte Produktion von COLIA1-Ketten relativ zur Produktion der COLIA2-Ketten in Osteoblasten von GT-heterozygoten-Genotypen im Vergleich zu den GG-homozygoten-Genotypen. Dies führte zu einer relativen Überexpression von COLIA1-mRNA im Vergleich zu COLIA2-mRNA in Osteoblasten [Mann et al., 2001].

Dies hatten auch Stewart. et al. in ihrer Studie [Stewart et al., 2005] bestätigt. Sie untersuchten dabei in-vitro Osteoblasten die die verschiedenen COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotypen (GG; GT, TT) exprimieren. Dabei stellten sie eine statistisch signifikant erniedrigte Knochenmineralisierung und damit deutlich erhöhte Brüchigkeit bei den Osteoblastenzelllinien fest, die ein oder zwei T-Allele (GT, TT) exprimierten gegenüber den Osteoblasten mit dem Genotypen GG.

Der Molekularmechanismus, mit dem der COLIA1-SP1-Polymorphismus die therapeutische Wirkung von injiziertem hGH beeinflusst, ist weiterhin unklar. Ähnlich wie im Zusammenhang mit dem Einfluss auf die Knochendichte [Mann et al., 2001] beschrieben, könnte jedoch durch einen veränderten COLIA1/COLIA2-Quotienten auch eine mögliche Beeinflussung der mechanischen bzw. biologischen Eigenschaften des Subkutangewebes vorliegen, der zu veränderten

Absorptionskapazitäten und Bioverfügbarkeiten subkutan applizierter Substanzen führen würde.

Entsprechend der These, das T-Allel des COLIA1-SP1-Polymorphismus führe zu einer verstärkten Produktion von COLIA1-Ketten gegenüber COLIA2-Ketten mit der Konsequenz einer verminderten Knochenstabilität [Mann et al., 2001], könnte die Existenz von einem (heterozygoter Genotyp) oder zwei (homozygoter Genotyp) T-Allelen vielleicht ebenso den COLIA1/COLIA2-Quotienten in Subkutangewebe verändern. Dies könnte dann zu einer verminderten Gewebestabilität und damit zu einer erhöhten Diffusions-/Absorptionskapazität für injizierte Substanzen führen. Aufgrund der verbesserten Gewebegängigkeit würde dann wiederum eine kleinere benötigte GH-Dosis zur Erreichung einer therapeutischen IGF-1-Serumwertkonzentration resultieren.

Die molekularen Mechanismen sind jedoch weiterhin unklar. Auch eine Veränderung der Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor SP1 in der Regulatorregion des COLIA1-Gens wäre denkbar.

Leider limitiert die begrenzte Anzahl von homozygoten T-Genotypen (10 Patienten im Untersuchungskollektiv) die statistische Aussagekraft einer zuverlässigen Wertung der Korrelation zwischen Genotyp und Menge an benötigter injizierter GH-Dosis.

Andere Polymorphismen könnten bezüglich veränderter Gewebeeigenschaften mit dem COLIA1-SP1-Polymorphismus interagieren. In der Promotorregion des COLIA1-Gens konnten verschiedene weitere Polymorphismen identifiziert werden, die in wechselnden Verbindungen oder in einer festen Beziehung mit dem COLIA1-SP1-Polymorphismus interagieren und möglicherweise die Knochenstabilität und andere Gentranskriptionen beeinflussen können [Garcia et al., 2002; Lui et al., 2004].

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Studie ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem jeweiligen COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotypen (GG, GT, TT) und der individuell benötigten hGH-Dosis bis zum Erreichen des alters- und geschlechtsspezifischen IGF-1-Serumwertes dargelegt werden. Mögliche Erklärungsansätze könnten eine Beeinflussung des COLIA1/COLIA2-Quotienten im Subkutangewebe mit resultierender Veränderung

der Diffusions/Absorptions-Kapazität, oder auch eine Interaktion an der Bindungsstelle des SP1-Transkriptionsfaktors in der Regulatorregion des COLIA1-Gens sein.

Aufgrund des kleinen Patientenkollektives in dieser Studie sollten jedoch weitere molekulargenetische Untersuchungen an größeren Kollektiven folgen, um die hier entstandenen Thesen zu verifizieren und mögliche klinische oder sozio-ökonomische Konsequenzen beurteilen zu können.

6. Zusammenfassung

Der Collagen Typ I-alpha-1-spezifisch-protein1-Polymorphismus (COLIA1-SP1-Polymorphismus) ist eine Allel-Variante des Typ I Kollagens auf Position ex2-348. Es repräsentiert die erste Base der SP1-Bindungsstelle im ersten Intron des COLIA1 auf Genlocus 17q21. Kollagen Typ I ist hauptsächlich in Knochen, Haut, Sehnen, Bänder, Hornhaut und inneren Organe (insgesamt ca. 90 %) lokalisiert und ist das im menschlichen Körper am häufigsten vorkommende Protein. Es existieren drei bekannte Allel-Varianten dieses Polymorphismus (GG, GT, TT, gebildet aus den Basen Thymin und Guanin). Die Allel-Verteilung in der europäischen Normalbevölkerung liegt bei 64,5 % für die homozygoten GG-Genotypen, 29,8 % für die heterozygoten GT-Genotypen und 5,6 % für die homozygoten TT-Genotypen.

