

Aus der Medizinischen Klinik für Endokrinologie und Stoffwechselmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der ElonginBC-Cullin5-SOCS-box-Komplex als potentieller Biomarker  
für Patienten mit Wachstumshormonstörungen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Wilhelm Gossing

aus Berlin

Datum der Promotion: 04.03.2022

After sleeping through a hundred million centuries,  
We have finally opened our eyes on a sumptuous planet,  
sparkling with color, bountiful with life.  
Within decades we must close our eyes again.  
Isn't it a noble and enlightened way of spending our brief time in the sun,  
To work at understanding the universe and how we have come to wake up in it?

- Richard Dawkins

# Inhaltsverzeichnis

1. Abstract.....	4
2. Zusammenfassung .....	5
3. Einführung .....	6
4. Methoden.....	10
4.1 Patientenkollektiv .....	10
4.2 Probenvorbereitung .....	11
4.3 Genexpressionsanalyse .....	11
4.4 Proteinanalytik .....	11
4.5 Statistik .....	12
5. Ergebnisse .....	12
5.1 Patienten.....	12
5.2 Genexpressionsanalytik.....	13
5.3 IGF-1 .....	15
5.4 ECS-Komplex .....	15
6. Diskussion.....	20
7. Schlussfolgerung und Ausblick .....	24
8. Literaturverzeichnis.....	25
9. Eidesstattliche Versicherung.....	30
10. Auszug aus der Journal Summary List der Charité .....	32
11. Druckexemplar der ausgewählten Publikation.....	33
12. Lebenslauf .....	47
13. Publikationsliste .....	50
13.1 Publikationen .....	50
13.2 Poster.....	50
13.3 Präsentationen.....	50
13.4 Reviewertätigkeiten.....	50
14. Danksagung.....	51

## 1. Abstract

Growth hormone dysfunctions are metabolic diseases that are often caused by a benign pituitary tumor. While an increased secretion of growth hormone (GH) is called acromegaly, a hypofunction is called a GH deficiency (GHD). Both diseases are considered rare, as only one in 2.500 people are affected by either of them. Due to the subtle development of disease symptoms, initial diagnoses are often only made after 5+ years, when severe health problems have already manifested. For a diagnosis, a combination of provocation tests and biochemical markers is used, which can be hazardous and inaccurate at times. Therefore, there is a strong need for a novel diagnostic biomarker, which is able to clarify indistinct results beyond doubt. The intracellular protein complex ElonginBC-Cullin5-SOCS-box-complex (ECS-complex) regulates the cells' GH sensitivity through a negative feedback loop and thus represents a potential new biomarker for those diseases. In this study, individual ECS-complex proteins were measured in whole blood samples of patients with acromegaly or GHD and compared to healthy controls. The results showed significant differences in ECS-complex protein concentrations of pre- and postoperative patients of both disease types. Observed differences were most pronounced for the protein suppressor of cytokine signaling-2 (SOCS2), which showed the best diagnostic performance characteristics among the five components of the ECS-complex. Moreover, the low variations of protein concentrations in healthy controls allowed the definition of narrow reference ranges and furthermore showed no dependencies on age, gender or body-mass-index. Hierarchical clustering demonstrated a superior discriminative power when using a combination of SOCS2, Cullin-5 and Ring-box protein-2. This allowed the correct classification of 100% of study participants, leading to a perfect sensitivity and specificity in all four patient groups. The direct comparison to the standard biomarker Insulin-like growth factor-1 demonstrates its superior diagnostic performance and therefore illustrates its high potential as a novel biomarker for the diagnostics of GH-related diseases.

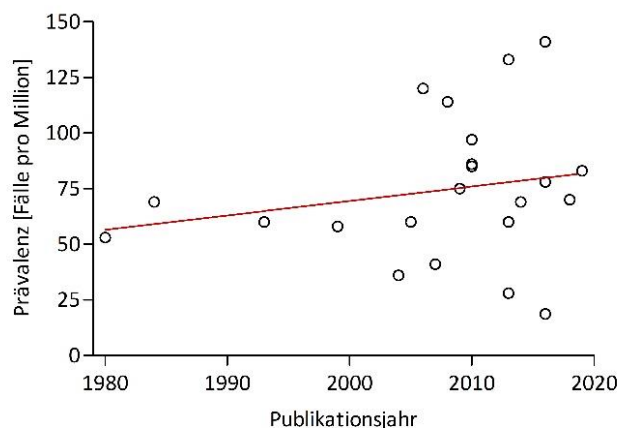
## 2. Zusammenfassung

Wachstumshormonstörungen sind Stoffwechselkrankheiten, die zumeist durch gutartige Tumoren in der Hypophyse verursacht werden. Während eine erhöhte Ausschüttung von Wachstumshormon (GH) Akromegalie genannt wird, nennt man den GH-Mangel Wachstumshormondefizienz (GHD). Zusammen betreffen beide Krankheitsformen etwa eine von 2.500 Personen, weshalb sie zu den seltenen Erkrankungen zählen. Durch die schleichende Entwicklung der Krankheitssymptome werden die entsprechenden Diagnosen oft erst nach mehr als 5 Jahren gestellt, wenn sich bereits deutlich gesundheitliche Probleme bei den Patienten manifestiert haben. Die Diagnostik erfolgt durch eine Kombination aus Provokationstests und biochemischen Markern, die jedoch teils gefährlich und ungenau sein können. Daher widmet sich diese Arbeit der Untersuchung des ElonginBC-Cullin5-SOCS-box-Komplex (ECS-Komplex) als neuem, potentiellen Biomarker, mit dem eine zweifelsfreie Abklärung unklarer Diagnosen möglich gemacht werden soll. Dieser intrazelluläre Proteinkomplex wird von GH stimuliert und reguliert die Sensitivität der Zelle gegenüber dem GH, wodurch er in direkter Wechselwirkung mit der GH-Konzentration im Blut steht. Die Methodik dieser Arbeit bestand in der Messung der fünf Proteine dieses Proteinkomplexes im Blut von Patienten mit GHD oder Akromegalie sowie von gesunden Kontrollen. Wie sich zeigte, wiesen prä- sowie postoperative Patienten beider Krankheitsformen teils signifikante Unterschiede in der Konzentration der ECS-Komplex-Proteine auf. Diese Unterschiede waren für das Protein Suppressor of cytokine signalling 2 (SOCS2) am deutlichsten, weshalb es die höchste diagnostische Sensitivität und Spezifität unter den fünf Komponenten des ECS-Komplex zeigte. Besonders vorteilhaft sind auch die geringen Schwankungen der Proteinkonzentrationen in den gesunden Kontrollen, wodurch sich enge Referenzbereiche definieren ließen. Außerdem zeigten die gemessenen Proteinkonzentrationen keine Abhängigkeiten von Alter, Geschlecht oder Body-Mass-Index. Durch hierarchisches Clustern konnte gezeigt werden, dass die Kombination der drei Proteine SOCS2, Cullin-5 und RING-box protein-2 eine wesentlich bessere Unterscheidung zwischen Patienten und Kontrollen ermöglichte als die Verwendung eines einzelnen Proteins. Dadurch ließen sich 100 % der Studienteilnehmer korrekt klassifizieren, wodurch in allen vier Patientengruppen eine perfekte Sensitivität und Spezifität erreicht wurde. Ein Vergleich mit dem Standard-Biomarker Insulin-like Growth Factor-1 verdeutlicht die bessere diagnostische Güte des ECS-Komplex und weist diesen somit als eine attraktive Biomarker-Alternative für die Diagnostik der Akromegalie und GHD aus.

### 3. Einführung

Die Hypophyse ist eine hormonproduzierende Drüse im Bereich des Zwischenhirns. Die dort produzierten Hormone steuern eine Reihe lebensnotwendiger Stoffwechselprozesse. Eines dieser Hormone ist das Wachstumshormon (GH), das neben der Regulation von Zell- und Knochenwachstum auch den Energie- und Fettstoffwechsel diktiert. Diese Arbeit beschäftigt sich mit Unregelmäßigkeiten in der hypophysären Produktion des GH, die je nach Ausprägung zu den Krankheiten Akromegalie oder Wachstumshormondefizienz (GHD) führen. Die hauptsächliche Ursache für diese Unregelmäßigkeiten ist im Falle der Akromegalie ein somatotrophes Hypophysenadenom, das die pulsatile Ausschüttung des GH in eine konstante Sekretion umwandelt und so dessen Serumkonzentration dauerhaft erhöht. Bei der GHD, die sich durch eine verringerte Sekretion von GH auszeichnet, haben mehrere Ursachen nennenswerte Anteile an der Krankheitsentstehung. Tumore innerhalb oder im Bereich der Hypophyse bleiben dennoch die häufigste Ursache [1].

Diese Hypophysentumore sind gutartig und treten bei ca. 17 % der Bevölkerung im Laufe des Lebens auf, wie eine Metaanalyse von 2004 ergab [2]. Oft bleiben sie allerdings unentdeckt und führen zu keinen Symptomen. Nur ca. 0,04 % der Betroffenen entwickelt klinisch relevante Symptome (endokrine Dysfunktionen oder Masseneffekte), die einer Behandlung bedürfen [3]. In den letzten Jahrzehnten gab es vermehrt Studien zur Prävalenz der Akromegalie, die 60-100 Fälle pro Million Einwohner ergaben und eine hohe Varianz zeigten [4-20]. Dabei zeichnete sich ein leichter Anstieg der Prävalenz ab, der auf eine breitere Aufklärung bei Allgemeinmedizinern und eine Verringerung der Mortalität durch eine bessere medizinische Versorgung zurückzuführen ist (Abb. 1).



**Abbildung 1** Errechnete Prävalenzraten der Akromegalie aus Veröffentlichungen der letzten 40 Jahre [4-20].

Untersuchungen zur Verbreitung der GHD sind deutlich seltener und geben diese Krankheit mit 290-460 Fällen pro Million Einwohner an [21].

Durch die schleichende Entwicklung beider Krankheiten beträgt die durchschnittliche Zeit zwischen dem Auftreten erster Symptome und der Diagnose 5-25 Jahre, sodass sich die veränderte Hormonsekretion in Diabetes, Bluthochdruck und Herz-Kreislaufschäden manifestieren kann [22]. Dies führt im Endeffekt zu einer Erhöhung der Mortalität um das Zwei- bis Dreifache [23, 24].

Durch die späte Diagnose sind ca. 73 % der Tumoren bei ihrer Entdeckung bereits Makroadenome (> 1 cm), wodurch die Chance ihrer erfolgreichen Entfernung gegenüber Mikroadenomen um ca. 30 % geringer ist [11, 25]. Die Möglichkeit einer früheren Diagnose hätte demnach einen großen Mehrwert für Patienten, da Symptome verringert und Heilungschancen erhöht werden könnten.

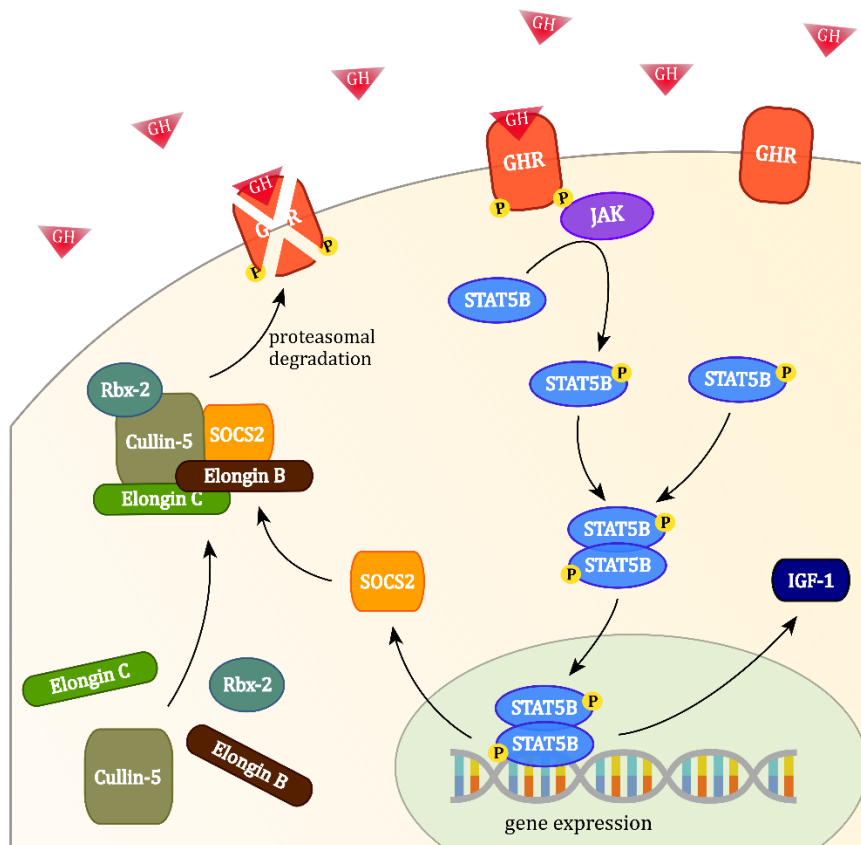
Die Diagnostik der Wachstumshormonstörungen wird durch einen Provokationstest und unterstützend durch die Messung des Serum-Biomarkers Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) durchgeführt. Zumeist wird der Insulintoleranztest bei der GHD und der GH-Suppressionstest bei der Akromegalie genutzt. Beide Tests sind allerdings zeitintensiv und beinhalten komplexe sowie teilweise gefährliche Verfahren [26]. Ein Provokationstest allein reicht jedoch nicht aus, um eine Wachstumshormonstörung zweifelsfrei zu diagnostizieren, weshalb man sich eines zweiten Tests mit IGF-1 bedient. Die Serumkonzentration von IGF-1 ist jedoch von Faktoren wie Alter, Geschlecht und Ethnie abhängig, was bei der Auswertung berücksichtigt werden muss [27]. Außerdem hat IGF-1 einen sehr breiten Referenzbereich, wodurch Werte in den Grenzbereichen nur unzuverlässig eingeordnet werden können. Dies ist besonders problematisch für die Diagnostik der GHD, da sich ca. 30 % der Werte von Patienten mit GH-Mangel mit denen von Gesunden überschneiden [28]. Hinzu kommt, dass es eine Vielzahl verschiedener Assays zur IGF-1 Bestimmung gibt und trotz vorhandener Standardisierung unterschiedliche Referenzwertetabellen genutzt werden. Eine Studie, die den IGF-1 Wert einer Akromegaliepatientin in 23 unabhängigen Labors messen und auswerten ließ, erhielt in 30 % der Tests ein negatives Ergebnis. Dabei zeigte sich außerdem, dass die oberen Limits der verwendeten Referenzbereiche um bis zu 50 % variierten [29]. Weiterhin lässt sich anhand von Provokations- oder IGF-1-Tests schwer das individuelle Ansprechverhalten auf eine medikamentöse Therapie einschätzen, sodass die optimale Medikamentendosis für jeden Patienten über Monate und teils Jahre hinweg empirisch per Titration ermittelt werden muss.

Ein zu IGF-1 alternativer Biomarker könnte das Risiko der durch Fehldosierungen entstehenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen reduzieren und Fehldiagnosen aufgrund unklarer Testergebnisse minimieren.

In dieser Arbeit wurde der ElonginB/C-Cullin5-SOCS-box-complex (ECS-Komplex) als potentielle Alternative zu IGF-1 untersucht, da er durch seine Verbindung zum und seinen Einfluss auf den GH-Metabolismus einen vielversprechenden Biomarker darstellt. Der ECS-Komplex besteht aus den fünf Proteinen Suppressor of cytokine signalling 2 (SOCS2), Elongin B (EloB), Elongin C (EloC), Cullin-5 und RING-box protein 2 (Rbx-2). Diese Proteine können zusammen aktivierte GH-Rezeptoren (GHR) für den proteasomalen Abbau markieren und steuern somit die Sensitivität der Zelle gegenüber GH. Da die Expression des SOCS2 durch die vom GH ausgelöste Signalkaskade stimuliert wird, ergibt sich ein negativer Feedback-Mechanismus [30].

Im Detail beginnt dieser Mechanismus durch die Bindung von GH an den GHR, der folglich von der Janus Kinase (JAK) 2 phosphoryliert wird. Dadurch bindet nun der Signal Transducer and Activator of Transcription 5B (STAT5B) an den GHR und wird daraufhin ebenfalls durch JAK phosphoryliert. STAT5B dimerisiert und kann nun im Nukleus (u.a.) den Promotor des SOCS2-Gens aktivieren und somit dessen Expression initiieren. Die fünf Proteine des ECS-Komplex können daraufhin im Cytoplasma assoziieren und mithilfe der SH2-Domäne von SOCS2 an die phosphorylierten Tyrosine Y487 und Y595 des GHR binden. Rbx-2 wird nun aktiv, indem es Ubiquitin-Moleküle an den GHR anlagert, sodass dieser vom Proteasom erkannt und folglich abgebaut wird (Abb. 2) [31]. Da SOCS2 auf diese Weise nur an phosphorylierte/aktivierte GH-Rezeptoren bindet, kann die Zelle gegenüber niedrigen GH-Konzentrationen im Blut empfindlich bleiben. Mutationen an den Stellen dieser zwei Aminosäuren des GHR unterbinden die inhibitorische Wirkung des ECS-Komplexes [32].





**Abbildung 2** Signalkaskade der intrazellulären SOCS2-Induktion. Die Bindung des Wachstumshormons (GH) am GH-Rezeptor aktiviert den Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Signalweg. Aktiviertes STAT5B wirkt als Transkriptionsfaktor für den Suppressor of cytokine signalling 2 (SOCS2) im Zellkern. Im Cytoplasma bildet SOCS2 zusammen mit vier weiteren Proteinen den ECS-Komplex. Phosphorylierte GH-Rezeptoren werden durch den ECS-Komplex erkannt und mittels Anlagerung von Ubiquitin für den proteasomalen Abbau markiert. Genehmigter Abdruck aus "The ElonginB/C-Cullin5-SOCS-Box-Complex Is A Potential Biomarker for Growth Hormone Disorders", 2021, Gossing W, Radke L, Biering H, Diederich S, Mai K, Frohme M. Biomedicines. 2021;9(2), 201 [33].

Die negative Regulierung des GH-Stoffwechsels wurde erstmals beobachtet, als SOCS2-defiziente Mäuse um 40 % größer und schwerer wurden als der Wild-Typ des gleichen Wurfs [34]. In Akromegaliepatienten wurde bereits eine signifikant höhere Expression des SOCS2 nachgewiesen, was eine Korrelation zu diesem Krankheitstyp unterstützt und gleichzeitig offenbart, dass extreme GH-Konzentrationen nicht durch die Regulierung seitens SOCS2 ausgeglichen werden können [35]. Die Stimulierung der SOCS2-Expression durch GH wurde erstmals im Jahr 1998 nachgewiesen [36]. Sie erfolgt gleichmäßig und steigt langsam über einen Zeitraum von 24 Stunden an [37]. Daher kann man von einer Expression ausgehen, die sich im täglichen Verlauf nicht sprunghaft ändert. Somit wäre eine klinische Probenahme flexibler und nicht an eine bestimmte Tageszeit gebunden.

Über die C-terminale SOCS-box Domäne interagiert SOCS2 mit EloB, EloC und Cullin-5 [38, 39].

EloB und EloC unterstützen die korrekte Faltung von SOCS2 und stabilisieren den ECS-Komplex [40]. Cullin-5 ist das größte Protein im ECS-Komplex und fungiert als Rückgrat, indem es die Substraterkennungseinheit SOCS2 mit der E3 Ubiquitin-Ligase Rbx-2 verbindet. Die RING-finger-Domäne des Rbx-2 ermöglicht die Markierung des GHR mit Ubiquitin-Molekülen, sodass dieser vom Proteasom erkannt werden kann [41].

In früheren Versuchen konnte bereits die GH-abhängige Genexpression des ECS-Komplexes bei einer kleineren Gruppe von Akromegalie- und GHD-Patienten in den peripheren Zellen des mononukleären Blutes (PBMCs) nachgewiesen werden [42]. In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich die Proteinkonzentrationen des ECS-Komplexes in diesen Patientengruppen bestimmt, um deren Eignung als diagnostische Biomarker für die personalisierte Medizin zu untersuchen.

## **4. Methoden**

### *4.1 Patientenkollektiv*

Für die Durchführung dieser Studie wurde eine Genehmigung der Ethikkommission der Landesärztekammer Berlin eingeholt. Alle Studienteilnehmer gaben vor der Blutentnahme eine schriftliche Einverständniserklärung ab und wurden ärztlich aufgeklärt. Es wurden Daten zu Alter, Geschlecht, Body-Mass-Index (BMI) und ggf. Therapie der Teilnehmenden aufgenommen. Probanden für die Kontrollgruppe wurden in einer regionalen Arztpraxis rekrutiert. Sie mussten über 40 Jahre alt sein und durften keine bekannten Tumorerkrankungen oder Stoffwechselstörungen haben.

Für die Experimentalgruppe wurden Patienten, bei denen Akromegalie oder GHD diagnostiziert wurde, aus vier endokrinologischen Praxen rekrutiert.

Ausschlusskriterien für alle Probanden waren die Teilnahme an einer anderen klinischen Studie, der Konsum harter Drogen oder eine Erkältungskrankheit (Rhinitis) zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Die Diagnose der Akromegalie wurde mithilfe des IGF-1 sowie anhand einer unzureichenden Suppression des Serum-GH Spiegels auf  $<0.4$  ng/ml nach Provokation mit Glukose gestellt. Eine GHD wurde durch eine unzureichende GH Sekretion nach einer Insulin-induzierten Hypoglykämie sowie durch IGF-1 diagnostiziert.

## 4.2 Probenvorbereitung

Von jedem Probanden wurden vormittags zwischen 7 und 12 Uhr 5 ml Vollblut abgenommen. Das Blut wurde in K<sub>2</sub>/EDTA Vacutainer-Röhrchen auf Eis binnen weniger Stunden ins Labor zur weiteren Verarbeitung transportiert. Die Extraktion der RNA für die Real-Time PCR erfolgte aus 400 µl Vollblut und mit dem NucleoSpin RNA Blood Kit (Macherey-Nagel). Ertrag und Reinheit wurden mit dem NanoDrop ND1000 (Nanodrop Instruments) gemessen und die Integrität der RNA mit dem DNF-472 HS RNA Kit auf dem Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies) überprüft. Für die nachfolgende Real-Time PCR wurden 300 ng Total-RNA mit Maxima Reverser Transkriptase (Thermo Fisher Scientific) und Oligo-dT Primern in cDNA umgeschrieben.

Für die Proteinanalytik wurden zunächst 0.17 M Ammoniumchloridlösung zu 2 ml Vollblut für eine Lyse der Erythrozyten gegeben. Nach 10 Minuten wurde für 5 Minuten bei 453 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet zweimal mit kalter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und durch anschließende Zentrifugation gewaschen. Die pelletierten PBMCs wurden im Anschluss bei -80°C bis zur Analyse eingefroren.

## 4.3 Genexpressionsanalyse

Die Bestimmung der relativen mRNA-Expression erfolgte entsprechend dem Protokoll von Gossing et al. auf dem Light Cycler 480 (Roche Diagnostics) [42]. Unterschiedlich war jedoch die Verwendung der Referenzgene *ACTB*, *B2M* und *GAPDH* zur Normalisierung der Daten.

## 4.4 Proteinanalytik

Die Bestimmung des IGF-1 der Blutproben wurde mit dem Immulite 2000 (Siemens AG) durchgeführt. Zur Klassifikation der Proben wurde die altersabhängige Referenztabelle der beteiligten Praxis herangezogen.

Für die Analyse der Proteine des ECS-Komplexes wurden die zuvor eingefrorenen PBMCs in kaltem PBS aufgetaut und deren Zellzahl am Cedex XS (Roche Innovatis AG) bestimmt. Anschließend wurden die Zellen auf 4\*10<sup>6</sup> Zellen pro ml mit PBS verdünnt und mit dem Precellys (Bertin Instruments) homogenisiert. Dazu wurden 1.4 mm Zirconiumoxid-Beads in zwei Zyklen mit jeweils 5.000 rpm für 15 Sekunden verwendet. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Zellreste durch Zentrifugation bei 5.000 x g für 5 Minuten entfernt.

Die Konzentrationsbestimmung von SOCS2, EloB, Cullin-5 und Rbx-2 wurde mit kommerziellen enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kits der Firma Abbexa Ltd (Cambridge, UK) entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Für EloC wurde weder ein ELISA-Kit noch ein funktionaler Antikörper gefunden, sodass dieses Protein nicht gemessen werden konnte.

#### 4.5 Statistik

Genannte Messwerte bezeichnen stets den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung sofern es nicht anders angegeben ist. Lineare Korrelationskoeffizienten und Zweistichproben-t-Tests wurden mit GraphPad Prism 5 berechnet. Für das Signifikanzniveau wurden p-Werte  $<0,05$  festgelegt. Die Proteinkonzentrationen beziehen sich auf eine Million Zellen und wurden mithilfe der 5-Parameter logistischen Regression aus den Messwerten abgeleitet [43]. Ausreißer der Kontrollgruppendaten wurden durch die normalisierte mittlere absolute Abweichung vom Median bestimmt [44]. Die Hierarchische Clusteranalyse nach Ward wurde in R Statistics v3.5.2 durchgeführt [45]. Proteinkombinationen von SOCS2, Cullin-5 und Rbx-2 (SCR-Index) wurden nach Skalierung der Daten mit unterschiedlicher Gewichtung auf Basis ihrer diagnostischen Richtigkeit für jede Patientengruppe separat erstellt [46].

### 5. Ergebnisse

#### 5.1 Patienten

Für die Kontrollgruppe konnten 14 Probanden (8 männlich, 6 weiblich) mit einem Durchschnittsalter von  $62,9 \pm 13,1$  Jahren rekrutiert werden. Der BMI der Gruppe lag bei  $27,1 \pm 4,8$   $\text{kg}/\text{m}^2$ . Demgegenüber wurden insgesamt 44 Patienten mit Wachstumshormonstörungen für die Studie gewonnen. Davon hatten 32 Patienten eine diagnostizierte Akromegalie (Alter= $48,2 \pm 14,1$ ; BMI= $29,8 \pm 5,7$   $\text{kg}/\text{m}^2$ ) und 12 eine diagnostizierte GHD (Alter= $51,0 \pm 11,7$ ; BMI= $28,0 \pm 4,5$   $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Unter den Akromegaliepatienten gab es neun Erstdiagnosen, die noch keinerlei Behandlung erhalten hatten. Bei der GHD war dies bei fünf Patienten der Fall. Diese neudiagnostizierten Patienten wurden den Gruppen präoperative Akromegalie bzw. präoperative GHD zugewiesen. Den übrigen 23 Akromegaliepatienten und 7 GHD-Patienten wurde vor der Blutabnahme bereits der Hypophysentumor entfernt. Sie wurden den Gruppen postoperative Akromegalie bzw.

postoperative GHD zugewiesen. Darüber hinaus erhielten 15 Patienten in der Gruppe der postoperativen Akromegalie Medikamente gegen Wachstumshormonüberschuss (Somatostatin-Analoga/GHR-Blocker). In der Gruppe der postoperativen GHD erhielten vier Patienten täglich rekombinantes GH zur Behandlung ihrer GH-Insuffizienz.

Alle postoperativen Patienten zeigten einen normalen IGF-1 Wert und damit bereits eine Kontrolle der Erkrankung. Eine Übersicht der Patientendaten ist in Tabelle 1 dargestellt.

Beim Alter bestand zwischen der Kontroll- und Patientengruppe zwar ein signifikanter Unterschied ( $p=0,002$ ), jedoch waren die durchschnittlichen BMI-Werte beider Gruppen zueinander nicht signifikant verschieden ( $p=0,08$ ).

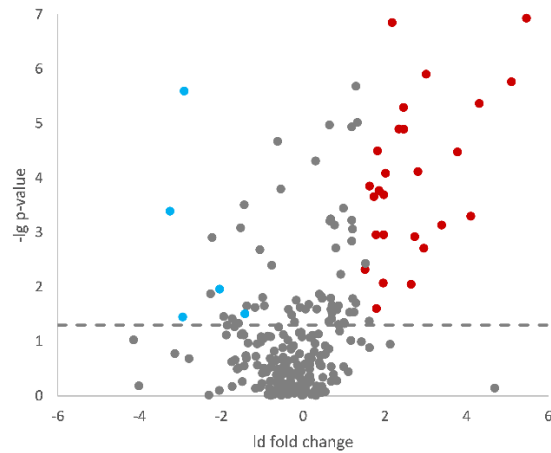
**Tabelle 1** Gruppeneinteilung und biometrische Daten der Studienteilnehmer

	Akromegalie			GHD			Kontrollen		
	Alter	BMI	(m/w)	Alter	BMI	(m/w)	Alter	BMI	(m/w)
<b>präoperativ</b>	50,0±19,0	31,7±6,8	4/5	48,4±13,4	30,2±3,7	3/2	62,9±13,1	27,1±4,8	8/6
<b>postoperativ</b>	47,4±12,1	30,3±5,8	2/21	52,9±11,0	28,8±5,2	3/4			

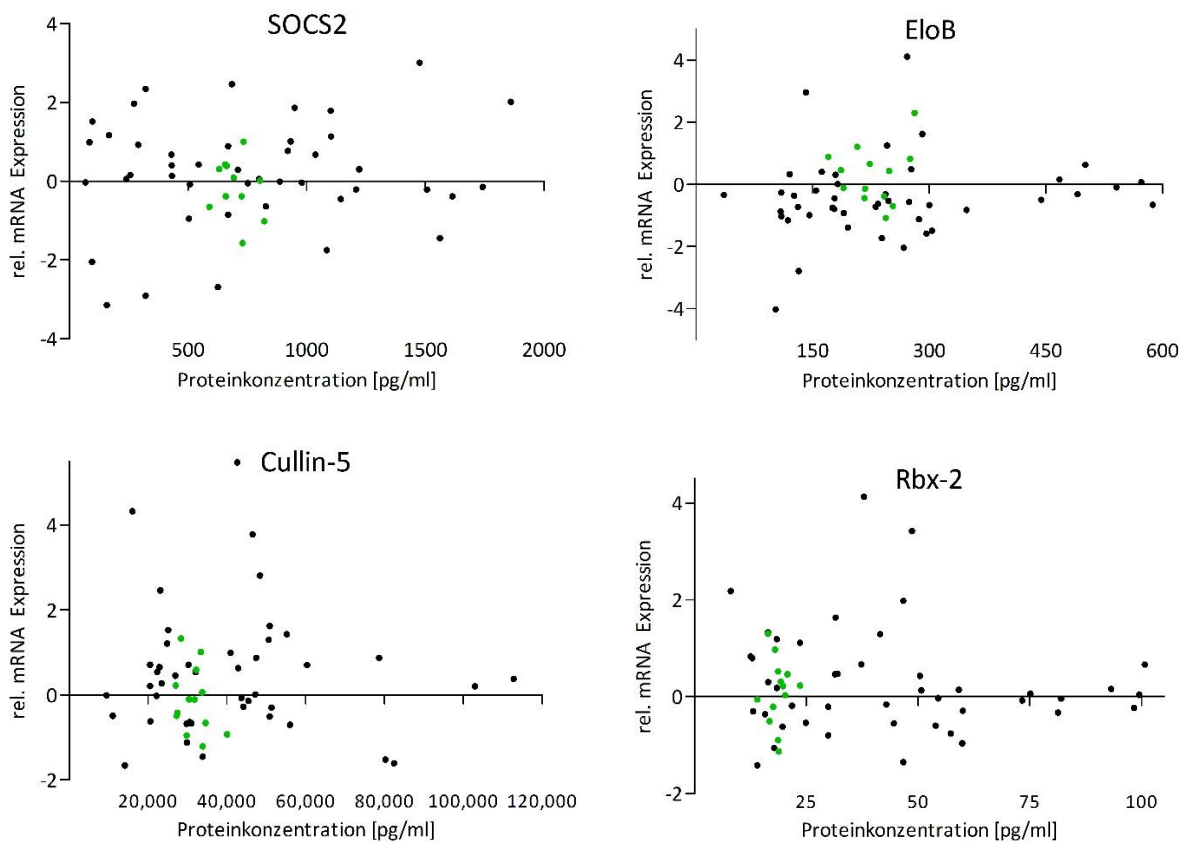
## 5.2 Genexpressionsanalytik

Bei allen Proben wurde die mRNA-Expression der fünf Gene des ECS-Komplexes via Real-Time PCR gemessen und mithilfe eines Referenzgenindex, bestehend aus den drei Genen *ACTB*, *B2M* und *GAPDH*, normalisiert. Dabei ergaben sich hohe Variationskoeffizienten bei der Kontrollgruppe, die zwischen 75 % (Cullin-5 und Rbx-2) und 85 % (EloC) lagen. Aufgrund dessen lagen nur 18 % der Patientendaten außerhalb des 95 % Konfidenzintervalls der Kontrollgruppe. Insgesamt sind jedoch nur 13 % der Werte signifikant gegenüber der Kontrollgruppe verändert (Abb. 3). Die *SOCS2* Expression war bei 22 % der Proben signifikant verändert, während beim Gen des EloB mit nur 6 % die wenigsten Veränderungen zu beobachten waren. Von den insgesamt 70 Werten der 14 präoperativen Patienten beider Krankheitsformen sind nur neun Werte signifikant verändert und es zeigen sich keine Häufungen in einer der Subgruppen oder einem der Gene, die auf eine Korrelation hindeuten würden.

In der Abbildung 4 ist vergleichend die Streuung der Messwerte der Genexpression gegen jene der Proteinkonzentrationen aufgetragen. Es wird ersichtlich, dass die deutlich geringeren Variationskoeffizienten der Proteinexpression (9,9 % bis 16 %) eine bessere Unterscheidung zwischen Patienten und Kontrollen ermöglichen.



**Abbildung 3** Volcano-Plot der Genexpressionsdaten von allen fünf untersuchten Genen. Die gestrichelte Linie zeigt das Signifikanzniveau von  $p < 0.05$  an. Signifikant hochregulierte Expressionswerte sind in rot dargestellt. Signifikant herunterregulierte Expressionswerte erscheinen blau. Durch die unterschiedlichen Standardabweichungen in den fünf Genen ergeben sich verschiedene Grenzwerte für tatsächliche Expressionsunterschiede.



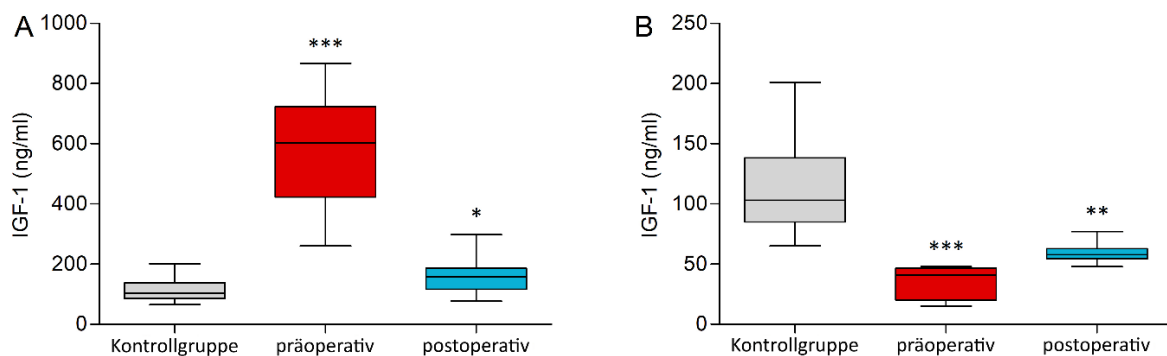
**Abbildung 4** Messwerte der ELISA-Daten im Vergleich mit der Genexpression für die vier Proteine SOCS2, EloB, Cullin-5 und Rbx-2. Die Messwerte der Kontrollgruppe sind grün hervorgehoben und veranschaulichen die geringeren Variationskoeffizienten in den Proteindaten.

### 5.3 IGF-1

Die Probanden der Kontrollgruppe zeigten IGF-1 Werte von  $113,8 \pm 39,4$  ng/ml und somit einen Variationskoeffizienten von 34,6 %. Alle Werte lagen innerhalb des altersabhängigen Referenzbereichs.

Alle Werte der präoperativen Akromegaliegruppe lagen oberhalb des altersabhängigen Referenzbereichs und waren mit  $580,9 \pm 202,6$  ng/ml den Kontrollen gegenüber deutlich erhöht ( $p < 0,0001$ ). Die IGF-1 Werte der postoperativen Akromegaliepatienten lagen im Normalbereich, waren jedoch gegenüber den Kontrollen erhöht ( $155,2 \pm 51,4$  ng/ml;  $p = 0,01$ ; Abb. 5 A).

Bei den GHD Patientengruppen zeigten alle präoperativen Proben reduzierte IGF-1 Werte in Bezug auf die altersabhängigen Referenzwerte ( $34,8 \pm 14,2$  ng/ml), wobei vier der fünf Proben dieser Gruppe nur marginal unterhalb des Referenzbereichs lagen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war deren Mittelwert außerdem signifikant reduziert ( $p = 0,0005$ ). Die Werte aller postoperativen GHD Patienten lagen im Normalbereich, unterschieden sich jedoch trotzdem signifikant von den Kontrollen ( $58,8 \pm 8,8$  ng/ml;  $p = 0,002$ ; Abb. 5 B).



**Abbildung 5** IGF-1 Werte der Akromegaliepatienten (A) und GHD Patienten (B) im Vergleich zu den Kontrollen. Signifikante Unterschiede gegenüber den Kontrollen sind oberhalb der Boxplots gekennzeichnet (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

Genehmigter Abdruck aus "The ElonginB/C-Cullin5-SOCS-Box-Complex Is A Potential Biomarker for Growth Hormone Disorders", 2021, Gossing W, Radke L, Biering H, Diederich S, Mai K, Frohme M. Biomedicines. 2021; 9(2), 201 [33].

### 5.4 ECS-Komplex

In den ELISA-Tests wurden für den ECS-Komplex Konzentrationen von  $690,9 \pm 68,7$  pg/ml für SOCS2,  $223,3 \pm 36,0$  pg/ml für EloB,  $31,1 \pm 3,9$  ng/ml für Cullin-5 und  $18,5 \pm 2,4$  pg/ml für Rbx-2 ermittelt. Damit zeigten die Proteine relativ niedrige Variationskoeffizienten zwischen 9,9 % für SOCS2 bis 16 % für EloB.