Das Untersuchungskollektiv dieser Studie bestand zu Beginn zunächst aus 247 adulten Patienten, die einen manifesten Wachstumshormon (GH)-Mangel aufwiesen und deren DNA hinsichtlich des vorliegenden COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotypen untersucht wurde. Dieses Kollektiv wurde als Kollektiv 1 bezeichnet. Jedoch erfüllten nur 122 Personen dieses Patientenkollektives alle erforderlichen Einschlusskriterien für diese Studie (gesicherte Therapieindikation, abgeschlossene Auftitration der erforderlichen hGH-Dosis nach der alters- und geschlechtsspezifischen IGF-1-Serumkonzentration, Mindestalter von 18 Jahren, Mindesttherapiedauer mit hGH über 12 Monate) und wiesen eine vollständige Datenlage auf. Dieses verkleinerte Patientenkollektiv wurde als Kollektiv 2 bezeichnet. Das hier untersuchte Patientenkollektiv stammt aus der deutschen KIMS Pharmacogenetics Study. Es

handelt sich hierbei um eine prospektive Studie zur Typisierung von Genen der GH-IGF-1-Achse. Ein besonderer Fokus der Untersuchung liegt auf der Korrelation unterschiedlicher Genotypen mit differierendem Ansprechen auf hGH unter Therapie und assoziierten Begleiterkrankungen.

Eine der untersuchten Fragestellungen war, ob die Allel-Verteilung des COLIA1-SP1-Polymorphismus im gesamten Patientenkollektiv mit der Verteilung in der Normalbevölkerung übereinstimmt.

Zur Gentyptisierung der Patienten wurde eine DNA-Extraktion aus gewonnenen Blutproben durchgeführt. Danach wurden die spezifischen Allel-Sequenzen mittels PCR repliziert und mit Hilfe einer Gel-Elektrophorese visualisiert.

Hierbei zeigte sich eine der Normalbevölkerung vergleichbare Verteilung der Genotypen des COLIA1-SP1-Polymorphismus im gesamten Untersuchungskollektiv (p-Wert 0,337, Kollektiv 1 Hardy-Weinberg-Equilibrium).

Des Weiteren wurde eine mögliche Assoziation der verschiedenen Genotypen zu klinischen Daten (BMI, Körpergewicht, Körpergröße, korrelierende Grunderkrankungen, Patientenalter) der Patienten untersucht.

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang der Genotypen mit spezifischen klinischen Daten (assoziierte Grunderkrankungen, Körpermaße, Alter) konnte hierbei nicht nachgewiesen werden.

Dritte Fragestellung dieser Studie war die Untersuchung eines möglichen COLIA1-SP1-Polymorphismus-assoziierten Effektes auf die individuell benötigte hGH-Dosis bei subkutan applizierter hGH-Substitutionstherapie bei GH-defizienten Erwachsenen.

Bei der Betrachtung des verkleinerten Kollektivs mit 122 eingeschlossenen Patienten (Kollektiv 2) konnte eine Assoziation der benötigten hGH-Dosis bis zum Erreichen der alters- und geschlechtsspezifischen IGF-1-Serumkonzentration in Abhängigkeit vom COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotypen des untersuchten Individuums beobachtet werden. Je mehr T-Allele der jeweilige Patient exprimierte (z.B. max. 2 Stück bei dem homozygoten Genotyp TT), desto geringere Mengen an subkutan appliziertem hGH waren zum Erreichen der gewünschten therapeutischen IGF-1-Serumkonzentration notwendig (p-Wert IGF-1/GH GG vs. TT 0,036).

Die molekulargenetischen Grundlagen dieser Beobachtungen sind unklar. Möglicherweise könnte diese Tatsache jedoch durch eine verminderte

Gewebsstabilität des Subkutangewebes und damit erhöhte Substanzdurchlässigkeit bedingt sein, ausgelöst durch eine veränderte Absorptions/Diffusionskapazität im Rahmen einer T-Allel-bedingten Beeinflussung des COLIA1/COLIA2-Quotienten in Subkutangewebe. Gleichsam denkbar wäre eine Interaktion an der Bindungsstelle des SP1-Transkriptionsfaktors in der Regulatorregion des COLIA1-Gens.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie konnten neue Thesen zur Pharmakogenetik der subkutan applizierten Wachstumshormonsubstitution bei Hypophysenvorderlappeninsuffizienz dargelegt werden. In Anbetracht des kleinen Untersuchungskollektivs sollten jedoch weitere Studien folgen, um diese Thesen zu verifizieren.

7. Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
abd.	abdominell
ACTH	Adreno-corticotropes Hormon
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäuren
BMD	Bone mineral density
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cm	Zentimeter
COLIA1	Collagen Typ 1-alpha-1
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Einheit
EEG	Elektrisches Enzephalogramm
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
et al.	und Andere
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
FFA	Freie Fettsäuren
g	Gramm
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GH	Growth Hormone
GH-BP	Growth Hormone-Bindungsproteine
GHRH	GH-Releasing-Hormone
GHRH	GH-Release-Inhibiting-Hormone
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HDL	High density Lipoprotein
hGH	human Growth Hormone

Hb	Hämoglobin
IGF	Insulin-like-Growth-Faktor
IGFBP	Insulin-like-Growth-Faktor- Bindungsproteine
i.v.	intravenös
IE	Internationale Einheiten
kDA	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LDL	Low density Lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
m ³	Kubikmeter
mg	Milligramm
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
nm	Nanometer
PCR	Polymerasekettenreaktion
qm	Quadratmeter
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
s.c.	subkutan
SDS	standard deviation score
SNP	single nucleotid polymorphism
sog.	So genannt
Syn.	Synonym
Tab.	Tabelle
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
UV	Ultraviolett
vs.	versus
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

8. Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

8.1. Tabellen

- Tab. 1.1.: Seite 2
Die häufigsten Kollagentypen
- Tab. 1.2.: Seite 7
Allel-Verteilung des COLIA1-SP1-Polymorphismus in der Normalbevölkerung [Kann et al., 2002; Ralston et al., 2006; Nguyen et al., 2005]
- Tab. 1.3.: Seite 14
Metabolische Wirkungen von GH und IGF-1 [Nawroth et al., 2001]
- Tab. 1.4.: Seite 20
Ursachen des GH-Mangels [Nawroth et al., 2001; Pfäffle et al., 2000]
- Tab. 1.5.: Seite 21
Syndrom des GH-Mangels beim Erwachsenen [Nawroth et al., 2001]
- Tab. 1.6. Seiten 23/24
Durchführung des Insulin-Hypoglykämie-Test [Leitlinien Funktionstest Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH, Standort Marburg, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik-Zentrallaboratorium]
- Tab.: 1.7.: Seite 25
Durchführung des Arginin-GHRH-Test [Leitlinien Funktionstest Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH, Standort Marburg, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik-Zentrallaboratorium]
- Tab. 1.8.: Seite 42
Verteilung der Genotypen im gesamten Untersuchungskollektiv (Kollektiv 1) gegenüber der Normalbevölkerung [Kann et al., 2002; Ralston et al., 2006; Nguyen et al., 2005]

Tab. 1.9.: Seite 43
Verteilung der Genotypen des fortführend analysierten Patientenkollektivs (Kollektiv 2) gegenüber der Normalbevölkerung [Kann et al., 2002; Ralston et al., 2006; Nguyen et al., 2005]

Tab. 1.10.: Seite 44
Ätiologien des GH-Mangels bei 122 Patienten in Abhängigkeit von ihren COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotypen

Tab. 1.11.: Seite 45
Anthropometrische Merkmale der Patienten bezogen auf die unterschiedlichen COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotypen

Tab. 1.12.: Seite 46
Anthropometrische Merkmale in Bezug auf die COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotyp Gruppen (GG-Homozygote vs. GT-Heterozygote plus TT-homozygote Genotypen)

Tab. 1.13.: Seite 47
GH-Therapie bedingte Merkmale in Bezug auf die COLIA1-Genotypen

Tab. 1.14.: Seite 48
GH-bedingte Merkmale in Bezug auf die COLIA1-SP1-Polymorphismus-Genotyp Gruppen (GG-Homozygote vs. GT-Heterozygote plus TT-homozygote Genotypen)

8.2. Abbildungen

Abb. 1.1.: Seite 2
Collagen-Tripelhelix

Abb. 1.2.: Seite 10
Tägliche GH-Sekretion in Abhängigkeit vom Alter [Nawroth et al., 2001]

Abb. 1.3.: Seite 41
Ergebnis der Gel-Elektrophorese der unterschiedlichen Genotypen im
ausgewählten Beispiel

Abb. 1.4.: Seite 49
Dosis an injiziertem hGH bei den unterschiedlichen Genotypen

Abb. 1.5.: Seite 50
IGF-1/GH Ratio bei den unterschiedlichen COLIA1-SP1-Polymorphismus-
Genotypen

9. Literaturangaben

Abramovici A, Josefsberg Z, Mimoni M, Liban E, Laron Z; 1983:
Histopathological features of the skin in hypopituitarism and Laron-type dwarfism. *Isr J
Med Sci* 19: 515-519

Al-Shoumer KA, Gray R, Anyaoku V, Hughes C, Beshay S, Richmond W,
Johnston DG, 1998:
Effects of four years treatment with biosynthetic human growth hormone (GH) on glucose
homeostasis, insulin secretion, and lipi metabolism in GH-deficient adults. *Clin Endocrinol
(Oxf)*; 48: 795-802

Arbeitsgemeinschaft und Sektion pädiatrische Endokrinologie 2001

Behncken SN, Waters MJ, 1999:
Molecular recognition events involved in the activation of the growth hormone receptor by
growth hormone; *J Mol Recognit.* 1999 Nov-Dec;12(6):355-62

Ben-Shlomo A, Melmet S, 2006 Jul-Aug:
Skin manifestations in acromegaly; *Clin Dermatol.*; 24(4): 256-9

Bex M, Abs R, Maiter D, Beckers A, Lamberigts G, Bouillon R, 2002:

The effect of GH replacement therapy on bone metabolism in adult onset GH deficiency: a 2-year open randomized controlled multicenter trial. *J Bone Miner Res*; 17: 1081-94

Biller BMK, Samules MH, Zagar A, Cook DM, Arafah BM, Bonert V, Stavrou ST, Kleinberg DL, Chipman JJ, Hartmann ML, 2002:

Sensitivity and specificity of six tests for diagnosis of adult Gh deficiency. *J Clin Endoc Metab*; 87: 2067-79

Binnerts A, Swart GR, Wilson JH, Hoogerbugge N, Pols HA, Birkenhager JC, Lamberts SJW, 1992:

The effects of growth hormone administration in growth hormone deficient adults on bone, protein, carbohydrate and lipid homeostasis, as well as on body composition. *Clin Endocr (oxf)*; 37: 79-87

Birkebaek NH, Johansen A, Solvig J; 1998:

Cutis/subcutis thickness at insulin injection sites and localization of simulated insulin boluses in children with type 1 diabetes mellitus: need for individualization of injection technique? *Diabet Med* 15: 965-971

Böni R, Burg G; 2000:

Aging skin: physiological bases, preventive measures and therapeutic modalities. *Schweiz Med Wochenschr* 130: 1272-1278

Borlu M, Tanriverdi F, Koc CA, Unluhizarci K, Utas S, Kelestimur F, 2007 Feb:

The effects of severe growth hormone deficiency on the skin of patients with Sheehan's syndrome; *J Eur Acad Dermatol Venereol.*; 21(2):199-204

Bornstein P, McKay J, Morishima JK, Devarayalu S, Gelinis RE; 1987:

Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional control of the human alpha 1 (I) collagen gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8869-8873

Brahm M, 1999:

Subcutaneous treatment with recombinant human erythropoietin - the influence of injection frequency and skin-fold thickness. *Scand J Urol Nephrol* 33: 192-196

Buchfelder, Kann PH, Wüster C, Tuschy U, Saller B, Brabant G; Kleindienst A, Nomikos P, German KIMS board, 2007:

Influence of GH substitution therapy in deficient adults on the recurrence rate of hormonally inactive pituitary adenomas: a case control study.