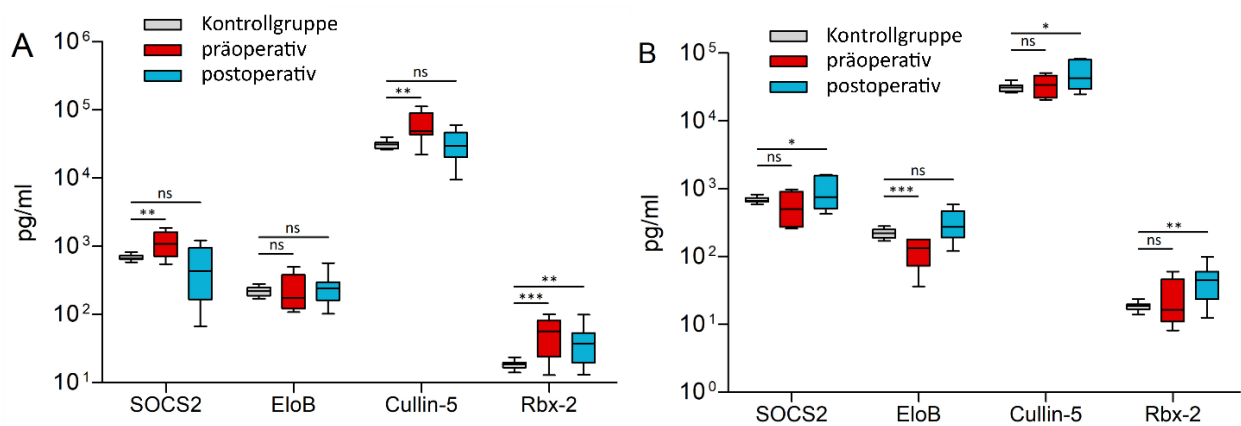
Die präoperativen Akromegaliepatienten zeigten gegenüber den Kontrollen in drei der vier

gemessenen Proteine deutlich höhere Werte (Abb. 6 A). Die Werte von Rbx-2 waren dreimal so hoch wie die der Kontrollen ( $56,4 \pm 31,1$  pg/ml) und zeigten somit den signifikantesten Unterschied ( $p=0,0002$ ). Cullin-5 war um 96 % erhöht ( $60,99 \pm 30,29$  ng/ml;  $p=0,001$ ) und SOCS2 um 63 % ( $1128,8 \pm 471,0$  pg/ml;  $p=0,003$ ). Nur bei EloB war kein signifikanter Unterschied festzustellen ( $243,8 \pm 153,4$  pg/ml;  $p=0,63$ ). Hingegen blieb bei den postoperativen Akromegaliepatienten nur bei Rbx-2 ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen bestehen ( $p=0,001$ ). Insgesamt war Rbx-2 in 72 % aller Proben und damit am häufigsten gegenüber den Kontrollen erhöht. Bei SOCS2 ließ sich eine besonders hohe Varianz in der postoperativen Akromegalie feststellen und außerdem waren 52 % der SOCS2-Werte dieser Gruppe reduziert. Die höchsten Werte der vier Proteine wurden in einer Probe eines präoperativen Akromegaliepatienten gemessen, wobei diese mit einem IGF-1 von 260 ng/ml nur geringfügig oberhalb des klinischen Referenzbereichs lag.

Bei Patienten mit einer präoperativen GHD zeigten nur die EloB-Werte einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollen ( $126,8 \pm 58,8$  pg/ml;  $p=0,0004$ ). Dennoch waren auch einige SOCS2 und Rbx-2 Werte deutlich reduziert bzw. erhöht, was sich jedoch nicht in den Mittelwerten widerspiegelte. Im Vergleich dazu zeigte die postoperative GHD-Gruppe höhere Werte, die gegenüber den Kontrollen bei SOCS2 ( $p=0,04$ ), Cullin-5 ( $p=0,01$ ) und Rbx-2 ( $p=0,001$ ) signifikant erhöht waren (Abb. 6 B).

Außerdem ergaben sich keine linearen Zusammenhänge zwischen dem Alter der Kontrollen und deren SOCS2- ( $r=0,04$ ;  $p=0,89$ ), EloB- ( $r=0,29$ ;  $p=0,32$ ), Cullin-5- ( $r=-0,5$ ;  $p=0,07$ ) oder Rbx-2-Werten ( $r=-0,09$ ;  $p=0,75$ ). Auch die BMI-Werte der Kontrollen zeigten keine Korrelationen zu SOCS2 ( $r=0,24$ ;  $p=0,43$ ), EloB ( $r=0,09$ ;  $p=0,76$ ), Cullin-5 ( $r=-0,03$ ;  $p=0,91$ ) oder Rbx-2 ( $r=0,14$ ;  $p=0,64$ ). Ebenfalls ergaben sich keine signifikanten Geschlechtsunterschiede bei den Proteinwerten von SOCS2 ( $p=0,54$ ), EloB ( $p=0,13$ ), Cullin-5 ( $p=0,43$ ) oder Rbx-2 ( $p=0,35$ ) für die Kontrollen.



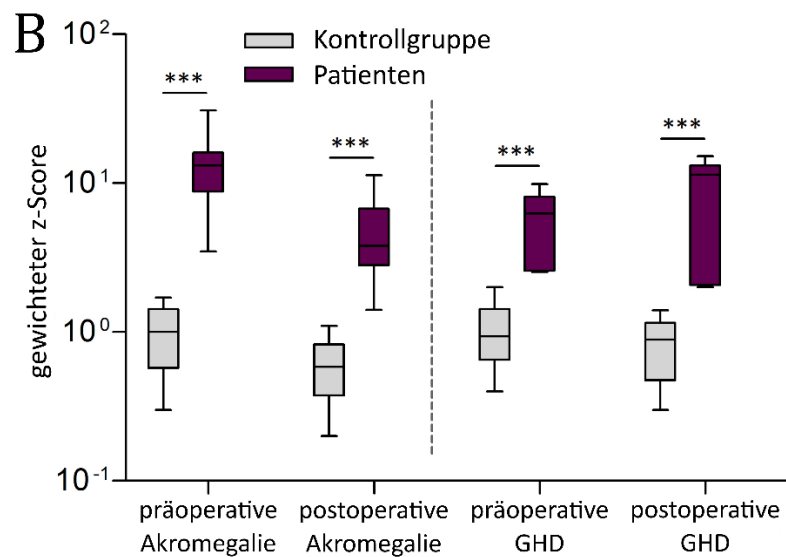
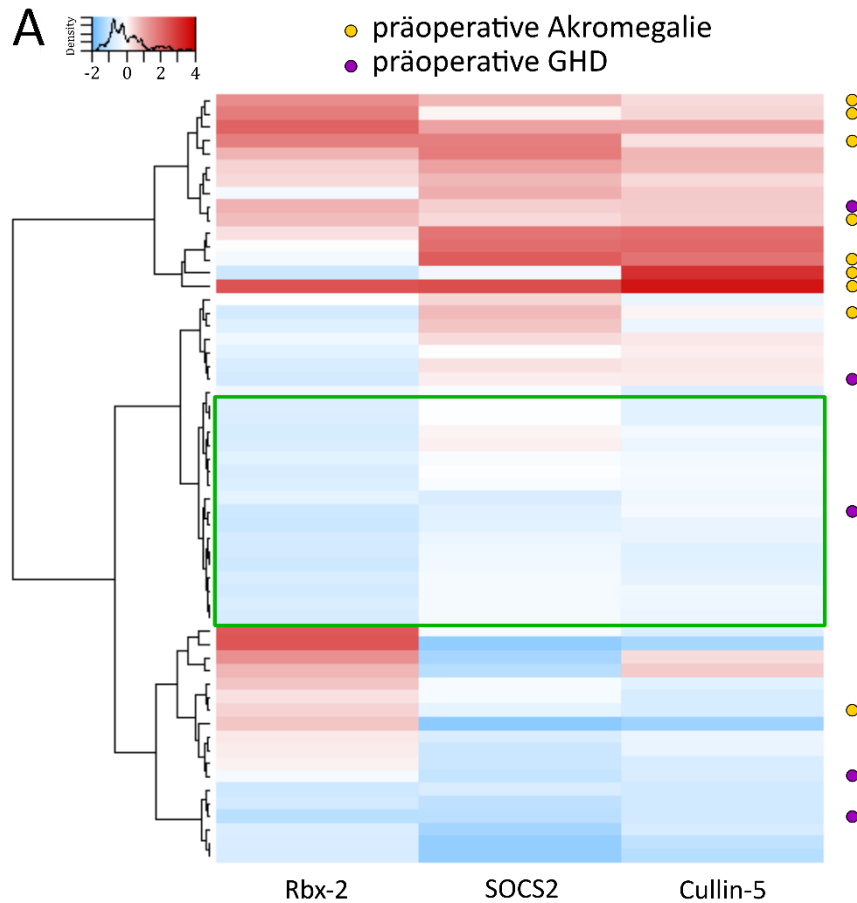


**Abbildung 6** Die Ergebnisse der ELISA-Tests zeigen teils signifikante Unterschiede in den Konzentrationen der ECS-Komplex Proteine zwischen Gesunden und Akromegaliepatienten (A) sowie GHD-Patienten (B). Die Signifikanzwerte sind jeweils oberhalb der Boxplots angegeben (ns=nicht signifikant, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

Genehmigter Abdruck aus "The ElonginB/C-Cullin5-SOCS-Box-Complex Is A Potential Biomarker for Growth Hormone Disorders", 2021, Gossing W, Radke L, Biering H, Diederich S, Mai K, Frohme M. *Biomedicines*. 2021;9(2), 201 [33].

Für die Mustererkennung in den ELISA-Daten wurde eine Clusteranalyse durchgeführt. Durch hierarchisches Clustern der Ergebnisse von SOCS2, Cullin-5 und Rbx-2 wurde die beste Auftrennung erzielt, da auf diese Weise 93 % der Patienten von den Kontrollen separiert werden konnten. Es ergaben sich drei Hauptcluster, wobei alle Kontrollen in einem Cluster lagen und diese nur sehr geringe Unterschiede zueinander zeigten (Abb. 7 A, grüne Box). Die Werte der präoperativen Akromegaliepatienten waren fast ausschließlich im Cluster der höheren Werte zu finden. Allerdings trennten sich die Werte der Akromegaliepatienten nicht von den GHD Patienten und auch in Bezug auf die prä- und postoperativen Subgruppen ergab sich kein klares Muster.

Aufgrund dieser Clusterergebnisse wurden die Werte von SOCS2, Cullin-5 und Rbx-2 basierend auf ihren Werten in den jeweiligen Gruppen kombiniert. Die sich dadurch ergebenden SCR-Indizes konnten alle Subgruppen sowie auch alle einzelnen Patientenwerte deutlich von den Kontrollen unterscheiden (Abb. 7 B).



**Abbildung 7** (A) Heatmap der Cullin-5, SOCS2 und Rbx-2 Proteinwerte von allen Studienproben. Die grüne Box markiert den Bereich, in dem sich die Werte aller 14 Kontrollen wiederfinden. Die farbigen Punkte am rechten Rand markieren die Werte der präoperativen Akromegalie- (gelb) bzw. GHD-Patienten (lila). (B) Die gewichtete Kombination der z-scores der drei Proteine SOCS2, Cullin-5 und Rbx-2 (SCR-Index) führt zu einer deutlich verbesserten Unterscheidbarkeit der Patienten von den Kontrollen. Signifikanzwerte sind jeweils oberhalb der Boxplots angegeben (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

Genehmigter Abdruck aus "The ElonginB/C-Cullin5-SOCS-Box-Complex Is A Potential Biomarker for Growth

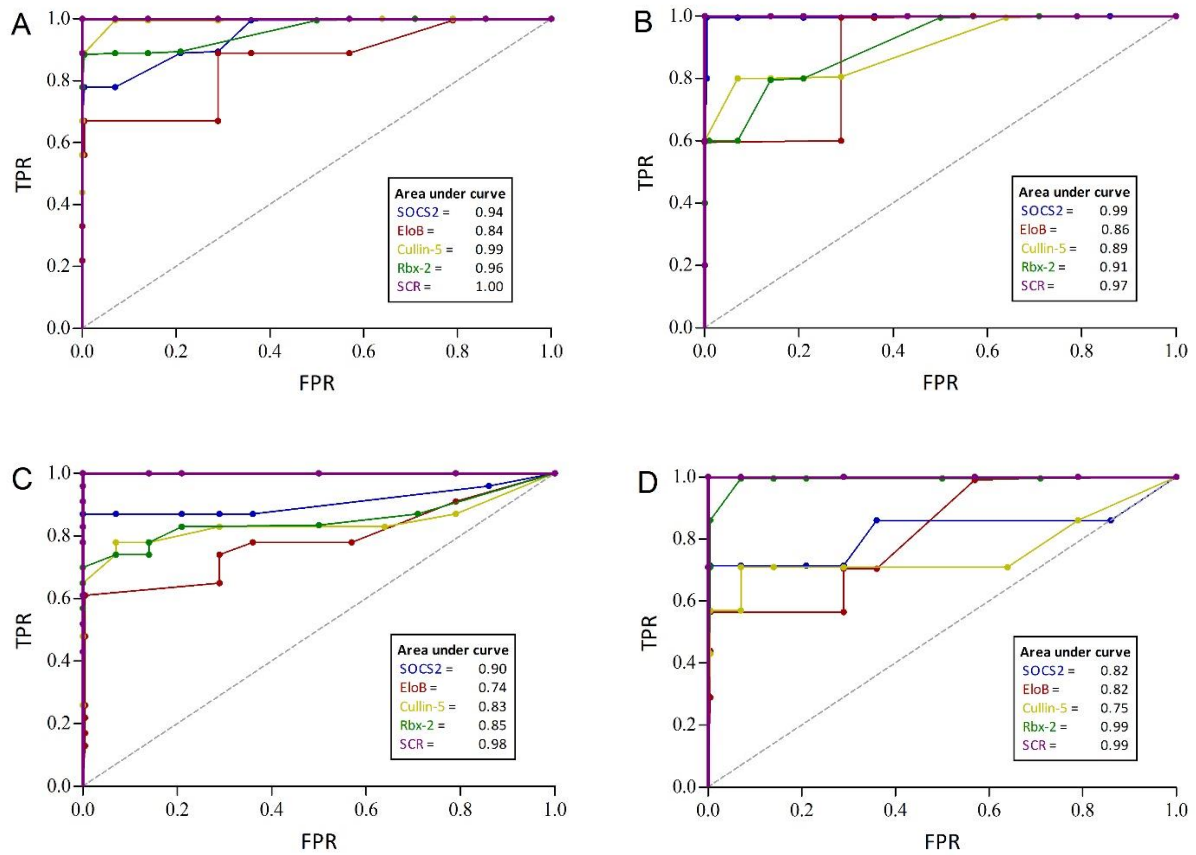
Hormone Disorders“, 2021, Gossing W, Radke L, Biering H, Diederich S, Mai K, Frohme M. Biomedicines. 2021;9(2), 201 [33].

Zur Beurteilung des diagnostischen Potentials der Messergebnisse wurden statistische Gütekriterien für die Proteine des ECS-Komplexes ermittelt. Diese wurden separat für alle vier Subgruppen erstellt, wobei Patienten grundsätzlich als positiv und Kontrollen als negativ betrachtet wurden. Dazu wurden Grenzwertoptimierungskurven (ROC-Kurven) erstellt, um deren Klassifikation zu veranschaulichen.

Für Patienten der präoperativen Akromegaliegruppe ergaben sich die höchsten Vertrauenswahrscheinlichkeiten für SOCS2 (0,91), Cullin-5 (0,96) und Rbx-2 (0,96, Abb. 8 A). Die höchsten Sensitivitäten erreichten Cullin-5 (1,0) und Rbx-2 (0,89). In der präoperativen GHD-Gruppe erreichten diese beiden Proteine nur Sensitivitäten von 0,6 (Rbx-2) bzw. 0,8 (Cullin-5), während SOCS2 alle Patienten dieser Gruppe korrekt identifizierte. Außerdem erreichte SOCS2 eine Spezifität von 1,0 und einen area under the curve (AUC) Wert von 0,99 (Abb. 8 B).

In der Gruppe der postoperativen Akromegalie zeigte SOCS2 mit einer Sensitivität von 0,87, einer Spezifität von 1,0 und einem AUC von 0,90 die besten Werte (Abb. 8 C). In der postoperativen GHD Gruppe konnte Rbx-2 die meisten Probanden korrekt klassifizieren und so einen AUC von 0,99 erreichen. (Abb. 8 D). Insgesamt zeigte SOCS2 im Schnitt die höchste Vertrauenswahrscheinlichkeit mit Werten zwischen 0,9 und 1,0 in den vier Gruppen.

Die Verwendung des kombinierten SCR-Indexes lieferte erneut deutlich bessere Ergebnisse, da mit diesem alle Patienten korrekt als positiv und alle Kontrollen korrekt als negativ in allen vier Gruppen fehlerfrei klassifiziert werden konnten. Demnach ergab sich für den SCR-Index stets eine Sensitivität und Spezifität von 1,0. Außerdem ergaben sich AUC-Werte von 0,97 bis 1,0 (Abb. 8 A-D).



**Abbildung 8** ROC-Kurven der ECS-Komplex Proteine und des kombinierten SCR-Indexes für präoperative Akromegalie (A), präoperative GHD (B), postoperative Akromegalie (C) und postoperative GHD (D). SCR = Kombination aus SOCS2, Cullin-5 und Rbx-2. AUC Werte aller Marker sind jeweils in den kleinen Kästchen dargestellt. Genehmigter Abdruck aus "The ElonginB/C-Cullin5-SOCS-Box-Complex Is A Potential Biomarker for Growth Hormone Disorders", 2021, Gossing W, Radke L, Biering H, Diederich S, Mai K, Frohme M. *Biomedicines*. 2021;9(2), 201 [33].

## 6. Diskussion

Dies ist die erste Studie, die sich den Veränderungen der Proteinkonzentrationen des ECS-Komplexes im Blut von Patienten mit Akromegalie bzw. GHD widmet. Es konnte gezeigt werden, dass veränderte Serumkonzentrationen dieser Proteine mit diesen Krankheiten in Verbindung stehen, wobei die Veränderungen bei nativen Patienten am deutlichsten sind.

Beim Vergleich der Protein- und mRNA-Daten ließ sich erkennen, dass die Variationskoeffizienten der Kontrollgruppe bei allen vier Proteinen wesentlich kleiner als bei der Genexpression sind. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass gerade bei den hier gemessenen geringen Expressionen kleinste Unterschiede in den anfänglichen Reaktionsbedingungen durch die exponentielle Natur der qPCR-Reaktion zu erheblichen Unterschieden führen können, die sich in allgemein schlechter

Reproduzierbarkeit niederschlagen. Eine weitere Ursache für Diskrepanzen zwischen Gen- und Proteinexpression könnte außerdem die posttranskriptionelle Regulation durch z.B. Wechselwirkungen der mRNA mit komplementären microRNAs oder long non-coding RNAs (silencing/sponging) sein. Letztlich wurde hierdurch ersichtlich, dass die Proteindaten des ECS-Komplexes besser zur Unterscheidung von Patienten und Kontrollen und damit zur Krankheitsbestimmung geeignet sind als die mRNA-Expression. Bei der weiteren Analyse wurden deshalb nur die Proteindaten berücksichtigt.