Eur J Endocrinol, 2007 Aug;157(2):149-56.

Burmann P, Broman JE, Hetta J, Wiklund I, Erfurth EM, Haag E, Karlsson FA, 1995:

Quality of life in adults with growth hormone (GH) deficiency: response to treatment with recombinant human GH in a placebo-controlled 21-month trial. J Clin Endocr Metab; 80: 3585-90

Canalis E, Centerlla M, Burch W, McCarthy TL, 1989:

Insulin-like-growth-factor-1 mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. J Clin Invest 83:60-65

Chamson A, Bertheas MF, Frey J, 1995:

Collagen biosynthesis in cell culture from chorionic villi; Prenat Diagn. 1995 Feb;15(2):165-70

Chappard D, Alexandre C, Robert JM, Riffat G; 1991:

Relationships between bone and skin atrophies during aging. Acta Anat (Basel) 141: 239-244

Chenu C, Valentin-Opran A, Chavassieux P, Saez S, Meunier PJ, Delmas PD, 1990:

Insulin-like-growth-factor-1 hormonal regulation by growth hormone and by 1,25(OH)₂D₃ and activity on human osteoblast-like cells in short-term-cultures. Bone 11:81-86

Cohen P, Clemmons DR, Rosenfeld RG, 2000:

Does the GH-IGF-axis play a role in cancer pathogenesis? Growth Horm IGF Res; 10: 297-305

Cohn DH, Byers PH, 1990:

Clinical screening for collagen defects in connective tissue diseases; Clin Perinatol. 1990 Dec;17(4):793-809

Colao A, di Somma C, Pivonello R, Cuoculo A, Spinelli L, Bonaduce D, Salvatore M, Lombardi G, 2002:

The cardiovascular risk of adult GH deficiency (GHD) improved after GH replacement and worsened in untreated GHD: a 12-month prospective study. *J Clin Endocr Metab*; 87: 1088-93

Colao A, Marzullo P, Di Somma C, Lombardi G, 2001:

Growth hormone and the heart. *Clin Endocrinol (oxf)*; 54: 137-54

Consensus guidelines for diagnosis and treatment of adults with growth hormone deficiency I: summary statement of Growth Hormone Research Society Workshop of Adult Growth Hormone Deficiency. *J.Clin Endocr Metab* 1998; 83: 379-81

Consensus guidelines for diagnosis and treatment of adults with growth hormone deficiency II :

A statement of the GH Research Society in association with the European Society of Pediatric Endocrinology, Lawson Wilkins Society, European Society of Endocrinology, Japan Endocrine Society, and Endocrine Society of Australia, 2007; *European Journal of Endocrinology*; 157: 695-.700

Conte F, Diridollou S, Jouret B, Turlier V, Charveron M, Gall Y, Rochiccioli P, Bieth E, Tauber M; 2000:

Evaluation of cutaneous modifications in seventy-seven growth hormone deficient children. *Horm Res* 54: 92-97

Corneli G, Di Somma C, Baldelli R, Rovere S, Gasco V, Croce CG, Grottoli s, Maccario M, Colao A, Lombardi G, Ghigo E, Camanni F, Aimaretti G, 2005:

The cut-off limits of GH response to GH-releasing hormone-arginine test related to body mass index. *Eur J Endocrinol*; 89:1586-91

De Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA, 1992:

Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex; *Science*. 1992 Jan 17;255(5042):306-12

Dimke H, Flyvbjerg A, Frische S, 2007 Jun 6:

Acute and chronic effects of growth hormone on renal regulation of electrolyt and water homeostasis; Growth Horm IGF Res.; (Epub ahead of print)

Eriksen HA, Satta J, Risteli J, Veijola M, Väre P, Soini Y., 2006:

Type I and type III collagen synthesis and composition in the valve matrix in aortic valve stenosis; 2006 Nov;189(1):91-8. Epub 2006 Jan 6

Ernst M, Froesch ER, 1988:

Growth hormone dependent stimulation of osteoblast-like-cells in serum-free cultures via local synthesis of insulin-like-growth-factors I. Biochem Biophys Res Commun 151:142-147

Fassbender WJ, Brabant G, Buchfelder M, Eversmann T, Saller B, Tuschy U, Wallaschofski H, Kann PH für das deutsch KIMS-Board; 2005:

Therapie mit Wachstumshormon bei Erwachsenen mit nachgewiesenem Wachstumshormnmangel nach den Kriterien der evidenzbasierten Medizin; Dscht Med. Wochenschr 2005; 130:2589-2595

Ferguson JK, Donald RA, Weston TS, Espiner EA; 1983:

Skin thickness in patients with acromegaly and Cushing`s syndrome and response to treatment. Clin Endocrinol (Oxf) 18: 347-353

Garcia JM, Garcia-Touza M, Hijazi RA, Taffet G, Epner G, Mann D, Smith RG, Cunningham GR, Marcelli M, 2005:

Active ghrelin levels and active to total ghrelin ratio in cancer-induced cachexia; J Endocrinol Metab 2005; 90:2920-6

Garcia-Giralt N, Nogues X, Enjuanes A, Puig J, Mellibovsky L, Bay-Jensen A, Carreras R, Balcells S, Diez-Perez A, Grinberg D; 2002:

Two new single nucleotide polymorphisms in the COLIA1 upstream regulatory region and their relationship with bone mineral density. J Bone Miner Res 17: 384-393

Gensure RC, Mäkitie O, Barclay C, Chan C, DePalma SR, Bastepe M, Abuzahra H, Couper R, Mundlos S, Sillence D, Ala Kokko L, Seidman JG, Cole WG, Jüppner H; 2005:

A novel COL1A1 mutation in infantile cortical hyperostosis (Caffey disease) expands the spectrum of collagen-related disorders. *J Clin Invest* 115: 1250-1257

Gibney J, Wallace JD, Spinks T, Schnorr L, Ranicar A, Cuneo RC, Lockhard S, Burnand KG, Salomon F, Sönksen PH, Russel-Jones D, 1999:
The effects of 10 years of recombinant human growth hormone (GH) in adult GH-deficient patients. *J Clin Endocr Metab*; 84: 2596-602

Gilhar A, Ish-Shalom S, Pillar T, Etzioni A, Silbermann M; 1994:
Effect of antiinsulin-like growth factor 1 on epidermal proliferation of human skin transplanted onto nude mice treated with growth hormone. *Endocrinology* 134: 229-232

Glaesmer H, Brähler E, 2002:
Schätzung der Prävalenz von Übergewicht und Adipositas auf der Grundlage subjektiver Daten zum Body-Mass-Index (BMI); *64*:133-138

Grant SF, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH; 1996:
Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha1 gene. *Nat Genet* 14: 203-205

Green H, Morikawa M, Nixon T, 1985:
A dual effector theory of growth hormone action.[Review] *Differentiation* 29:195-198

Growth Hormone Research Society 2000:
Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH Research Society. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 3990-3993

Hansen TK, Møller J, Thomsen K, Frandsen E, Dall R, Jørgensen JO, Christiansen JS, 2001 Dec:
Effects of growth hormone on renal tubular handling of sodium in healthy humans; *Am J Physiol Endocrinol Metab.*; 281(6): E1326-32

Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th Edition 2001 ,Part 13 ,Chap 238,P:2235-2240

Hayden JM, Mohan S, Baylink DJ, 1995:

The insulin-like-growth-factor-system and coupling of formation to resorption. *Bone* 17:93S-98S

Hernberg-Ståhl E, Luger A, Abs R, Bengtsson BA, Feldt-Rasmussen U, Wilton P, Westberg B, Monson JP, the KIMS International Board on behalf of KIMS Study Group, 2001:

Healthcare consumption decreases in parallel with improvements in quality of life during GH replacement in hypopituitary adults with GH deficiency. *J Clin Endocr Metab*; 86: 5277-81

Hildebrandt P; 1991:

Subcutaneous absorption of insulin in insulin-dependent diabetic patients. Influence of species, physico-chemical properties of insulin and physiological factors. *Dan Med Bull* 38: 337-346

Hitraya EG, Varga J, Artlett CM, Jimenez SA; 1998:

Identification of elements in the promoter region of the alpha1(I) procollagen gene involved in its up-regulated expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 41: 2048-2058

Ho KK, 2007

Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of adults with GH deficiency II: a statement of the GH Research Society in association with the European Society for Pediatric Endocrinology, Lawson Wilkins Society, European Society of Endocrinology, Japan Endocrine Society, and Endocrine Society of Australia.

Eur J Endocrinol, 2007 Dec; 157(6):695-700

Ioannidis JP, Gwinn M, Little J, Higgins JP, Bernstein JL, Boffetta P, Bondy M, Bray MS, Brenchley PE, Buffler PA, Casas JP, Chokkalingam A, Danesh J, Smith GD, Dolan S, Duncan R, Gruis NA, Hartge P, Hashibe M, Hunter DJ, Jarvelin MR, Malmer B, Maraganore DM, Newton-Bishop JA, O'Brien TR, Petersen G, Riboli E, Salanti G, Seminara D, Smeeth L, Taioli E, Timpson N, Uitterlinden AG, Vineis P, Wareham N, Winn DM, Zimmern R, Khoury MJ, 2006:

A road map for efficient and reliable human genome epidemiology.

Human Genome Epidemiology Network and the Network of Investigator Networks: Nat Genet. 2006 Jan;38(1):3-5.

Isakson OG, Lindahl A, Nilsson A, Isgaard J; 1987:
Mechanisms of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth, Endocr Rev 8: 426-438

Isgaard J, Møller C, Isaksson OG, Nilsson A, Mathews LS, Noestedt G, 1988:
Regulation of insulin-like growth factor messenger ribonucleic acid in rat growth plate by growth hormone. Endocrinology 122:1515-1520

Isaksson OG, Jansson JO, Gause IA, 1982:
Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. Science 216:1237-1239

Jenkins PJ, Mukherjee A, Shalet SM, 2006:
Does GH cause cancer? Clin Endocrinol; 64: 115-21

Jørgensen JO, Møller L, Krag M, Billestrup N, Christiansen JS, 2007 Mar:
Effects of growth hormone on glucose and fat metabolism in human subjects; Endocrinol Metab Clin North Am; 36(1):75-87

Jørgensen JO, Pedersen SA, Thuesen L, Jørgensen J, Ingemann-Hansen T, Skakkeæk NE, Christiansen JS, 1989:
Beneficial effects of GH treatment in GH-deficient adults. Lancet; 1: 1221-5