Die beobachtete Variation der Proteinwerte war außerdem auch deutlich kleiner als die Variation des IGF-1 in den Kontrollen. Der breite Referenzbereich des IGF-1 ist bekannt und einer der Gründe für die teilweise beobachtete Unzuverlässigkeit dieses Markers bei der Krankheitsdiagnostik. Der ECS-Komplex zeigt durch die geringere Variation hingegen eine stabile Normalexpression, was auf einen engeren Referenzbereich hindeutet. Dadurch ist eine genauere Abgrenzung der Gesundheitsstatus möglich und demzufolge auch eine verlässlichere Diagnostik. Patienten mit normalem IGF-1 sind nicht zweifelsfrei symptomfrei. Das bezeugen einerseits die häufig beobachteten Überschneidungen der IGF-1 Werte von GHD Patienten mit dem Normalbereich [28] und andererseits auch die normalen IGF-1 Werte von Akromegaliepatienten, die trotzdem Symptome zeigen [47]. Ein Grund dafür ist auch, dass das Ziel einer Therapie bei Akromegalie bzw. bei GHD ist, den IGF-1 Wert der Patienten auf Werte zu bringen, die dem Normalwert  $\pm$  zwei Standardabweichungen entsprechen. Dies könnte nun bedeuten, dass viele postoperative Patienten mit normalem IGF-1 in dieser Studie eben nicht symptomfrei sind und somit deren ECS-Komplex Werte außerhalb des Referenzbereichs der Kontrollen erklären. Engere Referenzbereiche der ECS-Komplex Proteine könnten demnach den Nachweis milderer Krankheitsaktivität ermöglichen und somit die Effektivität der Behandlungen steigern.

Des Weiteren wurde keine Abhängigkeit der Proteindaten von Alter, BMI oder Geschlecht gefunden, sodass die Biometrie des Patienten bei Verwendung der ECS-Marker nicht mit der Diagnostik interferiert. Zwar wurde in Mäusen ein Anstieg der SOCS2 Expression nach Estradiolgabe beobachtet, jedoch geschah dies mit einer superphysiologischen Konzentration an Estradiol, die im Menschen so nicht vorkommen kann [48]. In dieser Studie unterscheiden sich die SOCS2 Werte zwischen Männern und Frauen der Kontrollgruppe nur um 3 % und suggerieren damit keinerlei Trend. Allerdings wurden diese Ergebnisse in einer relativ kleinen Kontrollgruppe erzielt und sind deshalb nur bedingt aussagekräftig.

Die gemessenen Proteinkonzentrationen von SOCS2, Cullin-5 und Rbx-2 waren in den

präoperativen Akromegaliepatienten deutlich erhöht, sodass diese möglicherweise für die Krankheitsdiagnostik interessant sein könnten. Bei den Patienten der postoperativen Akromegalie und GHD zeigten sich überdies in fast allen Fällen geringere Unterschiede zu den Kontrollen als dies bei den präoperativen Patienten der Fall ist. Das zeigt, dass sich anhand der ECS-Komplex Proteine eine Abmilderung der Krankheitsaktivität nach der operativen Tumorentfernung feststellen lässt. Durch eine Kombination der drei Proteine SOCS2, Cullin-5 und Rbx-2 konnte ein Index-Parameter erstellt werden, der eine deutlich bessere Unterscheidbarkeit von Patienten und Kontrollen gegenüber der Verwendung eines einzelnen Proteins ermöglichte. Die berechneten hochsignifikanten Unterschiede sprechen für ein exzellentes diagnostisches Potential des SCR-Indexes mit deutlich gesteigerter Effektivität gegenüber der Messung eines Einzelparameters.

Weiterhin ließ sich in den Daten beobachten, dass die ECS-Komplex Proteine gemeinsam reguliert zu sein scheinen, da sie innerhalb einzelner Patienten miteinander stark korrelieren. Rbx-2 scheint dabei jedoch eine Ausnahme zu sein, da es keine Korrelation zu den anderen Proteinen zeigt und somit womöglich unabhängig reguliert wird.

Der von SOCS2 abhängige Feedback-Mechanismus zeigt eine stärkere Aktivität in jüngeren Patienten und stützt somit eine Studie, die eine höhere Expression von SOCS2-mRNA in Akromegaliepatienten unter 60 Jahren beobachtet hat [35]. Der Median der hier gemessenen SOCS2-Werte der Akromegaliepatienten über 60 Jahre war gegenüber den Kontrollen um 15 % erhöht, während er bei den Patienten unter 60 Jahre um 57 % erhöht war ( $p=0,008$ ). Da dieser altersabhängige Effekt nicht bei den Teilnehmern der Kontrollgruppe beobachtet werden konnte, betrifft er möglicherweise nur die Stimulation von SOCS2, ohne dass dadurch die Basalwerte beeinflusst werden. Letztendlich könnte dies die Nützlichkeit von SOCS2 als diagnostischem Marker bei älteren Patienten beeinträchtigen. Des Weiteren wurde bei Mäusen beobachtet, dass sich SOCS2 nur bei geringen Konzentrationen inhibitorisch auf das Wachstum auswirkt, während es bei hohen Konzentrationen scheinbar verstärkt wurde [49, 50]. Dementsprechend könnten die hohen Konzentrationen von SOCS2 in den präoperativen Akromegaliepatienten bedeuten, dass es nicht seine biologische Schutzfunktion gegenüber den hohen GH Konzentrationen einnimmt. Die verringerten Konzentrationen in 60 % der präoperativen GHD-Patienten suggerieren jedoch, dass die Hemmung des GH Metabolismus unterdrückt wird und sich somit die Frage stellt, welche Konzentrationen von SOCS2 für den menschlichen Körper tatsächlich ‚niedrig‘ bzw. ‚hoch‘ sind, sodass sich eine Inhibition bzw. Potenzierung des von SOCS2

vermittelten Mechanismus entsprechend der oben zitierten Studie ergibt.

Durch die Berechnung statistischer Parameter konnte die Eignung der ECS-Komplex Proteine als diagnostische Biomarker genauer verglichen werden. In fast allen Fällen lag die Spezifität der gemessenen Proteine zur korrekten Einordnung gesunder Probanden bei 100 %. Lediglich für Cullin-5 ergab sich in den zwei präoperativen Gruppen eine etwas geringere Spezifität von 93 %. Insgesamt zeigte SOCS2 unter den einzelnen Proteinen die besten Ergebnisse, da seine diagnostische Vertrauenswahrscheinlichkeit mit durchschnittlich 0,93 vor der von Rbx-2 (0,90), Cullin-5 (0,87) oder EloB (0,85) lag. Aufgrund dieser hohen Werte ist SOCS2 dadurch am besten als einzelner Biomarker für Akromegalie oder GHD geeignet. Das Clustern der Messwerte ergab allerdings, dass eine Kombination von SOCS2, Cullin-5 und Rbx-2 eine bessere Unterscheidung zwischen Patienten und Kontrollen ermöglicht, als dies durch SOCS2 alleine möglich wäre. Das war in allen vier Subgruppen und sogar bei der präoperativen GHD der Fall, obwohl dort EloB den signifikantesten Unterschied zeigte. Der SCR-Index konnte alle Patienten sowie Kontrollen korrekt klassifizieren und zeigte somit eine perfekte Sensitivität und Spezifität in allen vier Subgruppen. Er identifizierte außerdem auch Patienten mit einem normalen IGF-1 als positiv. Auf diese Weise konnte durch den kombinierten SCR-Index die Sensitivität als auch die diagnostische Güte gegenüber den einzelnen Proteinen weiter erhöht werden. Studien, die die diagnostischen Fähigkeiten von IGF-1 darstellen, sind hingegen umstritten. Die durch eine Metaanalyse berechneten Durchschnittswerte für IGF-1 bei der GHD ergaben eine Sensitivität von 0,66, Spezifität von 0,69 und einen AUC-Wert von 0,78 und deuten dadurch nur einen schwachen diagnostischen Nutzen an [51]. Durch die ungenaue Abgrenzung im unteren Konzentrationsbereich ist die Diagnose einer GHD anhand von IGF-1 am unzuverlässigsten. Ein alternativer Biomarker wäre deshalb an dieser Stelle besonders hilfreich. Außerdem sprechen die beobachteten Unterschiede der ECS-Komplex Proteine in den postoperativen Patienten mit normalem IGF-1 nicht dafür, dass diese Patienten als kontrolliert eingestuft werden sollten. Vielmehr könnten bei diesen Fällen noch biochemisch krankhafte Prozesse existieren, die durch den breiten IGF-1 Normalbereich maskiert werden und in der Dauer zu relevanten Symptomen führen können. Aufgrund dessen deuten diese Ergebnisse auf eine bessere Identifikation krankhafter Zustände in postoperativen Patienten oder während der Therapie durch den SCR-Index hin. Vergleichbare Werte zur Bewertung des diagnostischen Nutzens von IGF-1 bei Akromegalie konnten leider nicht gefunden werden, jedoch sprechen diese Ergebnisse auch für eine ausgezeichnete diagnostische Performance des SCR-Index bei Akromegalie.

Überdies ließ sich den Erwartungen entsprechend keine Korrelation irgendeines ECS-Komplex Proteins mit IGF-1 feststellen, da auch SOCS2-defiziente Mäuse nach GH Gabe keine erhöhte IGF-1 Expression zeigten [52]. Der direkte Vergleich des ECS-Komplex mit IGF-1 ist außerdem schwierig, da dieses als Teil der Diagnose der Patienten in dieser Studie verwendet wurde. Zur besseren Vergleichbarkeit könnte ein Fragebogen zur Lebensqualität zum Einsatz kommen, da durch diesen relevante Verbesserungen des Krankheitszustandes ersichtlich sein können, ohne dass sich der IGF-1 signifikant verändert [53]. Es konnten leider keine Blutproben von Patienten während ihrer Phase der Dosisoptimierung gesammelt werden, die den Nutzen des ECS-Komplex für die Therapiekontrolle und das individuelle Ansprechverhalten der Patienten gegenüber ihrer medikamentösen Therapie hätten darstellen können. Eine weitere Limitierung dieser Studie ist die relativ kleine Kontrollgruppe, sodass die Aussagekraft des Einflusses der biometrischen Parameter auf den ECS-Komplex eingeschränkt ist. Womöglich bilden diese 14 Kontrollen auch nicht das gesamte Spektrum der ECS-Komplex Proteinkonzentrationen ab, die für gesunde Menschen als normal betrachtet werden können und stellen demnach keine optimale Referenz für die Bewertung der Patientendaten dar. Die Ergebnisse dieser Studie sollten demnach durch größere Patientenkohorten und mit einer größeren Kontrollgruppe verifiziert werden, um mehr über die Bedeutung des ECS-Komplex bei Akromegalie und GHD herauszufinden. Womöglich bieten diese Proteine nicht nur Potential als neue Biomarker, sondern könnten auch als therapeutisches Target interessant sein.

## **7. Schlussfolgerung und Ausblick**

Mit dieser Arbeit wurde erstmalig der Nutzen des ECS-Komplex für die Diagnostik von GH Störungen untersucht. Es konnten signifikante Unterschiede in allen vier untersuchten Proteinen des ECS-Komplex zwischen Patienten mit Akromegalie oder GHD und gesunden Kontrollen gezeigt werden. Die geringen Schwankungen der Proteinkonzentrationen in der Kontrollgruppe in Verbindung mit den signifikanten Unterschieden bei den Patienten stellen diese Proteine als vielversprechende Biomarker heraus. Darüber hinaus zeigten die Werte keine Abhängigkeit von Alter, Geschlecht oder BMI, sodass auf biometrische Unterschiede in der personalisierten Medizin womöglich weniger geachtet werden müsste.

Insgesamt erzielte das Protein SOCS2 als einzelner Marker die besten diagnostischen



Eigenschaften durch seine exzellente Sensitivität, Spezifität und Vertrauenswahrscheinlichkeit. Durch Kombination von SOCS2 mit Cullin-5 und Rbx-2 zum SCR-Index konnten alle Patienten und Kontrollen korrekt klassifiziert werden und so die diagnostische Leistung dieser Proteine weiter verbessert werden. Aus diesem Grund erscheint diese Kombination an Proteinen ein sensibler und spezifischer Biomarker für Akromegalie und GHD zu sein.

In zukünftigen Studien könnte auch die Messung von SOCS3 in diesen Patientengruppen interessant sein, da dieses in Fibroblasten von Patienten mit idiopathischem Kleinwuchs unter basalen Bedingungen eine ähnliche Expressionsveränderung wie das SOCS2 aufwies und sich außerdem in diesen Patienten durch Gabe von GH stimulieren ließ [54]. Durch diese direkte Verbindung des SOCS3 zum GH Metabolismus könnte möglicherweise eine bessere Krankheitskorrelation als bei manchen Komponenten des ECS-Komplex bestehen und sich dadurch eine noch bessere Proteinkombination ergeben.

Der Einsatz von Proteinen in minimal-invasiven Schnelltests ist außerdem eine etablierte Methode, um die Durchführung und Auswertung der Labortests für Personal und Patienten zu vereinfachen. Daher wäre es perspektivisch möglich, die hier durchgeführten Assays zu miniaturisieren und z.B. als Lab-on-a-Chip System in den klinischen Alltag zu integrieren. Die Möglichkeit der Auswertung krankheitsspezifischer Blutparameter zur Identifizierung des bestmöglichen Therapieansatzes für immer mehr Krankheiten erhöht Kosten und Aufwand, sodass eine Vereinfachung der Nachweismethoden für die personalisierte Medizin der Zukunft eine bedeutende Rolle spielt.

Ungeachtet dieser Möglichkeiten sind weitere Patientendaten zum ECS-Komplex erforderlich, damit dieser in Zukunft einen attraktiver Biomarker ergeben könnte, der als Alternative bei unklaren IGF-1 Werten, bei der Aufklärung des Operationserfolgs, bei der medikamentösen Therapiekontrolle oder auch als Ersatz potentiell gefährlicher Provokationstests eingesetzt werden könnte.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Webb SM, Strasburger CJ, Mo D, Hartman ML, Melmed S, Jung H, Blum WF, Attanasio AF; HypoCCS International Advisory Board. Changing patterns of the adult growth hormone deficiency diagnosis documented in a decade-long global surveillance database. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Feb;94(2):392-9. doi: 10.1210/jc.2008-0713. Epub 2008 Nov 11. PMID: 19001512.

2. Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML, McCutcheon IE. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer*. 2004 Aug 1;101(3):613-9. doi: 10.1002/cncr.20412. PMID: 15274075.
3. Day PF, Loto MG, Glerean M, Picasso MF, Lovazzano S, Giunta DH. Incidence and prevalence of clinically relevant pituitary adenomas: retrospective cohort study in a Health Management Organization in Buenos Aires, Argentina. *Arch Endocrinol Metab*. 2016 Nov-Dec;60(6):554-561. doi: 10.1590/2359-3997000000195. Epub 2016 Aug 25. PMID: 27982201.
4. Hoskuldottir GT, Fjalldal SB, Sigurjonsdottir HA. The incidence and prevalence of acromegaly, a nationwide study from 1955 through 2013. *Pituitary*. 2015 Dec;18(6):803-7. doi: 10.1007/s11102-015-0655-4. PMID: 25893613.
5. Sesmi I G. Epidemiología de la acromegalia en España [Epidemiology of acromegaly in Spain]. *Endocrinol Nutr*. 2013 Oct;60(8):470-4. Spanish. doi: 10.1016/j.endonu.2012.09.010. Epub 2012 Dec 13. PMID: 23246411.
6. Burton T, Le Nestour E, Neary M, Ludlam WH. Incidence and prevalence of acromegaly in a large US health plan database. *Pituitary*. 2016 Jun;19(3):262-7. doi: 10.1007/s11102-015-0701-2. PMID: 26792654; PMCID: PMC4858553.
7. Alexander L, Appleton D, Hall R, Ross WM, Wilkinson R. Epidemiology of acromegaly in the Newcastle region. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1980 Jan;12(1):71-9. doi: 10.1111/j.1365-2265.1980.tb03135.x. PMID: 7379316.
8. Bengtsson BA, Edén S, Ernest I, Odén A, Sjögren B. Epidemiology and long-term survival in acromegaly. A study of 166 cases diagnosed between 1955 and 1984. *Acta Med Scand*. 1988;223(4):327-35. doi: 10.1111/j.0954-6820.1988.tb15881.x. PMID: 3369313.
9. Etxabe J, Gaztambide S, Latorre P, Vazquez JA. Acromegaly: an epidemiological study. *J Endocrinol Invest*. 1993 Mar;16(3):181-7. doi: 10.1007/BF03344942. PMID: 8514973.
10. Holdaway IM, Rajasoorya C. Epidemiology of Acromegaly. *Pituitary*. 1999;2:29-41. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1009965803750>.
11. Mestron A, Webb SM, Astorga R, Benito P, Catala M, Gaztambide S, Gomez JM, Halperin I, Lucas-Morante T, Moreno B, Obiols G, de Pablos P, Paramo C, Pico A, Torres E, Varela C, Vazquez JA, Zamora J, Albareda M, Gilabert M. Epidemiology, clinical characteristics, outcome, morbidity and mortality in acromegaly based on the Spanish Acromegaly Registry (Registro Espanol de Acromegalia, REA). *Eur J Endocrinol*. 2004 Oct;151(4):439-46. doi: 10.1530/eje.0.1510439. PMID: 15476442.
12. Bex M, Abs R, T'Sjoen G, Mockel J, Velkeniers B, Muermans K, Maiter D. AcroBel--the Belgian registry on acromegaly: a survey of the 'real-life' outcome in 418 acromegalic subjects. *Eur J Endocrinol*. 2007 Oct;157(4):399-409. doi: 10.1530/EJE-07-0358. PMID: 17893253.
13. Fernandez A, Karavitaki N, Wass JA. Prevalence of pituitary adenomas: a community-based, cross-sectional study in Banbury (Oxfordshire, UK). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010 Mar;72(3):377-82. doi: 10.1111/j.1365-2265.2009.03667.x. Epub 2009 Jul 24. PMID: 19650784.
14. Fontana E, Gaillard R. Epidemiologie des adénomes hypophysaires: étude dans une agglomération urbaine de Suisse [Epidemiology of pituitary adenoma: results of the first Swiss study]. *Rev Med Suisse*. 2009 Oct 28;5(223):2172-4. French. PMID: 19968031.
15. Cannavò S, Ferrà F, Ragonese M, Curtò L, Torre ML, Magistri M, Marchese A, Alibrandi A, Trimarchi F. Increased prevalence of acromegaly in a highly polluted area. *Eur J Endocrinol*. 2010 Oct;163(4):509-13. doi: 10.1530/EJE-10-0465. Epub 2010 Jul 9. PMID: 20621957.
16. Mercieca C, Gruppeta M, Vassallo J. Epidemiology, treatment trends and outcomes of acromegaly. *Eur J Intern Med*. 2012 Dec;23(8):e206-7. doi: 10.1016/j.ejim.2012.07.010. Epub 2012 Aug 22. PMID: 22921824.
17. Kwon O, Song YD, Kim SY, Lee EJ; Rare Disease Study Group, Science and Research Committee, Korean Endocrine Society. Nationwide survey of acromegaly in South Korea. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013 Apr;78(4):577-85. doi: 10.1111/cen.12020. PMID: 22909047.
18. López Gavilanez E, Guerrero Franco K, Solórzano Zambrano N, Navarro Chávez M, López Estrella C, Vaca Burbano L, Marriott Díaz E. Epidemiology of acromegaly in Ecuador. *Endocrinol Nutr*. 2016 Aug-