Jørgensen JO, Vestergaard E, Gormsen L, Jessen N, Nørrelund H, Christiansen JS, Møller L, 2005:
Metabolic consequences of GH deficiency; J Endocrinol Invest.; 28 (5 Suppl): 47-51

Kann P, Piepkorn B, Schehler B, Lotz J, Prellwitz W, Beyer J; 1996:
Growth hormone substitution in growth-hormone deficient adults: effects on collagen type I synthesis and skin thickness. Exp Clin Endocrinol Diabetes 104: 327-33

Kann, Bergink, Fang, van Daele, Hofman, et al., 2002:

The Collagen I α 1 SP1 Polymorphism is Associated With Differences in Ultrasound Transmission Velocity in the Calcaneus in Postmenopausal Women. *Calcif Tissue Int*; 70:450-456

Kassem M, Blum W, Ristelli J, Mosekilde L, Eriksen EF, 1993:

Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of normal osteoblast-like cells in vitro. *Calcif Tissue Int* .52:222-226

Kossiakoff AA, 2004:

The structural basis for biological signaling, regulation, and specificity in the growth hormone-prolactin system of hormones and receptors; *Adv Protein Chem*. 2004;68:147-69

Kotzmann H, Riedl M, Bernecker P, Clodi M, Kainberger F, Kaiser A, Woloszczuk W, Luger A, 1998:

Effect of long-term growth-hormone substitution therapy on bone mineral density and parameters of bone metabolism in adult patients with GH deficiency. *Calcified Tissue Int*; 62: 40-6

Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa H, 1999:

Entdeckung und erste Veröffentlichung über das Ghrelin; *Nature*; 402:656-60

Kromeyer-Hauschild K, Wabitsch M, Kunze D, F Geller F, Geiß HC, Hesse V, von Hippel H, Jaeger U, Johnsen U, Korte W, Menner K, Müller G, Müller JM, Niemann-Pilatus A, Remer T, Schaefer F, Wittchen HU, Zabransky U, Zellner K, Ziegler A, Hebebrand J, 2007:

Perzentile für den Body-mass-Index für das Kindes- und Jugendalter unter Heranziehung verschiedener deutscher Stichproben

Kivirikko KI, 1993:

Collagens and their abnormalities in a wide spectrum of diseases; *Ann Med*. 1993 Apr;25(2):113-26

Lange M, Thulesen J, Feldt-Rasmussen U, Skakkebaek NE, Vahl N, Jorgensen JO, Christiansen JS, Poulsen SS, Sneppen SB, Juul A; 2001:

Skin morphological changes in growth hormone deficiency and acromegaly. Eur J Endocrinol 145: 147-153

Leitlinien Funktionstest Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH, Standort Marburg, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik-Zentrallaboratorium

Liu PY, Lu Y, Long JR, Xu FH, Shen H, Recker RR, Deng HW; 2004:
Common variants at the PCOL2 and Sp1 binding sites of the COLIA1 gene and their interactive effect influence bone mineral density in Caucasians. J Med Genet 41: 752-757

Lugner A, J.Fertil.Repro.1/2007:
Substitutionstherapie bei Wachstumshormonmangel

Mann V, Hobson EE, Li B, Stewart TL, Grant SF, Robins SP, Aspden RM, Ralston SH; 2001:

A COLIA1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. J Clin Invest 107: 899-907

Marchisotti FG, Umeda LM, Zach PL, Saldanha MD, First OS, Libermann B, 2005:
Acromegaly and thyroid disease: prevalence of thyroid cancer; 2005 Oct;49(5):843-9.
Epub 2006 Jan 23.

Mc Gauley GA, Cuneo RC, Salomon F, Sönksson PH, 1990:
Physiological well-being before and after growth hormone deficiency. Horm Res; 33: 52-4

Mensink G, Beitz R, Burger M, 2004:
Ernährung in Deutschland

Mohan, S., Baylink, D. J.,1991:
Bone growth factors, Clin Orthop, No. 263, Seite 30-48

Morel G, Chassieux P, Barenton B, Dubois PM, Meunier PJ, Boivin G, 1993:
Evidence for a direct effect of growth hormone on osteoblasts. Cell Tissue Res 273:54-59

Murray RD, Adams JE, Shalet SM, 2004:

Adults with partial growth hormone deficiency have an adverse body composition. *J Endocrinol Metab*; 89: 1586-91

Myllyharju J, Kivirikko KI, 2001:

Collagens and collagen-related diseases. 2001 Feb;33(1):7-21

Nabarro JD; 1987:

Acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)* 26: 481-512

Nawroth P, Ziegler R, 2001

Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel, 1. Auflage, Springer Verlag, 2001

Nguyen TV, Esteban LM, White CP, Grant S, Center JR, Gardiner EM, Eisman J, 2005:

Contribution of the Collagen I $\alpha 1$ and Vitamin D Receptor Genes to the Risk of Hip Fracture in Elderly Women. *Clin Endocr Metab*; 90(12):6575-9. Epub 2005 Sep 13

Nuytinck L, Freund M, Lagae L, Pierard GE, Hermanns-Le T, De Paepe A; 2000:
Classical Ehlers-Danlos syndrome caused by a mutation in type I collagen. *Am J Hum Genet* 66: 1398-1402

O'Brien KP, Seroussi E, Dal Cin P, Sciort R, Mandahl N, Fletcher JA, Turc-Carel C, Dumanski JP; 1998:

Various regions within the alpha-helical domain of the COL1A1 gene are fused to the second exon of the PDGFB gene in dermatofibrosarcomas and giant-cell fibroblastomas. *Genes Chromosomes Cancer* 23: 187-193