- Sep;63(7):333-8. English, Spanish. doi: 10.1016/j.endonu.2016.03.009. Epub 2016 May 4. PMID: 27158065.
19. Dal J, Feldt-Rasmussen U, Andersen M, Kristensen LØ, Laurberg P, Pedersen L, Dekkers OM, Sørensen HT, Jørgensen JO. Acromegaly incidence, prevalence, complications and long-term prognosis: a nationwide cohort study. *Eur J Endocrinol*. 2016 Sep;175(3):181-90. doi: 10.1530/EJE-16-0117. Epub 2016 Jun 8. PMID: 27280374.
  20. Gatto F, Trifirò G, Lapi F, Cocchiara F, Campana C, Dell'Aquila C, Ferrajolo C, Arvigo M, Cricelli C, Giusti M, Ferone D. Epidemiology of acromegaly in Italy: a analysis from a large longitudinal primary care database. *Endocrine*. 2018 Sep;61(3):533-541. doi: 10.1007/s12020-018-1630-4. Epub 2018 May 24. PMID: 29797214.
  21. Regal M, Páramo C, Sierra SM, Garcia-Mayor RV. Prevalence and incidence of hypopituitarism in an adult Caucasian population in northwestern Spain. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001 Dec;55(6):735-40. doi: 10.1046/j.1365-2265.2001.01406.x. PMID: 11895214.
  22. Colao A, Grasso LFS, Giustina A, Melmed S, Chanson P, Pereira AM, Pivonello R. Acromegaly. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Mar 21;5(1):20. doi: 10.1038/s41572-019-0071-6. Erratum in: *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Oct 21;5(1):72. PMID: 30899019.
  23. Holdaway IM, Bolland MJ, Gamble GD. A meta-analysis of the effect of lowering serum levels of GH and IGF-I on mortality in acromegaly. *Eur J Endocrinol*. 2008 Aug;159(2):89-95. doi: 10.1530/EJE-08-0267. Epub 2008 Jun 4. PMID: 18524797.
  24. Rosén T, Bengtsson BA. Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism. *Epidemiology*. 1990 Aug;336:285-288. doi: 10.1016/0140-6736(90)91812-O.
  25. Ntali G, Karavitaki N. Recent advances in the management of acromegaly. *F1000Res*. 2015 Dec 11;4:F1000 Faculty Rev-1426. doi: 10.12688/f1000research.7043.1. PMID: 26918140; PMCID: PMC4754011.
  26. Zadik Z, Chalew SA, Gilula Z, Kowarski AA. Reproducibility of growth hormone testing procedures: a comparison between 24-hour integrated concentration and pharmacological stimulation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990 Nov;71(5):1127-30. doi: 10.1210/jcem-71-5-1127. PMID: 2229276.
  27. Frystyk J, Freda P, Clemmons DR. The current status of IGF-I assays--a 2009 update. *Growth Horm IGF Res*. 2010 Feb;20(1):8-18. doi: 10.1016/j.jghir.2009.09.004. Epub 2009 Oct 8. PMID: 19818658; PMCID: PMC7748085.
  28. Hilding A, Hall K, Wivall-Helleryd IL, Sääf M, Melin AL, Thorén M. Serum levels of insulin-like growth factor I in 152 patients with growth hormone deficiency, aged 19-82 years, in relation to those in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Jun;84(6):2013-9. doi: 10.1210/jcem.84.6.5793. PMID: 10372703.
  29. Pokrajac A, Wark G, Ellis AR, Wear J, Wieringa GE, Trainer PJ. Variation in GH and IGF-I assays limits the applicability of international consensus criteria to local practice. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007 Jul;67(1):65-70. doi: 10.1111/j.1365-2265.2007.02836.x. Epub 2007 Apr 15. PMID: 17437512.
  30. Flores-Morales A, Greenhalgh CJ, Norstedt G, Rico-Bautista E. Negative regulation of growth hormone receptor signaling. *Mol Endocrinol*. 2006 Feb;20(2):241-53. doi: 10.1210/me.2005-0170. Epub 2005 Jul 21. PMID: 16037128.
  31. Vesterlund M, Zadjali F, Persson T, Nielsen ML, Kessler BM, Norstedt G, Flores-Morales A. The SOCS2 ubiquitin ligase complex regulates growth hormone receptor levels. *PLoS One*. 2011;6(9):e25358. doi: 10.1371/journal.pone.0025358. Epub 2011 Sep 29. PMID: 21980433; PMCID: PMC3183054.
  32. Uyttendaele I, Lemmens I, Verhee A, De Smet AS, Vandekerckhove J, Lavens D, Peelman F, Tavernier J. Mammalian protein-protein interaction trap (MAPPIT) analysis of STAT5, CIS, and SOCS2 interactions with the growth hormone receptor. *Mol Endocrinol*. 2007 Nov;21(11):2821-31. doi: 10.1210/me.2006-0541. Epub 2007 Jul 31. PMID: 17666591.
  33. Gossing W, Radke L, Biering H, Diederich S, Mai K, Frohme M. The ElonginB/C-Cullin5-SOCS-Box-Complex Is A Potential Biomarker for Growth Hormone Disorders. *Biomedicines*. 2021;9(2), 201. doi: 10.3390/biomedicines9020201

34. Metcalf D, Greenhalgh CJ, Viney E, Willson TA, Starr R, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS. Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. *Nature*. 2000 Jun 29;405(6790):1069-73. doi: 10.1038/35016611. PMID: 10890450.
35. Hochberg I, Tran QT, Barkan AL, Saltiel AR, Chandler WF, Bridges D. Gene Expression Signature in Adipose Tissue of Acromegaly Patients. *PLoS One*. 2015 Jun 18;10(6):e0129359. doi: 10.1371/journal.pone.0129359. PMID: 26087292; PMCID: PMC4472931.
36. Adams TE, Hansen JA, Starr R, Nicola NA, Hilton DJ, Billestrup N. Growth hormone preferentially induces the rapid, transient expression of SOCS-3, a novel inhibitor of cytokine receptor signaling. *J Biol Chem*. 1998 Jan 16;273(3):1285-7. doi: 10.1074/jbc.273.3.1285. PMID: 9430658.
37. Tollet-Egnell P, Flores-Morales A, Stavréus-Evers A, Sahlin L, Norstedt G. Growth hormone regulation of SOCS-2, SOCS-3, and CIS messenger ribonucleic acid expression in the rat. *Endocrinology*. 1999 Aug;140(8):3693-704. doi: 10.1210/endo.140.8.6878. PMID: 10433229.
38. Bullock AN, Debreczeni JE, Edwards AM, Sundström M, Knapp S. Crystal structure of the SOCS2-elongin C-elongin B complex defines a prototypical SOCS box ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 May 16;103(20):7637-42. doi: 10.1073/pnas.0601638103. Epub 2006 May 4. PMID: 16675548; PMCID: PMC1472497.
39. Kamura T, Maenaka K, Kotoshiba S, Matsumoto M, Kohda D, Conaway RC, Conaway JW, Nakayama KI. VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Dev*. 2004 Dec 15;18(24):3055-65. doi: 10.1101/gad.1252404. PMID: 15601820; PMCID: PMC535916.
40. Babon JJ, Sabo JK, Soetopo A, Yao S, Bailey MF, Zhang JG, Nicola NA, Norton RS. The SOCS box domain of SOCS3: structure and interaction with the elongin BC-cullin 5 ubiquitin ligase. *J Mol Biol*. 2008 Sep 12;381(4):928-40. doi: 10.1016/j.jmb.2008.06.038. Epub 2008 Jun 20. PMID: 18590740; PMCID: PMC3652878.
41. Deshaies RJ, Joazeiro CA. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:399-434. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.101807.093809. PMID: 19489725.
42. Gossing W, Radke L, Frohme M, Biering H. ECS-Komplex—Ein neuer Biomarker bei Wachstumshormonstörungen? *Wiss Beiträge*. 2016;20:23–29. doi: 10.15771/0949-8214\_2016\_1\_3.
43. Prentice RL. A generalization of the probit and logit methods for dose response curves. *Biometrics*. 1976 Dec;32(4):761-8. PMID: 1009225.
44. Rahman Farazi MM, Rahmatullah Imon AHM. Detection of outliers in gene expression data using expressed robust T test. *Malays. J. Math. Sci.* 2016;10:117–135. Online verfügbar: <https://einspem.upm.edu.my/journal/fullpaper/vol10no2may/1.%20imon.pdf> (besucht am: 10.04.2021).
45. Murtagh F, Legendre P. Ward's hierarchical agglomerative clustering method: Which algorithms implement Ward's criterion? *J. Classif.* 2014;31:274–295. doi: 10.1007/s00357-014-9161-z
46. Kuncheva L. *Combining Pattern Classifiers: Methods and Algorithms*, 1st ed.; Wiley-Interscience: Hoboken, NJ, USA, 2004.
47. Bonapart IE, van Domburg R, ten Have SM, de Herder WW, Erdman RA, Janssen JA, van der Lely AJ. The 'bio-assay' quality of life might be a better marker of disease activity in acromegalic patients than serum total IGF-I concentrations. *Eur J Endocrinol*. 2005 Feb;152(2):217-24. doi: 10.1530/eje.1.01838. PMID: 15745929.
48. Leong GM, Moverare S, Brce J, Doyle N, Sjögren K, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Ho KK, Ohlsson C, Leung KC. Estrogen up-regulates hepatic expression of suppressors of cytokine signaling-2 and -3 in vivo and in vitro. *Endocrinology*. 2004 Dec;145(12):525-31. doi: 10.1210/en.2004-0061. Epub 2004 Aug 19. PMID: 15319356.
49. Favre H, Benhamou A, Finidori J, Kelly PA, Edery M. Dual effects of suppressor of cytokine signaling (SOCS-2) on growth hormone signal transduction. *FEBS Lett*. 1999;453:63–66. doi: 10.1016/S0014-5793(99)00681-X.
50. Greenhalgh CJ, Metcalf D, Thaus AL, Corbin JE, Uren R, Morgan PO, Fabri LJ, Zhang JG, Martin HM, Willson TA, Billestrup N, Nicola NA, Baca M, Alexander WS, Hilton DJ. Biological evidence that SOCS-2 can act

- either as an enhancer or suppressor of growth hormone signaling. *J Biol Chem*. 2002 Oct 25;277(43):40181-4. doi: 10.1074/jbc.C200450200. Epub 2002 Sep 2. PMID: 12208853.
51. Shen Y, Zhang J, Zhao Y, Yan Y, Liu Y, Cai J. Diagnostic value of serum IGF-1 and IGFBP-3 in growth hormone deficiency: a systematic review with meta-analysis. *Eur J Pediatr*. 2015 Apr;174(4):419-27. doi: 10.1007/s00431-014-2406-3. Epub 2014 Sep 13. PMID: 25213432.
52. Dobbie R, MacRae VE, Huesa C, van't Hof R, Ahmed SF, Farquharson C. Direct stimulation of bone mass by increased GH signalling in the osteoblasts of *Socs2*<sup>-/-</sup> mice. *J Endocrinol*. 2014 Oct;223(1):93-106. doi: 10.1530/JOE-14-0292. Epub 2014 Jul 29. PMID: 25074853; PMCID: PMC4166176.
53. Neggers SJ, van Aken MO, de Herder WW, Feelders RA, Janssen JA, Badia X, Webb SM, van der Lely AJ. Quality of life in acromegalic patients during long-term somatostatin analog treatment with and without pegvisomant. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Oct;93(10):3853-9. doi: 10.1210/jc.2008-0669. Epub 2008 Jul 22. PMID: 18647806.
54. Ocaranza P, Morales F, Román R, Iñiguez G, Fernando C. Expression of SOCS1, SOCS2, and SOCS3 in growth hormone-stimulated skin fibroblasts from children with idiopathic short stature. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2012;25(3-4):273-8. doi: 10.1515/jpem-2011-0491. PMID: 22768656.

## 9. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Wilhelm Gossing, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der ElonginBC-Cullin5-SOCS-box-Komplex als potentieller Biomarker für Patienten mit Wachstumshormonstörungen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum

---

Unterschrift

**Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation als Top-Journal im Rahmen des Promotionsverfahrens zum PhD**

Wilhelm Gossing hatte an der Publikation

Gossing W, Radke L, Biering H, Diederich S, Mai K, Frohme M. The ElonginB/C-Cullin5-SOCS-Box-Complex Is A Potential Biomarker for Growth Hormone Disorders. *Biomedicines*. 2021; 9(2), 201. doi: 10.3390/biomedicines9020201

folgenden Anteil:

Konzipierung und Studiendesign, Anmeldung der Studie bei der Landesärztekammer, Planung und Durchführung aller experimentellen Arbeiten, statistische Datenanalyse und –interpretation, Erstellen aller Grafiken und Diagramme, Schreiben der Veröffentlichung

---

Unterschrift des Doktoranden

## 10. Auszug aus der Journal Summary List der Charité

Die Publikation *The ElonginB/C-Cullin5-SOCS-Box-Complex Is A Potential Biomarker for Growth Hormone Disorders* wurde in der Zeitschrift *Biomedicines* des Open-Access Herausgebers MDPI veröffentlicht. Laut des ISI Web of Knowledge belegte diese Zeitschrift 2019 mit einem Impakt-Faktor von 4,717 im Science Citation Index Expanded in der Kategorie „Medicine, Research and Experimental“ den 30. Platz von 138 Journalen (Q1). Nachfolgend ist der Auszug aus der Datenbank der Charité gezeigt.

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2019** Selected Editions: SCIE,SSCI Selected Categories: **“MEDICINE, RESEARCH and EXPERIMENTAL”**  
Selected Category Scheme: WoS  
**Gesamtanzahl: 138 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE MEDICINE	85,220	36.130	0.168730
2	Science Translational Medicine	34,479	16.304	0.116030
3	JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION	109,020	11.864	0.125830
4	JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE	63,562	11.743	0.067350
5	TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE	10,618	11.099	0.018720
6	Annual Review of Medicine	6,267	9.716	0.009390
7	MOLECULAR ASPECTS OF MEDICINE	6,207	9.577	0.005750
8	MOLECULAR THERAPY	17,977	8.986	0.030980
9	EMBO Molecular Medicine	8,366	8.821	0.022770
10	Theranostics	12,995	8.579	0.029740
11	Clinical and Translational Medicine	1,349	7.919	0.003280
12	Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology	2,819	7.689	0.004240
13	Molecular Therapy-Nucleic Acids	5,024	7.032	0.013550
14	JCI Insight	7,697	6.205	0.034400
15	Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine	7,647	6.000	0.016800
16	ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation	1,413	5.787	0.002210
17	JOURNAL OF BIOMEDICAL SCIENCE	4,499	5.762	0.006380
18	EBioMedicine	8,133	5.736	0.029330
19	npj Vaccines	596	5.699	0.002400
20	Cancer Biology & Medicine	1,389	5.432	0.003640
21	EXPERIMENTAL AND MOLECULAR MEDICINE	5,536	5.418	0.010300
22	Translational Research	4,043	5.411	0.008350
23	Stem Cell Reviews and Reports	2,737	5.316	0.004100
24	CLINICAL SCIENCE	11,443	5.223	0.013850
25	Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine	11,123	5.182	0.014400
26	Stem Cell Research & Therapy	8,268	5.116	0.017170
27	EPMA Journal	987	4.901	0.001110
28	Nucleic Acid Therapeutics	1,030	4.875	0.003610
29	Biomarker Research	768	4.866	0.002100
<b>30</b>	<b>Biomedicines</b>	<b>1,156</b>	<b>4.717</b>	<b>0.002850</b>
[...]				
138	International Journal of Clinical and Experimental Medicine	7,065	0.166	0.017350



## 11. Druckexemplar der ausgewählten Publikation



Article

# The ElonginB/C-Cullin5-SOCS-Box-Complex Is A Potential Biomarker for Growth Hormone Disorders

Wilhelm Gossing<sup>1,2</sup>, Lars Radke<sup>1</sup>, Henrik Biering<sup>1,3</sup>, Sven Diederich<sup>2,4</sup>, Knut Mai<sup>2,5</sup> and Marcus Frohme<sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Division Molecular Biotechnology and Functional Genomics Technical University of Applied Sciences, 15745 Wildau, Germany; wilhelm.gossing@th-wildau.de (W.G.); lradke@th-wildau.de (L.R.); biering@th-wildau.de (H.B.)
  - <sup>2</sup> Department of Endocrinology and Metabolism, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, 10117 Berlin, Germany; Sven.Diederich@medicover.de (S.D.); knut.mai@charite.de (K.M.)
  - <sup>3</sup> Praxis an der Kaisereiche, Innere Medizin, Endokrinologie, Diabetologie, 12159 Berlin, Germany
  - <sup>4</sup> MVZ Medicover Berlin-Mitte, Innere Medizin, Endokrinologie, Andrologie, 10117 Berlin, Germany
  - <sup>5</sup> German Centre for Cardiovascular Research (DZHK), Partner Site Berlin, 10117 Berlin, Germany
- \* Correspondence: mfrohme@th-wildau.de



Citation: Gossing, W.; Radke, L.; Biering, H.; Diederich, S.; Mai, K.; Frohme, M. The ElonginB/C-Cullin5-SOCS-Box-Complex Is A Potential Biomarker for Growth Hormone Disorders. *Biomedicines* 2021, 9, x. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020201>

Academic Editor:  
Yasuhiro Nakamura  
Received: 3 January 2021  
Accepted: 8 February 2021  
Published: 17 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors.  
Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) is the standard biochemical marker for the diagnosis and treatment control of acromegaly and growth hormone deficiency (GHD). However, its limitations necessitate the screening for new specific and sensitive biomarkers. The elonginB/C-cullin5-SOCS-box-complex (ECS-complex) (an intracellular five-protein complex) is stimulated by circulating growth hormone (GH) and regulates GH receptor levels through a negative feedback loop. It mediates the cells' sensitivity for GH and therefore, represents a potent new biomarker for those diseases. In this study, individual ECS-complex proteins were measured in whole blood samples of patients with acromegaly (n = 32) or GHD (n = 12) via ELISA and compared to controls. Hierarchical clustering of the results revealed that by combining the three ECS-complex proteins suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2), cullin-5 and ring-box protein 2 (Rbx-2), 93% of patient samples could be separated from controls, despite many patients having a normal IGF-1 or not receiving medical treatment. SOCS2 showed the best individual diagnostic performance with an overall accuracy of 0.93, while the combination of the three proteins correctly identified all patients and controls. This resulted in perfect sensitivity and specificity for all patient groups, which demonstrates potential benefits of the ECS-complex proteins as clinical biomarkers for the diagnostics of GH-related diseases and substantiates their important role in GH metabolism.

**Keywords:** acromegaly; growth hormone deficiency; biomarker; SOCS2; liquid biopsies; pituitary

## 1. Introduction

Growth hormone deficiency (GHD) and acromegaly are two growth hormone disorders caused by reduced or increased levels of growth hormone (GH), respectively. Those diseases are mainly triggered by pituitary neuroendocrine tumors (PitNETs) that slowly shift the physiological balance of hormone secretion to pathological levels. While PitNETs appear to be rather common within the general population, with 17%, only a very small percentage (<0.04%) of affected people develops symptoms of a GH disorder that requires medical attention [1,2]. Regardless, the prevalence of acromegaly is approximately 60–100 cases per million and seems to be on the rise, probably owing to the increased awareness and better data availability amongst physicians [3–7]. On the other hand, a GHD is often caused by a non-functioning PitNET and is reported to occur in 290–460 cases per million, thus being more frequent than acromegaly [8].