Oakes SR, Haynes KM, Waters MJ, Herington AC, Werther GA; 1992:
Demonstration and localisation of growth hormone receptor in human skin and skin fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 1368-1375

Ohlsson C, Vidal O; 1998:

Effects of growth hormone and insulin-like growth factors on human osteoblasts. *Eur J Clin Invest* 28:184-186

Ohlsson, Bengtsson, Isaksson, Andeassen, Slootweg, 1998:
Growth Hormone and Bone; Endocrine Reviews 19(1):55-79

Okazaki, R; Conover, C.A; Harris, S.A; Spelsberg, T.C, Riggs, B.L, 1995:
Normal human osteoblast-like cells consistently express genes for insulin-like growth factors I and II but transformed human osteoblast cell lines do not, J Bone Miner Res, (Band 10), Seite 788-795

Pfeifer M, Verhovec R, Zizek B, Prezelj J, Poredos P, Clayton RN, 1999:
Growth hormon (GH) treatment reverses early artherosclerotic changes in GH-deficient adults. J Clin Endocr Metab; 84: 453-7

Prockop DJ, Kivirikko KI, 1995:
Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy; Annu Rev Biochem. 1995;64:403-34

Pfäffle R, Blankenstein O, Wüller S, Heimann K, Heimann G, 2000:
Idiopathic growth hormone deficiency: a vanishing diagnosis? Horm Res. 2000;53 Suppl 3:1-8.

Ralston SH, Uitterlinden AG, Brandi ML, Balcells S, Langdahl BL, Lips P, Lorenc R, Obermayer-Pietsch B, Scollen S, Bustamante M, Husted LB, Carey AH, Diez-Perez A, Dunning AM, Falchetti A, Karczmarewicz E, Kruk M, van Leeuwen JP, van Meurs JB, Mangion J, McGuigan FE, Mellibovsky L, del Monte F, Pols HA, Reeve J, Reid DM, Renner W, Rivandeneira F, van Schoor NM, Sherlock RE, Ioannidis JP, GENOMOS investigators 2006:
Large-scale evidence for the effect of the COL1A1 Sp1 polymorphism on osteoporosis outcomes: the GENOMOS study. PloS Med 3: e90

Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ, Lavery T, Kouyoumjian R, Farhadian SF, Ward R, Lander ES, 2000:
Linkage disequilibrium in the human genome; Nature. 2001 May 10;411(6834):199-204

Reinwein D, Benker G, 2002:
Checkliste Endokrinologie und Stoffwechsel, 3.Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Robinson RJ, Al-Azzawi F, Iqbal SJ, Abrams K, Mayberry JF; 1997:
The relation of hand skin-fold thickness to bone mineral density in patients with Crohn`s disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 9: 945-949

Rosén T, Bengtsson BA, 1990:
Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism; *Lancet* 1990 Aug 4; 336 (8710): 285-8

Rosenfalck AM, Maghsoudi S, Fisker S, Jørgensen JO, Christiansen JS, Hilsted J, Vølund AA, Madsbad S, 2000:
The effect of 30 month of low-dose replacement therapy with recombinant human growth hormone(rhGH) on Insulin and C-peptide kinetics, insulin secretion, insulin sensitivity, glucose effectiveness, and body composition in GH-deficient adults. *J Clin Endocr Metab*; 85: 4173-81

Rosert J, Terraz C, Dupont S; 2000:
Regulation of type I collagen genes expression. *Nephrol Dial Transplant* 15 (Suppl 6): 66-68

Saitta B, Gaidarova S, Cicchillitti L, Jimenez SA; 2000:
CCAAT binding transcription factor binds and regulates human COLIA1 promoter activity in human dermal fibroblasts: demonstration of increased binding in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Rheum* 43: 2219-2229

Saller B, Mattsson AF, kann PH, Koppeschaar HP, Svenson J, Pompen M, Koltowska-Häggström M, German KIMS investigators, Dutch KIMS investigators, Swedish KIMS investigators, 2006:
Healthcare utilization, quality of life and patient-reported outcomes during two years of GH replacement therapy in GH-deficient adults--comparison between Sweden, The Netherlands and Germany. *Eur J Endocrinol* ,2006 Jun;154(6):843-50.

Salomon F, Cuneo RC, Hesp R, Sönksen PH, 1989:
The effects of treatment with rekombiant growth hormone deficient on body composition and metabolism in adults with growth hormone deficiency. *N Engl J Med*; 321:1797-803

Shin H, Kim MJ; 2006:
Subcutaneous tissue thickness in children with type I diabetes. *J Adv Nurs* 54: 29-34

Sindelka G, Heinemann L, Berger M, Frenck W, Chantelau E; 1994:
Effect of insulin concentration, subcutaneous fat thickness and skin temperature on subcutaneous insulin absorption in healthy subjects. *Diabetologia* 37: 377-380

Slootweg MC, 1993:
Growth hormone and bone. *Horm Metab Res* 25:35-343

Slootweg MC, van Buul-offers SC, Herrmann-Erlee MP, van der Meer JM, Duursma SA, 1988:
Growth hormon is mitogenic for fetal mouse osteoblasts but not for undifferentiated bone cells. *J Endocrinol* 116:R11-R13

Slowin D, Brantsing C, Matejka G, Ohlsson C, 1996:
Cortisol decreases IGF-1 mRNA levels in human osteoblast-like-cells. *J Endocrinol* 149:397-403

Smalls LK, Randall Wickett R, Visscher MO; 2006:
Effect of dermal thickness, tissue composition, and body site on skin biomechanical properties. *Skin Res Technol* 12: 43-49

Spinas G A, Fischli S, 2002:
Endokrinologie und Stoffwechsel, 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Stewart TL, Roschger P, et al; 2005:
Association of COLIA1 Sp1 alleles with defective bone nodule formation in vitro and abnormal bone mineralization in vivo

Tanriverdi F, Bolu M, Atmaca H, Koc CA, Unluhizarci K, Utas S, Kelestimur F, 2006 Nov:
Investigation of the skin characteristics in patients with severe GH deficiency and the effects of 6 months of GH replacement therapy: a randomized placebo controlled study; *Clin Endocrinol (Oxf)*;65(5):579-85.

Tavakkol A, Elder JT, Griffith CE, Cooper KD, Talwar H, Fisher GJ, Keane KM, Foltin SK, Voorhees JJ; 1992:

Expression of growth hormone receptor, insulin-like growth hormone receptor 1 (IGF-I) and IGF-I receptor mRNA and proteins in human skin. *J Invest Dermatol* 99: 343-349

Uitto J, Bernstein EF; 1998:

Molecular mechanisms of cutaneous aging: connective tissue alterations in the dermis. *J Invest Dermatol Symp Proc* 3: 41-44

Wells JA, Cunningham BC, Fuh G, Lowman HB, Bass SH, Mulkerrin MG, Ultsch M, deVos AM, 1993:

The molecular basis for growth hormone-receptor interactions; *Recent Prog Horm Res.* 1993;48:253-75

Whitmore SE, Levine MA; 1998:

Risk factors for reduced skin thickness and bone density: possible clues regarding pathophysiology, prevention, and treatment. *J Am Acad Dermatol* 38: 248-255

Wieland Meng et al.,1998:

Endokrinologie

Wilhelm, B, Kann P, 2004:

Wachstumshormon und Knochen: Einfluss einer 7-jährigen Wachstumshormonsubstitution auf Knochenstoffwechsel, Knochendichte und Knochenqualität bei Erwachsenen mit einem Wachstumshormonmangel, *Igenta Connect, Medizinische Klinik* Volume 99, Number 10, October 2004, pp. 569-577(9)

Willing MC, Deschenes SP, Scott DA, Byers PH, Slayton RL, Pitts SH, Arikat H, Roberts EJ; 1994:

Osteogenesis imperfecta type I: molecular heterogeneity for COL1A1 null alleles of type I collagen. *Am J Hum Genet* 55: 638-647

Wong, G.L; Kotliar, D; Schlaeger, D, Brandes, S.J, 1990:

IGF-I production by mouse osteoblasts, *J Bone Miner Res.* (Band 5), Seite 133-140

Yuen KC, Dunger DB, 2006 Jul:

Impact of treatment with recombinant human GH and IGF-1 on visceral adipose tissue and glucose homeostasis in adults. *Growth hormon IGF Res.* ;16 Suppl A: 55-61, *Epub* 2006 Apr 18

Zarkovic M, Aimaretti G, Corneli G, Ghigo E, Deiguez C, Casanueva FF; 2003:
The effectiveness of arginine+GHRH test compared with GHRH+GHRP-6 test in
diagnosing GH deficiency in adults. Clin Endocrinol (Oxf) 2003; 59, 251-7

Zhao J, Jin L, Xiong M, 2006:

Test for interaction between two unlinked loci; Am J Hum Genet. 2006 Nov;79(5):831-45.
Epub 2006 Sep 21

Zöllner S, von Haeseler A, 2000:

A coalescent approach to study linkage disequilibrium between single-nucleotide
polymorphisms; Am J Hum Genet. 2000 Feb;66(2):615-28

10. Anhang

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Adamkiewicz, Basler, Baum, Becker, Eilers, Feuser, Gerdes, Geus, Gotzen, Griss, Happle, Hoffmann, Jungclas, Kann, Klenk, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lang, Lill, Maisch, Mandrek, Moll, Mutters, Oertel, Remschmidt, Renz, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schneyer, Seitz, Seybert, Studer, Vohland, Weihe, Wilke, Wolf

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Peter Herbert Kann für die Überlassung des Themas sowie die stets sehr freundliche und hilfreiche Unterstützung und Betreuung bei dieser Arbeit. Vielen Dank für die ständige Bereitschaft zur Beratung und Diskussion sowie die kritische Beleuchtung der Ergebnisse im Rahmen dieser Dissertation.

Im Weiteren gilt mein besonderer Dank Frau Dr. med. Silke Meyer, die mir mit zahlreichen Hilfestellungen bei der Durchführung sowie Gestaltung der Arbeit stets unermüdlich zur Seite stand.

Herzlicher Dank gilt Frau Bettina Kann sowie Frau Pia Schuhmacher des Bereichs Endokrinologie und Diabetologie der Universitätsklinik Marburg für ihre stets freundliche und engagierte organisatorische Unterstützung.

Danken möchte ich auch Frau Ellinor Brauss und allen weiteren wissenschaftlichen Mitarbeitern für die engagierte und konstruktive Mitarbeit im Labor.

Mein ausdrücklicher Dank gilt zudem meiner Schwester Dr. med. vet. Verena Haist, die mir mit Ihrer fachlichen Kompetenz und Erfahrung stets ein wichtiger Ratgeber war.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, meiner Großmutter und meinem Bruder Henning für ihre Liebe und Bedingungslosigkeit, mit der sie mich

auf meinem bisherigen Weg in allen Lebenslagen nach Kräften unterstützt haben und ohne die die Entstehung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Als letztes möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinem Ehemann Manuel Horn bedanken, der mir in der langen Zeit bis zur Fertigstellung dieser Arbeit immer motivierend zur Seite stand, und der einen erfolgreichen Abschluss nie bezweifelt hat.