Because symptoms of GH-related disorders evolve very subtly over the course of many years, initial diagnoses are made only after 5–25 years [9]. This results in 73% of cases already being macroadenomas (>1 cm) upon diagnosis, which significantly reduces the surgical cure rate [10,11]. While surgical removal of microadenomas is effective in approximately 80% of cases, it is successful in 55% of macroadenomas only [12]. If residual tumor activity is observed, medical control of GH and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) secretion is usually required. Moreover, GHD and acromegaly both involve a high morbidity and increased mortality that often persist even after surgical intervention [13]. The decreased life expectancy is mainly caused by cardiovascular and respiratory diseases [14]. Especially suboptimal disease control is associated with poor outcome. Given these data, early diagnosis as well as accurate evaluation of disease activity is highly required.

For the diagnosis of GH disorders, it is suggested to gather biochemical evidence by performing at least one laboratory test [15]. Such provocative tests are time-consuming and include complex and partially hazardous procedures [16]. Additionally, they are considered unreliable, variable and do lack reproducibility [17]. Therefore, IGF-1 is used to complement the diagnostics but also to monitor treatment. However, IGF-1 is said to be not useful for screening and can give conflicting results, as its regulation is dependent on factors such as age, gender or nutritional status [18–20]. For patients with a GHD this is especially problematic, as there are considerable overlaps with the normal range that further increase with age [21]. Of major concern is the lack of standardization of IGF-1 assays and the variability of applied clinical reference ranges. Laboratories use different methods for IGF-1 detection, which results in the limits of applied reference ranges varying by more than twofold [22,23]. For the screening of a GHD, the additional measurement of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) can be useful. Its use, however, is equally controversial. While some studies showed that due to its low sensitivity the use of IGFBP-3 does not provide an advantage over the measurement of IGF-1 alone [24,25], others highlight the significantly higher specificity of IGFBP-3 [18,26].

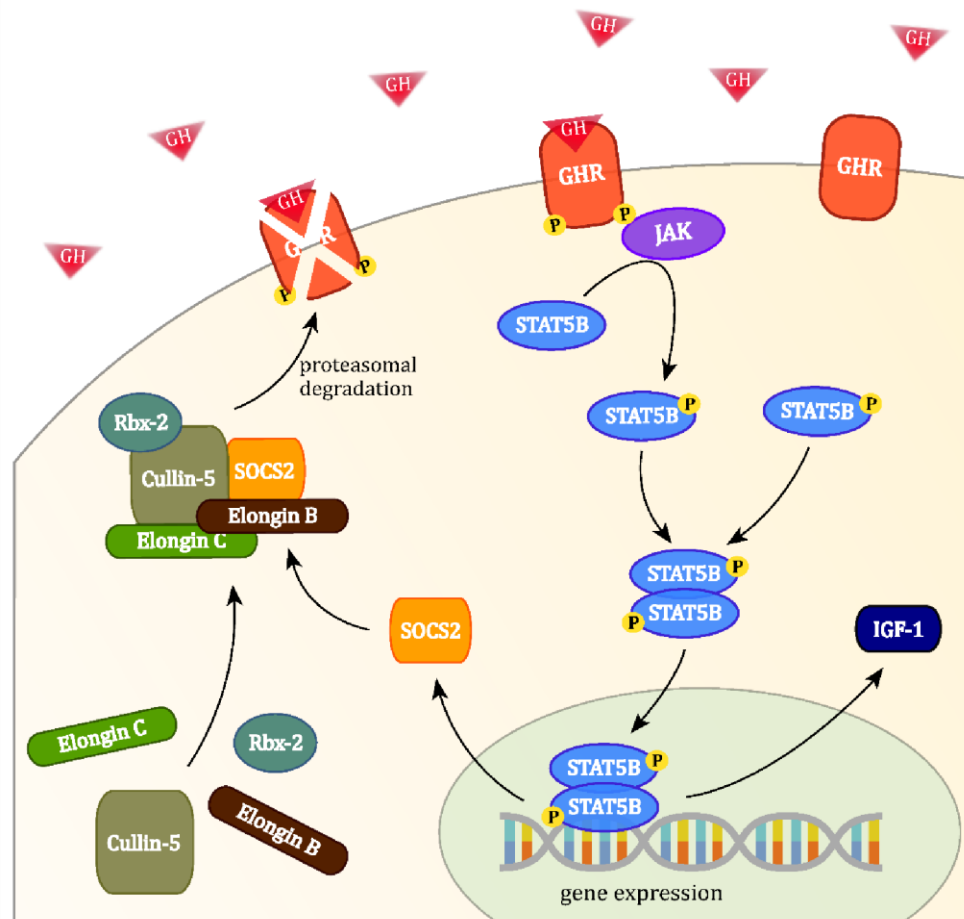
The response to medical treatment is highly individual and neither provocative tests nor biochemical markers are able to reliably predict treatment control [27]. This may in part be due to effects of GH that are not mediated via its hepatic metabolism, meaning that IGF-1 is not representing the physiological efficacy of GH [28].

Several potential alternatives to IGF-1 have been proposed but despite clinical correlation with GH-related diseases in those markers, none of them got established in clinical diagnostics [29–33]. So there is still the need for a more accurate biomarker, which can be used for diagnosis as well as assessment of disease activity [34].

Furthermore, physicians also suggest a re-evaluation of the biomarkers in use, due to new available treatment options, such as long-acting drugs [35].

Here, we investigated a novel set of potential biomarkers that have a close connection to the physiological action of GH. The molecule of interest is the elonginB/C-cullin5SOCS-box-complex (ECS-complex) which consists of five proteins: Suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2), elongin B (EloB), elongin C, cullin-5 and ring-box protein 2 (Rbx2). This complex controls GH signaling by regulating the GH receptor (GHR) through a negative feedback loop. As the GH uptake of target cells is primarily dependent on the GHR expression, the proteins of the ECS-complex are assumed to reflect the individual cellular response characteristics towards GH [36]. The protein SOCS2 is the part of the ECS-complex that recognizes and binds to the GHR. More precisely, SOCS2's SH2-domain associates to the phosphorylated tyrosines Y487 and Y595 of the GHR [37,38]. Mutations to these two amino acids lead to a complete loss of function of the ECS-complex [39]. GH is a direct stimulus for the expression of SOCS2. Its induction is slow and steady over the course of 24 h, which suggests independence of daily GH fluctuations [40]. This would be advantageous for clinical applications as the time of sampling was arbitrary. A connection between SOCS2 and acromegaly has already been proven, when significant increases in SOCS2 expression were detected in adipose tissue of acromegalic patients [41]. However, the inhibitory action of high SOCS2 levels apparently did not stop the development of acromegaly. At its C-terminal end, SOCS2 holds a SOCS-box domain which allows the association to the proteins elongin B, elongin C and cullin-5 [42]. The 91 kDa protein cullin-5 acts as a scaffold to bring the substrate recognition unit SOCS2 into close proximity to the ubiquitin-ligase Rbx-2. The elongins B and C are important for the correct folding and stabilization of SOCS2. Rbx-2 is an E3 ligase that attaches to cullin-5. It carries a RING motif that mediates the transfer of ubiquitin from an E2 ubiquitin-conjugating enzyme to the GHR [43].

The regulatory action of the ECS-complex takes place, when GH binds to the GHR. This phosphorylates the receptor and activates the intracellular Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription pathway, which induces the expression of SOCS2. Together with the other four proteins, SOCS2 subsequently forms the ECS-complex in the cytoplasm and is then able to bind to phosphorylated tyrosines at the GHR. This allows Rbx-2 to transfer ubiquitin moieties to the GHR, which in turn is recognized and degraded by the proteasome (see Figure 1). SOCS2 does not bind to unphosphorylated receptors, possibly keeping the cell sensitive to low levels of GH in the blood [39].



**Figure 1.** The binding of growth hormone (GH) at the GH receptor (GHR) activates the intracellular Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription signalling cascade, which induces the expression of suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) and leads to the formation of the elonginB/C-cullin5-SOCS-box-complex (ECS-complex). Phosphorylated GHRs may be targeted by the ECS-complex for ubiquitin transfer, leading to their proteasomal degradation.

The GHR shows differential expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), which suggests that the regulatory ECS-complex is active in these cells [44]. A GH-dependent regulation of the ECS-complex gene expression in patients with acromegaly and GHD was also already demonstrated [45]. In this study, we investigated the protein expression of the ECS-complex in blood samples of patients with diagnosed GH disorders and healthy controls for their benefits in personalized medicine.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Subjects

A positive approval from the Ethics Committee of the Landesärztekammer Berlin (11/03/2013, ID number: THW-GHD-2012) was obtained previous to starting the study and all participants gave their written informed consent before blood withdrawal. The control group participants were recruited in a local general practitioner's surgery. They had to be above the age of 40 and were without known neoplasms or hormonal disorders. Common cold or flu were exclusion criteria, and normal IGF-1 values were verified to eliminate possible GH-related abnormalities in the control group. For the experimental groups, we included patients from four endocrine surgical departments who had been diagnosed with either acromegaly or

GHD. The diagnosis of acromegaly was determined by IGF-1 and inadequate suppression of serum GH to <0.4 ng/mL by oral glucose load. GHD was diagnosed by IGF-1 and insufficient GH response to insulin-induced hypoglycemia.

## 2.2. Sample Preparation

From every subject, a single whole-blood sample of 5 mL was obtained during their routine medical consultation. Blood samples were drawn between 7 and 12 am, were stored in K<sub>2</sub>/EDTA vacutainers, put immediately on ice and were transported to the laboratory within a few hours. Red blood cells were lysed with 0.17 M ammonium chloride and PBMCs collected from 2 mL of whole blood by two centrifugation cycles of 5 min at 453 × g. After washing, pelleted PBMCs were frozen at -80 °C.

## 2.3. Assays

IGF-1 measurements of serum from patients and controls were conducted with the Immulite 2000 (Siemens AG). For the classification of the samples, the age-dependent in-house reference range was used (Praxis an der Kaisereiche, 12159 Berlin, Germany).

For the protein measurements, PBMCs extracted from whole blood samples were thawed in cold phosphate buffered saline (PBS) and the cell concentration was determined with an automated cell counting system (Cedex XS, Roche Innovatis AG). Afterwards, cells were diluted to 4 × 10<sup>6</sup> cells per mL in PBS and homogenized using the Precellys (Bertin Instruments) and 1.4 mm zirconium oxide beads at 5.000 rpm for 15 s. The beads were removed, and the solution was centrifuged at 5.000 × g for 5 min. The resulting supernatant contained the proteins of interest.

The levels of the ECS-complex proteins SOCS2, EloB, cullin-5 and Rbx-2 were measured with sandwich enzyme-linked immunosorbent assay kits purchased from Abexxa Ltd. (Cambridge, UK) in accordance with the manufacturer's instructions. Due to a lack of an appropriate ELISA kit or antibody, the ECS-complex component elongin C was not analyzed in this study.

## 2.4. Statistics

All data are given as mean ± standard deviation (SD) unless stated otherwise. Pearson correlation coefficients and unpaired t-tests were calculated using GraphPad Prism 5. Graphics were created with R statistics v3.5.2. P-values lower than 0.05 were considered significant. Protein concentrations have been estimated from the signal intensities of ELISA tests with the five parameter logistic regression model (5PL) of Prentice [46] and normalized to one million cells. Outlier detection of control group values was done using the normalized median absolute deviation as proposed by Farazi and Imon [47]. Clustering was performed using Ward's hierarchical agglomerative clustering method [48]. Protein combinations have been obtained for each of the four subgroups individually by averaging weighted standard deviation scores  $x_i$  based on their accuracy in the respective subgroup (Equation (1)) [49].

$$x_i = \log\left(\frac{accuracy_i}{1-accuracy_i}\right), i \in \{SOCS2, Cullin-5, Rbx-2\} \quad (1)$$

## 3. Results

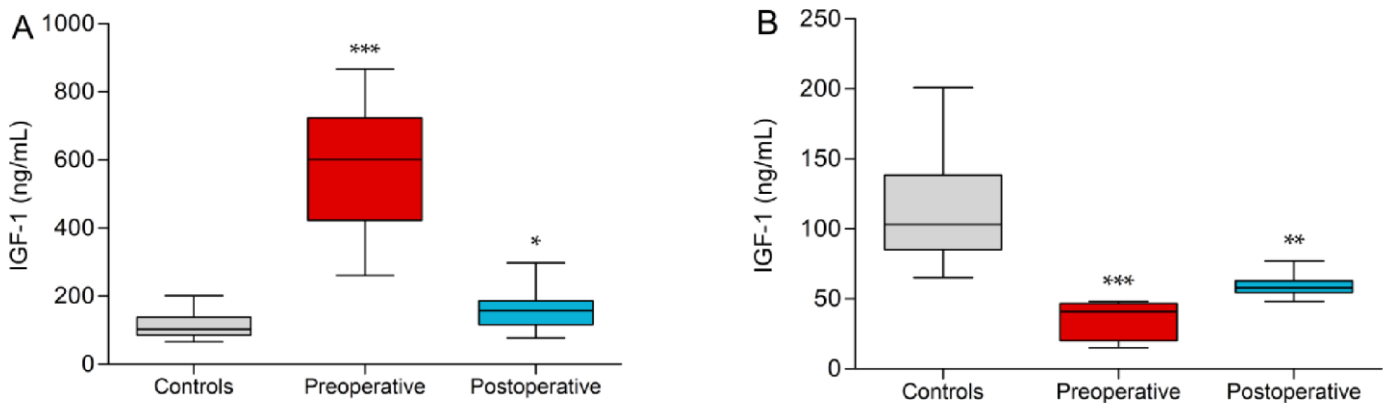
### 3.1. Patient Characteristics

The control group cohort ( $n = 14$ , male = 8, female = 6) had a mean age of 62.9 ± 13.1 years and a mean body-mass-index (BMI) of 27.1 ± 4.8 kg/m<sup>2</sup> (see Table S1). The group of patients included 32 samples from patients with a diagnosed acromegaly

(age =  $48.2 \pm 14.1$ , BMI =  $29.8 \pm 5.7$  kg/m<sup>2</sup>) and 12 samples from patients with a diagnosed GHD (age =  $51.0 \pm 11.7$ , BMI =  $28.0 \pm 4.5$  kg/m<sup>2</sup>). The patients were separated by their type of GH-related disorder (acromegaly/GHD) and further divided into preoperative and postoperative, respectively. Nine newly diagnosed patients with acromegaly and five with a newly diagnosed GHD, who had not received any treatment yet, were assigned to the preoperative subgroups. The patients that donated blood to the study after their tumor surgery were assigned to the postoperative subgroups. The postoperative acromegaly group (n = 23) contained 15 samples with GH suppressive medication and eight samples that did not receive any medication. For postoperative GHD (n = 7), four samples were from patients who received daily GH replacement therapy while three did not receive treatment. All postoperative patients had a normal IGF-1 and therefore a controlled disease. A significant difference in mean age between all patients and controls existed ( $p = 0.002$ ), but mean BMI values did not differ significantly ( $p = 0.08$ ).

### 3.2. IGF-1

The control group had a mean IGF-1 of  $113.8 \pm 39.4$  ng/mL and all controls were within the age-dependent clinical reference range (RR). All preoperative acromegaly patients had IGF-1 levels above the clinical RR. The values were highly elevated in comparison to the control group ( $580.9 \pm 202.6$  ng/mL,  $p < 0.0001$ ). Although their samples were within the clinical RR, the postoperative acromegaly group showed a significant increase in IGF-1 values vs. controls ( $155.2 \pm 51.4$  ng/mL,  $p = 0.01$ , Figure 2A). The GHD patient groups showed significant reductions of IGF-1 vs. controls ( $34.8 \pm 14.2$  ng/mL,  $p = 0.0005$ ) but only the five preoperative GHD patients fell below the clinical RR. Postoperative GHD patients showed normal values, which were close to the lower reference range boundary but still lower than in controls ( $58.8 \pm 8.8$  ng/mL,  $p = 0.002$ , Figure 2B).

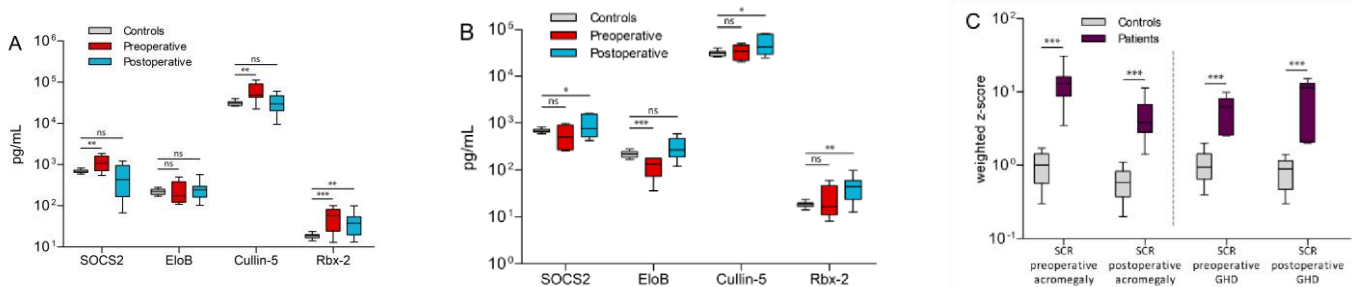


**Figure 2.** Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) values of acromegaly subgroups (A) and growth hormone deficiency (GHD) subgroups (B) vs. controls. Significant differences to controls are indicated (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

### 3.3. ECS-Complex

The results of the ELISA tests for the control group samples showed protein concentrations of  $690.9 \pm 68.7$  pg/mL for SOCS2,  $223.3 \pm 36.0$  pg/mL for EloB,  $31.1 \pm 3.9$  ng/mL for cullin-5 and  $18.5 \pm 2.4$  pg/mL for Rbx-2. Conversely, the values from the experimental groups were much more dispersed. Preoperative acromegaly patients were characterized by higher levels of SOCS2 ( $1128.8 \pm 471.0$  pg/mL,  $p = 0.003$ ), cullin-5 ( $60.99 \pm 30.29$  ng/mL,  $p = 0.001$ ) and Rbx-2 ( $56.4 \pm 31.1$  pg/mL,  $p = 0.0002$ ) compared to controls. Only EloB showed no significant difference to controls ( $243.8 \pm 153.4$

pg/mL,  $p = \text{n.s.}$ ). In contrast, most of these differences were not observed comparing the postoperative acromegaly group and controls (Figure 3A). Only in Rbx-2, a significant difference to controls persisted ( $p = 0.001$ ). Interestingly, the highest measured values of the four proteins derive from a patient, who was with 260 ng/mL IGF-1 barely above the clinical RR. In preoperative GHD patients, only EloB was lower than in controls ( $126.8 \pm 58.8$  pg/mL,  $p = 0.0004$ , Figure 3B). In comparison, higher levels of SOCS2 ( $p = 0.04$ ), cullin-5 ( $p = 0.01$ ) and Rbx-2 ( $p = 0.001$ ) could be found in postoperative GHD samples compared to control samples. Although there was a significant difference in mean age between patients and controls, there was no linear dependency on age in SOCS2 ( $r = 0.04$ ,  $p = 0.89$ ), EloB ( $r = 0.29$ ,  $p = 0.32$ ), cullin-5 ( $r = -0.5$ ,  $p = 0.07$ ) or Rbx-2 ( $r = -0.09$ ,  $p = 0.75$ ). Moreover, BMI values, which ranged from 18 to 35 kg/m<sup>2</sup> in controls, also did not correlate with measured SOCS2 ( $r = 0.24$ ,  $p = 0.43$ ), EloB ( $r = 0.09$ ,  $p = 0.76$ ), cullin-5 ( $r = -0.03$ ,  $p = 0.91$ ) or Rbx-2 ( $r = 0.14$ ,  $p = 0.64$ ) levels. Furthermore, no significant gender differences in mean SOCS2 ( $p = 0.54$ ), EloB ( $p = 0.13$ ), cullin-5 ( $p = 0.43$ ) or Rbx-2 ( $p = 0.35$ ) protein concentrations were observed in controls. By clustering the results of all samples, the scaled combination of SOCS2, cullin-5 and Rbx-2 formed three clusters with all control samples falling into one cluster (Figure S1, green box). That way, 42 out of 44 patients (93%) could be distinguished from controls. However, clustering was not useful to discriminate between acromegaly and GHD or between preoperative and postoperative. Due to these clustering results, the three proteins SOCS2, Cullin-5 and Rbx-2 were combined into a single value for each subgroup separately, which we named SCR. This value improved the separation between every patient subgroup and the control group significantly ( $p$ -values < 0.0001, Figure 3C).

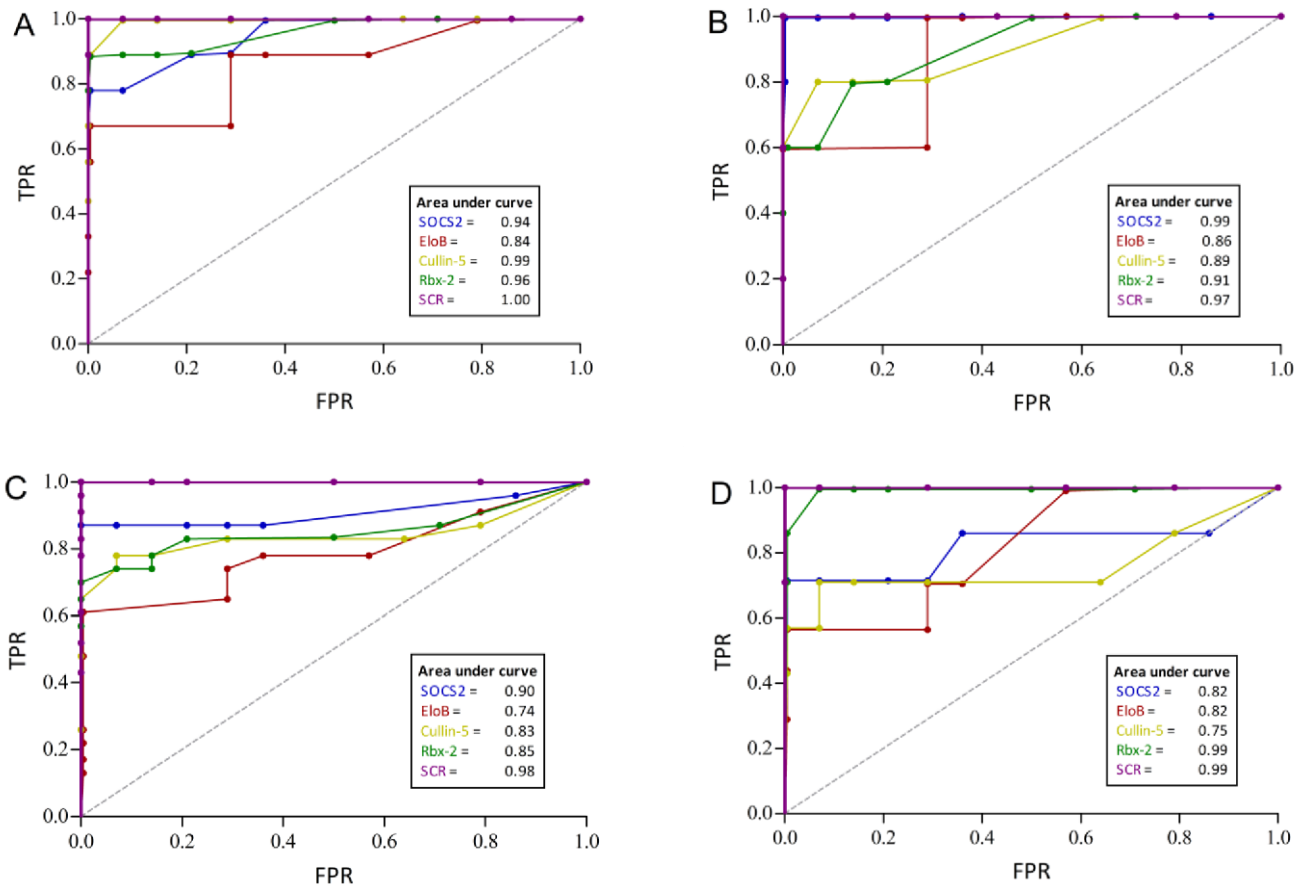


**Figure 3.** Comparison of ECS-complex protein concentrations in controls vs. acromegaly (A) and GHD patients (B). A protein index named SCR was calculated by combining the weighted z-scores of SOCS2, cullin-5 and Rbx-2. This SCR value significantly improved separation between patients and controls in all acromegaly and GHD subgroups (C). Significance levels are indicated above the horizontal lines (ns = not significant, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Next, diagnostic performance characteristics of the ECS-complex proteins were calculated for all four subgroups individually. All patients were assessed as positive, regardless of their treatment status (controlled or uncontrolled). Receiver operating characteristic (ROC) curves have been compiled to calculate area under the curve (AUC) values and to investigate the trade-off between sensitivity (SEN) and specificity (SPEC).

For preoperative acromegaly (Figure 4A), SOCS2, cullin-5 and Rbx-2 showed high diagnostic accuracies with 0.91, 0.96 and 0.96, respectively. The highest SENs were achieved by cullin-5 and Rbx-2 with 1.00 and 0.89, respectively. The SEN for detecting preoperative GHD patients ranged from 0.60 (EloB and Rbx-2) to 1.0 in SOCS2. SOCS2 also correctly rejected all controls for a specificity of 1.0 and the resulting AUC was 0.99 (Figure 4B). In comparison, the ECS-complex proteins showed lower SENs in the postoperative groups, probably owing to lower disease

activities in these patients. Still, SOCS2 showed a good SEN and SPEC in postoperative acromegaly (0.87 and 1.0), that translated to the highest AUC in that subgroup (0.90, Figure 4C). Similarly, Rbx-2 identified the most postoperative GHD patients correctly while testing negative for all controls (SEN = 0.86, SPEC = 1.0). This protein showed a high discriminative power with an AUC of 0.99 (Figure 4D). In all four groups, the combined SCR index correctly classified all patients and controls in all tests. Furthermore, its SEN and SPEC was always 1.00 and the AUCs of the SCR index further substantiate its excellent diagnostic accuracy, as they range from 0.97 to 1.00 (see Figure 4A–D).



**Figure 4.** Performance characteristics of ECS-complex proteins to discriminate patients with acromegaly or GHD from controls. The receiver operating characteristic (ROC) curves depict the diagnostic power for preoperative acromegaly (A), preoperative GHD (B), postoperative acromegaly (C) and postoperative GHD (D), respectively. The purple graph named SCR combines SOCS2, cullin-5 and Rbx-2 and shows the best performance in all four patient groups. Area under the curve values are presented in the small boxes. TPR = true positive rate; FPR = false positive rate.

#### 4. Discussion

This study is the first to investigate changes of all ECS-complex proteins in blood samples of patients with treatment-naïve or controlled GH disorders. Our data provide evidence for a correlation of these disorders with abnormal concentrations of ECS-complex proteins. While protein concentrations were significantly elevated in preoperative acromegaly, they were found to occur both elevated or reduced in GHD. The reasons for these discrepancies are not understood yet, as they could not be attributed to certain characteristics or therapy states of individual patients.

In order to conform to the typical age distribution of patients with GH-related disorders, only controls above 40 years of age were recruited for the study. This resulted in a significantly higher mean age in controls vs. patients but did not seem



problematic as none of the proteins indicated an age-related correlation. Problematic, however, is the broad reference range of the standard biomarker IGF-1, because it may complicate reliable diagnostic assessments as well as treatment control. In contrast, the ECS-complex proteins show a stable physiological expression due to small coefficients of variation which suggests narrow reference ranges. This would allow more precise diagnostics and furthermore may explain the measured abnormal ECS-complex concentrations in postoperative patients with normalized IGF-1 levels. Accordingly, these values could indicate that many patients may still harbor residual disease activity. This assumption is supported by research showing that the IGF-1 of patients with acromegaly can normalize with symptoms still in place [50]. Similarly, IGF-1 values of symptomatic GHD patients often overlap with the reference range [21]. Therefore, the narrower reference ranges of the ECS-complex proteins could enable the detection of such mild activity and thus may help to optimize treatment efficacy.

Furthermore, no correlations between age, gender or BMI and the ECS-complex proteins in the control group samples have been found. Therefore, these biometric data may not have to be considered when using these proteins as biomarkers. It may also mean that the known gender-related effects of estrogen on the GH/IGF-1 axis may not affect the ECS-complex [51]. This also challenges the reported increases of SOCS2 expression after estrogen treatment in mice, which were achieved with superphysiological concentrations of estradiol, that do not occur naturally in humans [52]. Regardless, the results about the effects of age, gender and BMI on the ECS-complex may be limited due to the rather small sample size. Therefore, a confirmation in a larger cohort is necessary. The significant elevations of SOCS2, cullin-5 and Rbx-2 in the preoperative acromegaly group show that these proteins might be candidates for disease detection. The changes of all ECS-complex proteins in postoperative acromegaly patients and of SOCS2 and EloB in postoperative GHD patients are smaller in comparison to the preoperative groups, which indicates a detectable attenuation of disease severity after surgery. Interestingly, the group separation could be enhanced much further through combination of SOCS2, cullin-5 and Rbx-2, which clearly shows that a joint measurement of the three proteins would be much more efficient than just a single marker. The results of individual patients reveal correlations between the ECS-complex proteins which suggests that they have a common underlying regulation mechanism. The sole exception to this is Rbx-2, which is often increased when the other proteins are not. It therefore appears to be regulated independently. Our results support the findings of Hochberg et al., who discovered that SOCS2 mRNA expression is increased only in patients with acromegaly below 60 years [41]. In our study, the median of SOCS2 in acromegaly patients over 60 years was increased by 15% compared to controls, while it was increased by 57% in patients below 60 years ( $p = 0.008$ ). As this age-dependent effect could not be observed in controls, it may only apply to the stimulation of SOCS2 without affecting its basal levels. It further indicates that the SOCS2-dependent feedback loop is more active in younger patients, while it weakens in the elderly. Ultimately, this could impede the diagnostic capability of SOCS2 in older patients. In mice, SOCS2 was found to only carry out its inhibitory effect on GH signalling in lower concentrations, while it potentiated signalling at higher concentrations [53,54]. Accordingly, the predominantly elevated concentrations of SOCS2 in the preoperative acromegaly patients are apparently not sufficient to fulfill its biological protective function against the elevated levels of circulating GH. However, SOCS2 is downregulated in 60% of preoperative GHD patients, where an inhibition of the GHR by the ECS-complex is not desirable. Therefore, the question arises, what concentrations would be

considered “high” or “low” for the human body, respectively, for SOCS2 to have an inhibiting or potentiating effect.

The statistical capacity of the ECS-complex proteins as diagnostic biomarkers was estimated by comparing their performance parameters. Generally, the SPEC of all proteins was 100% in nearly all tests, which is probably due to the low variation of measured ECS complex protein concentrations in controls. Only for cullin-5 in the preoperative groups, the calculated SPEC was lower (93%).

Of the individual proteins, SOCS2 showed the best performance on average, as its diagnostic accuracy was over 0.9 in all four groups. Its advantage over the other ECS complex proteins might be its direct stimulation by GH. Therefore, it may be of good use as a single biomarker for both acromegaly and GHD. However, clustering of the results revealed that a combination of SOCS2, cullin-5 and Rbx-2 yielded a better separation of patients and controls than any of the individual proteins. This accounted for all four subgroups including preoperative GHD, where EloB showed the highest significance but worsened the group separation. In fact, by using the SCR index, the SEN and overall diagnostic performance was further improved. The SCR index was able to correctly identify every patient as positive and every control as negative, therefore presenting perfect SEN and SPEC in all four groups. It also identified patients with a normal IGF-1 as positive, while rejecting all controls. On the contrary, studies assessing the value of IGF-1’s diagnostic capabilities for these diseases are controversial. A meta-analysis determined IGF-1’s SEN (0.66), SPEC (0.69) and AUC (0.78) for the diagnosis of a GHD, which indicates only moderate performance [18]. Because of the indistinct demarcation in the low concentration range, the diagnosis of a GHD with IGF-1 is the most unreliable. Having an alternative for these cases could therefore be very valuable. Additionally, the many observed differences of ECS-complex proteins in postoperative patients with a normal IGF-1 suggest that these patients cannot be classified as controlled. Therefore, our results speak for a superior detection of pathological conditions in postoperative patients or during treatment using the SCR index. Unfortunately, comparable statistics of IGF-1 for acromegaly have not been found, but our results suggest an excellent diagnostic performance using the three ECS-complex proteins SOCS2, cullin-5 and Rbx-2 in conjunction.

Lastly, there are some limitations in our study that should be pointed out. The comparison of the here investigated biomarkers to IGF-1 is biased because it was part of the initial diagnostic assessment for the patients in this study. Nonetheless, it can be added that the absence of correlation between any of the ECS-complex proteins and IGF-1 was expected as SOCS2-deficient mice do not show elevated IGF-1 expression after GH treatment [55]. For a better comparison of the diagnostic capabilities of the ECS-complex to IGF-1, a quality of life (QoL) questionnaire would have been helpful, as it measures the patients’ perception of disease control. The assessment of QoL was shown to be able to detect relevant clinical improvements without a significant change in IGF-1 [56]. Moreover, consecutive data on ECS-complex concentrations from single patients during medical dose optimization have not been obtained and might have been helpful for determining its capabilities for treatment monitoring and control. Further limiting was our control group size of 14 healthy volunteers, which were the only source for reference data and for the establishment of a normal range of ECS-complex concentrations. These controls were not strictly matched to the biometric data of recruited patients, so that the difference in age could have possibly played a part in the observed changes. Future studies should verify our findings with a larger set of patients to learn more about the role of

the ECS-complex in the GH metabolism and to possibly leverage its significance as a new biomarker.

## 5. Conclusions

This is the first study to evaluate the potential of the ECS-complex for the diagnostics of GH-related diseases. We have demonstrated significant differences in all four investigated ECS-complex proteins between patients with acromegaly or GHD and healthy controls. The stable expression of the proteins in controls together with the significant differences in patients make up good characteristics for them to be used as alternative biomarkers. Measured protein concentrations also did not change in relation to age, gender or BMI, indicating independence from these factors.

Overall, SOCS2 showed the best clinical performance in terms of SEN, SPEC and accuracy as an individual marker. However, superior results were obtained with a combination of SOCS2, cullin-5 and Rbx-2, which showed excellent diagnostic performance by reliably separating all patients from controls.

Therefore, this combination of proteins is proposed as a novel biomarker candidate for acromegaly as well as GHD and because of its high sensitivity can be considered for the screening of such rare diseases as well. In the future, it may be an alternative for contradictory IGF-1 results, postoperative treatment control or hazardous provocative tests.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/2227-9059/9/2/201/s1>, Table S1: Individual biometric and protein data of control group participants, Figure S1: Cluster analysis of SOCS2, cullin-5 and Rbx-2 values in all study participants.

**Author Contributions:** Conceived and designed the study: W.G., M.F., S.D., H.B., L.R. Drafted the manuscript: W.G., M.F., L.R., K.M., H.B., S.D. Approved the manuscript: W.G., M.F., L.R., K.M., S.D., H.B. Responsibility for accuracy and integrity of all aspects of research: W.G., M.F., S.D., H.B., K.M., L.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the European Regional Development Fund (ERDF) on 08/03/2016, Grant number 85000782 and by unrestricted research grants from Pfizer, Ipsen and Novartis. The APC were funded by the German Research Foundation and the Open Access Publication Funds of the Technische Hochschule Wildau—Technical University of Applied Sciences. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Institutional Review Board Statement:** All subjects gave their informed consent for inclusion before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committee of Landesärztekammer Berlin (THW-GHD-2012).

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the authors. The data are not publicly available due to privacy reasons.

**Acknowledgments:** We thank the many physicians and their teams, that provided blood samples for this study. Especially Christine Rühl, Reinhard Finke, Bärbel Seidlitz, Oskar Kelp, Gerhard Stiglmaier, Dag Moskopp, Sonya Frohme, Yawen Wang, Martina Salzwedel, Manjana Hirsch and Antje Kochinke. We also would like to kindly thank the anonymous blood donors for making this study possible.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Ezzat, S.; Asa, S.L.; Couldwell, W.T.; Barr, C.E.; Dodge, W.E.; Vance, M.L.; McCutcheon, I.E. The prevalence of pituitary adenomas. *Cancer* **2004**, *101*, 613–619. [[CrossRef](#)]
2. Day, P.F.; Loto, M.G.; Glerean, M.; Picasso, M.F.R.; Lovazzano, S.; Giunta, D.H. Incidence and prevalence of clinically relevant pituitary adenomas: Retrospective cohort study in a Health Management Organization in Buenos Aires, Argentina. *Arch. Endocrinol. Metab.* **2016**, *60*, 554–561. [[CrossRef](#)]
3. Sesnilo, G. Epidemiología de la acromegalia en España. [Epidemiology of acromegaly in Spain]. *Endocrinol. Nutr.* **2013**, *60*, 470–474. [[CrossRef](#)]

4. Burton, T.; Le Nestour, E.; Neary, M.; Ludlam, W.H. Incidence and prevalence of acromegaly in a large US health plan database. *Pituitary* **2016**, *19*, 262–267. [[CrossRef](#)]
5. Fernandez, A.; Karavitaki, N.; Wass, J.A.H. Prevalence of pituitary adenomas: A community-based, cross-sectional study in Banbury (Oxfordshire, UK). *Clin. Endocrinol.* **2010**, *72*, 377–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Cannavò, S.; Ferràù, F.; Ragonese, M.; Curtò, L.; Torre, M.L.; Magistri, M.; Marchese, A.; Alibrandi, A.; Trimarchi, F. Increased prevalence of acromegaly in a highly polluted area. *Eur. J. Endocrinol.* **2010**, *163*, 509–513. [[CrossRef](#)]
7. Dal, J.; Feldt-Rasmussen, U.; Andersen, M.; Kristensen, L.Ø.; Laurberg, P.; Pedersen, L.; Dekkers, O.M.; Sørensen, H.T.; Jørgensen, J.O.L. Acromegaly incidence, prevalence, complications and long-term prognosis: A nationwide cohort study. *Eur. J. Endocrinol.* **2016**, *175*, 181–190. [[CrossRef](#)]
8. Regal, M.; Páramo, C.; Sierra, J.M.; García-Mayor, R.V. Prevalence and incidence of hypopituitarism in an adult Caucasian population in northwestern Spain. *Clin. Endocrinol.* **2001**, *55*, 735–740. [[CrossRef](#)]
9. Parent, A.D.; Bebin, J.; Smith, R.R. Incidental pituitary adenomas. *J. Neurosurg.* **1981**, *54*, 228–231. [[CrossRef](#)]
10. Mestron, A.; Webb, S.M.; Astorga, R.; Benito, P.; Catala, M.; Gaztambide, S.; Gomez, J.-M.; Halperin, I.; Lucas-Morante, T.; Moreno, B.; et al. Epidemiology, clinical characteristics, outcome, morbidity and mortality in acromegaly based on the Spanish Acromegaly Registry (Registro Español de Acromegalia, REA). *Eur. J. Endocrinol.* **2004**, *151*, 439–446. [[CrossRef](#)]
11. Swearingen, B.; Barker, F.G.; Katznelson, L.; Biller, B.M.K.; Grinspoon, S.; Klibanski, A.; Moayeri, N.; Black, P.M.; Zervas, N.T. Long-term mortality after transsphenoidal surgery and adjunctive therapy for acromegaly. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1998**, *83*, 3419–3426. [[CrossRef](#)]
12. Ntali, G.; Karavitaki, N. Recent advances in the management of acromegaly. *F1000Research* **2015**, *4*, 1426. [[CrossRef](#)]
13. Dekkers, O.M.; Biermasz, N.R.; Pereira, A.M.; Romijn, J.A.; Vandenbroucke, J.P. Mortality in acromegaly: A metaanalysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *93*, 61–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Wright, A.D.; Hill, D.M.; Lowy, C.; Fraser, T.R. Mortality in acromegaly. *Q. J. Med.* **1970**, *39*, 1–16.
15. Cook, D.M.; Yuen, K.C.; Biller, B.M.; Kemp, S.F.; Vance, M.L. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for growth hormone use in growth hormone-deficient adults and transition patients—2009 update. *Endocr. Pract.* **2009**, *15*, 1–29. [[CrossRef](#)]
16. Badaru, A.; Wilson, D.M. Alternatives to growth hormone stimulation testing in children. *Trends Endocrinol. Metab.* **2004**, *15*, 252–258. [[CrossRef](#)]
17. Zadik, Z.; Chalew, S.A.; Gilula, Z.; Kowarski, A.A. Reproducibility of growth hormone testing procedures: A comparison between 24-hour integrated concentration and pharmacological stimulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1990**, *71*, 1127–1130. [[CrossRef](#)]
18. Shen, Y.; Zhang, J.; Zhao, Y.; Yan, Y.; Liu, Y.; Cai, J. Diagnostic value of serum IGF-1 and IGFBP-3 in growth hormone deficiency: A systematic review with meta-analysis. *Eur. J. Pediatr.* **2014**, *174*, 419–427. [[CrossRef](#)]
19. Höybye, C.; Wahlström, E.; Tollet-Egnell, P.; Norstedt, G. Metabolomics: A tool for the diagnosis of GH deficiency and for monitoring GH replacement? *Endocr. Connect.* **2014**, *3*, 200–206. [[CrossRef](#)]
20. Svensson, J.; Johannsson, G.; Bengtsson, B.-A. Insulin-like growth factor-I in growth hormone-deficient adults: Relationship to population-based normal values, body composition and insulin tolerance test. *Clin. Endocrinol.* **1997**, *46*, 579–586. [[CrossRef](#)]
21. Hilding, A.; Hall, K.; Wivall-Helleryd, I.-L.; Sääf, M.; Melin, A.-L.; Thorén, M. Serum levels of insulin-like growth factor I in 152 patients with growth hormone deficiency, aged 19–82 years, in relation to those in healthy subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1999**, *84*, 2013–2019. [[CrossRef](#)]
22. Pokrajac, A.; Wark, G.; Ellis, A.R.; Wear, J.; Wieringa, G.E.; Trainer, P.J. Variation in GH and IGF-I assays limits the applicability of international consensus criteria to local practice. *Clin. Endocrinol.* **2007**, *67*, 65–70. [[CrossRef](#)]
23. Chanson, P.; Arnoux, A.; Mavromati, M.; Brailly-Tabard, S.; Massart, C.; Young, J.; Piketty, M.-L.; Souberbielle, J.-C.; for the VARIETE Investigators. Reference values for IGF-I serum concentrations: Comparison of six immunoassays. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2016**, *101*, 3450–3458. [[CrossRef](#)]
24. Murray, P.G.; Dattani, M.T.; Clayton, P.E. Controversies in the diagnosis and management of growth hormone deficiency in childhood and adolescence. *Arch. Dis. Child.* **2015**, *101*, 96–100. [[CrossRef](#)]
25. Yuen, K.C.; Tritos, N.A.; Samson, S.L.; Hoffman, A.R.; Katznelson, L. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Disease state clinical review: Update on growth hormone stimulation testing and proposed revised cut-point for the glucagon stimulation test in the diagnosis of adult growth hormone deficiency. *Endocr. Pract.* **2016**, *22*, 1235–1244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Inoue-Lima, T.H.; Vasques, G.A.; Nakaguma, M.; Brito, L.P.; Mendonça, B.B.; Arnhold, I.J.; Jorge, A.A.L. A Bayesian approach to diagnose growth hormone deficiency in children: Insulin-like growth factor type 1 is valuable for screening and IGF-binding protein type 3 for confirmation. *Horm. Res. Paediatr.* **2020**, *93*, 197–205. [[CrossRef](#)]
27. Fernandez-Perez, L.; Novoa, J.; Ståhlberg, N.; Santana-Farré, R.; Boronat, M.; Marrero, D.; Henriquez-Hernandez, L.A.; Norstedt, G.; Flores-Morales, A. The effect of in vivo growth hormone treatment on blood gene expression in adults with

- growth hormone deficiency reveals potential biomarkers to monitor growth hormone therapy. *Clin. Endocrinol.* **2009**, *72*, 800–806. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Yakar, S.; Setser, J.; Zhao, H.; Stannard, B.; Haluzik, M.; Glatt, V.; Bouxsein, M.L.; Kopchick, J.J.; Leroith, D. Inhibition of growth hormone action improves insulin sensitivity in liver IGF-1-deficient mice. *J. Clin. Investig.* **2004**, *113*, 96–105. [[CrossRef](#)]
  29. Ertl, D.-A.; Chen, J.; Gleiss, A.; Janu, D.; Sagmeister, S.; Raimann, A.; Riedl, S.; Haeusler, G. Diagnostic value of serum acid-labile subunit alone and in combination with IGF-I and IGFBP-3 in the diagnosis of growth hormone deficiency. *Horm. Res. Paediatr.* **2020**, *93*, 371–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  30. Neidert, M.C.; Sze, L.; Zwimpfer, C.; Sarnthein, J.; Seifert, B.; Frei, K.; Leske, H.; Rushing, E.J.; Schmid, C.; Bernays, R.-L. Soluble  $\alpha$ -klotho: A novel serum biomarker for the activity of GH-producing pituitary adenomas. *Eur. J. Endocrinol.* **2013**, *168*, 575–583. [[CrossRef](#)]
  31. Bahl, N.; Stone, G.; McLean, M.; Ho, K.K.Y.; Birzniece, V. Decorin, a growth hormone-regulated protein in humans. *Eur. J. Endocrinol.* **2018**, *178*, 145–152. [[CrossRef](#)]
  32. Cruz-Topete, D.; Jorgensen, J.O.L.; Christensen, B.; Sackmann-Sala, L.; Krusenstjerna-Hafstrøm, T.; Jara, A.; Okada, S.; Kopchick, J.J. Identification of new biomarkers of low-dose GH replacement therapy in GH-deficient patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, 2089–2097. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  33. Longobardi, S.; Keay, N.; Ehrnborg, C.; Cittadini, A.; Rosen, T.; Dall, R.; Boroujerdi, M.A.; Bassett, E.E.; Healy, M.L.; Pentecost, C.; et al. Growth hormone (GH) effects on bone and collagen turnover in healthy adults and its potential as a marker of GH abuse in sports: A double blind, placebo-controlled study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2000**, *85*, 1505–1512. [[CrossRef](#)]
  34. Neggers, S.J.C.M.M.; Biermasz, N.R.; Lely, A.J. What is active acromegaly and which parameters do we have? *Clin. Endocrinol.* **2012**, *76*, 609–614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  35. Schilbach, K.; Olsson, D.S.; Boguszewski, M.C.; Bidlingmaier, M.; Johannsson, G.; Jørgensen, J.-O.L. Biomarkers of GH action in children and adults. *Growth Horm. IGF Res.* **2018**, *40*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  36. Flores-Morales, A.; Greenhalgh, C.J.; Norstedt, G.; Rico-Bautista, E. Negative regulation of growth hormone receptor signaling. *Mol. Endocrinol.* **2006**, *20*, 241–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  37. Greenhalgh, C.J.; Rico-Bautista, E.; Lorentzon, M.; Thaus, A.L.; Morgan, P.O.; Willson, T.A.; Zervoudakis, P.; Metcalf, D.; Street, I.; Nicola, N.A.; et al. SOCS2 negatively regulates growth hormone action in vitro and in vivo. *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 397–406. [[CrossRef](#)]
  38. Uyttendaele, I.; Lemmens, I.; Verhee, A.; De Smet, A.-S.; Vandekerckhove, J.; Lavens, D.; Peelman, F.; Tavernier, J. Mammalian protein-protein interaction trap (MAPPIT) analysis of STAT5, CIS, and SOCS2 interactions with the growth hormone receptor. *Mol. Endocrinol.* **2007**, *21*, 2821–2831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  39. Vesterlund, M.; Zadjali, F.; Persson, T.; Nielsen, M.L.; Kessler, B.M.; Norstedt, G.; Flores-Morales, A. The SOCS2 ubiquitin ligase complex regulates growth hormone receptor levels. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25358. [[CrossRef](#)]
  40. Tollet-Egnell, P.; Flores-Morales, A.; Stavréus-Evers, A.; Sahlin, L.; Norstedt, G. Growth hormone regulation of SOCS-2, SOCS-3, and CIS messenger ribonucleic acid expression in the rat. *Endocrinology* **1999**, *140*, 3693–3704. [[CrossRef](#)]
  41. Hochberg, I.; Tran, Q.T.; Barkan, A.L.; Saltiel, A.R.; Chandler, W.F.; Bridges, D. Gene expression signature in adipose tissue of acromegaly patients. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0129359. [[CrossRef](#)]
  42. Kamura, T.; Maenaka, K.; Kotoshiba, S.; Matsumoto, M.; Kohda, D.; Conaway, R.C.; Conaway, J.W.; Nakayama, K.I. VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 3055–3065. [[CrossRef](#)]
  43. Deshaies, R.J.; Joazeiro, C.A. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 399–434. [[CrossRef](#)]
  44. Badolato, R.; Bond, H.M.; Venuta, S.; Tenore, A.; Valerio, G.; Petrella, A.; Morrone, G.; Waters, M.J. Differential expression of surface membrane growth hormone receptor on human peripheral blood lymphocytes detected by dual fluorescence flow cytometry. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1994**, *79*, 984–990. [[CrossRef](#)]
  45. Gossing, W.; Radke, L.; Frohme, M.; Biering, H. ECS-Komplex—Ein neuer Biomarker bei Wachstumshormonstörungen? *Wiss. Beiträge* **2016**, *20*, 23–29. [[CrossRef](#)]
  46. Prentice, R.L. A generalization of the probit and logit methods for dose response curves. *Biometrics* **1976**, *32*, 761–768. [[CrossRef](#)]
  47. Rahman Farazi, M.M.; Rahmatullah Imon, A.H.M. Detection of outliers in gene expression data using expressed robust T test. *Malays. J. Math. Sci.* **2016**, *10*, 117–135. Available online: <https://einspem.upm.edu.my/journal/fullpaper/vol10no2may/1.%20imon.pdf> (accessed on 11 February 2021).
  48. Murtagh, F.; Legendre, P. Ward's hierarchical agglomerative clustering method: Which algorithms implement Ward's criterion? *J. Classif.* **2014**, *31*, 274–295. [[CrossRef](#)]
  49. Kuncheva, L. *Combining Pattern Classifiers: Methods and Algorithms*, 1st ed.; Wiley-Interscience: Hoboken, NJ, USA, 2004.

50. Bonapart, I.E.; Van Domburg, R.; ten Have, S.M.T.H.; De Herder, W.W.; Erdman, R.A.M.; Janssen, J.A.M.J.L.; Van Der Lely, A.J. The 'bio-assay' quality of life might be a better marker of disease activity in acromegalic patients than serum total IGF-I concentrations. *Eur. J. Endocrinol.* **2005**, *152*, 217–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Leung, K.-C.; Johannsson, G.; Leong, G.M.; Ho, K.K.Y. Estrogen regulation of growth hormone action. *Endocr. Rev.* **2004**, *25*, 693–721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Leong, G.M.; Moverare, S.; Brce, J.; Doyle, N.; Sjögren, K.; Dahlman-Wright, K.; Gustafsson, J.-A.; Ho, K.K.Y.; Ohlsson, C.; Leung, K.-C. Estrogen up-regulates hepatic expression of suppressors of cytokine signaling-2 and -3 in vivo and in vitro. *Endocrinology* **2004**, *145*, 5525–5531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Favre, H.; Benhamou, A.; Finidori, J.; Kelly, P.A.; Edery, M. Dual effects of suppressor of cytokine signaling (SOCS-2) on growth hormone signal transduction. *FEBS Lett.* **1999**, *453*, 63–66. [[CrossRef](#)]
54. Greenhalgh, C.J.; Metcalf, D.; Thaus, A.L.; Corbin, J.E.; Uren, R.T.; Morgan, P.O.; Fabri, L.J.; Zhang, J.-G.; Martin, H.M.; Willson, T.A.; et al. Biological evidence that SOCS-2 can act either as an enhancer or suppressor of growth hormone signaling. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 40181–40184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Dobie, R.; Macrae, V.E.; Huesa, C.; van't Hof, R.; Ahmed, S.F.; Farquharson, C. Direct stimulation of bone mass by increased GH signalling in the osteoblasts of *Socs2*<sup>-/-</sup> mice. *J. Endocrinol.* **2014**, *223*, 93–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Neggers, S.J.C.M.M.; van Aken, M.O.; De Herder, W.W.; Feelders, R.A.; Janssen, J.A.M.J.L.; Badia, X.; Webb, S.M.; van der Lely, A.J. Quality of life in acromegalic patients during long-term somatostatin analog treatment with and without pegvisomant. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *93*, 3853–3859. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## **12. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 13. Publikationsliste

### 13.1 Publikationen

- 2016 Gossing W, Radke L, Frohme M, Biering H. ECS-Komplex – ein neuer Biomarker bei Wachstumshormonstörungen? *Wissenschaftliche Beiträge der TH Wildau*. 2016; 20:23–29. doi: 10.15771/0949-8214\_2016\_1\_3
- 2020 Gossing W, Frohme M, Radke L. Biomarkers for Liquid Biopsies of Pituitary Neuroendocrine Tumors. *Biomedicines*. 2020; 8(6):148. doi: 10.3390/biomedicines8060148
- 2021 Gossing W, Radke L, Biering H, Diederich S, Mai K, Frohme M. The ElonginB/C-Cullin5-SOCS-Box-Complex Is A Potential Biomarker for Growth Hormone Disorders. *Biomedicines*. 2021; 9(2), 201. doi: 10.3390/biomedicines9020201
- 2021 Bahreini F, Gossing W, Frohme M, Rezaei N. Non-coding RNAs and Pituitary Adenoma. *in Vorbereitung*

### 13.2 Poster

- 2017 Gossing W, Frohme M, Biering H. ECS-Komplex – ein neuer Biomarker für seltene Wachstumshormonstörungen? Wissenschaftswoche der Technischen Hochschule Wildau, 2017
- 2020 Gossing W, Radke L, Stehr D, Frohme M, Biering H. Neue Ansätze zur Diagnostik von Wachstumshormonstörungen. Wissenschaftswoche der Technischen Hochschule Wildau, 2020

### 13.3 Präsentationen

- 2016 Gossing W. Validierung neuartiger Companion Diagnostics bei Wachstumshormondefizienz und Akromegalie basierend auf dem ECS-Komplex. 2. Novartis EndoDay 2016, 24.-25.02.2016, Nürnberg
- 2017 Gossing W. ECS-Komplex – ein therapeutischer Kontrollparameter bei Wachstumshormonstörungen? Validierung eines neuen Biomarkers für die personalisierte Medizin. 42. Informationsveranstaltung der Regionalgruppe Berlin, Netzwerk Hypophysen- und Nebennierenerkrankungen e.V, 22.04.2017, Technische Hochschule Wildau

### 13.4 Reviewertätigkeiten

- 2017 für: Expert Review of Proteomics
- 2020 für: Nature Communications Biology

## 14. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei allen Personen, die mich in den letzten Jahren am und abseits des Arbeitsplatzes und der Laborbank unterstützt haben.

Ich danke meinem Erstbetreuer Prof. Dr. Sven Diederich für die unkomplizierte Bereitschaft der Betreuung dieser Arbeit und für seinen wiederholten Einsatz bei der Überzeugung (und Erinnerung) seiner Kollegen zur Bereitstellung der Blutproben für dieses Projekt.

Ich danke meinem Zweitbetreuer, Chef und vor allem Mentor Prof. Dr. Marcus Frohme für seinen Einsatz bei der Entwicklung dieses Projekts, für seine stete Hilfsbereitschaft, für sein offenes Ohr bei allen Problemen oder Wünschen und auch für den gewährten zeitlichen Aufschub zur erfolgreichen Beendigung dieses Projektes. Durch ihn fühlte ich mich bei der Arbeit von Anfang an wohl, willkommen und motiviert.

Dem Prof. Dr. Henrik Biering sei ebenfalls für die Entwicklung dieses Projekts gedankt. Durch seine hilfsbereite und freundschaftliche Art hat die Zusammenarbeit mit ihm stets Spaß gemacht. Ich danke ihm besonders für die vielen aufgebauten Erstkontakte zu anderen Ärzten, durch die ich letztendlich doch noch an ausreichend Blutproben von Patienten mit diesen Krankheiten kam – auch wenn es am Ende deutlich weniger waren, als wir zu Anfang erwartet hatten.

Mein ganz besonderer Dank gilt all den wunderbaren Menschen aus der Arbeitsgruppe Molekulare Biotechnologie und Funktionelle Genomik. Ihr habt all die Jahre die perfekte Kombination aus professioneller und freundschaftlicher Atmosphäre versprüht. Ohne die (oft sehr ausgiebigen) Pläuschchen mit euch hätte die Zeit wohl kaum halb so viel Spaß gemacht 😊 Es war eine schöne Zeit mit euch allen!

Ich bedanke mich außerdem bei den vielen Ärzten und Krankenschwestern der verschiedenen Arztpraxen, insbesondere bei Dr. Christine Rühl, Dr. Reinhard Finke, Dr. Bärbel Seidlitz, Dr. Oskar Kelp, Dr. Gerhard Stiglmaier, Prof. Dag Moskopp, Dr. Sonja Frohme, Dr. Yawen Wang, Martina Salzwedel, Manjana Hirsch und Antje Kochinke, für die Organisation und die extra Blutentnahmen für meine Studie vor Ort. An dieser Stelle sei auch den vielen anonymen Blutspendern gedankt, ohne die diese Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.

Ein großer Dank gilt auch Dr. Knut Mai, den ich auf den letzten Drücker noch um Korrekturen eines Manuskriptes bitten konnte und der mir sehr bei der Strukturierung meiner Daten half.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern den allergrößten Dank aussprechen. Ihr habt mich stets gefordert und gefördert und so den Ehrgeiz in mir erweckt, dank dem ich auch diese Arbeit fertigstellen konnte.

Es war eine wahrlich aufregende Zeit mit all ihren Höhen und Tiefen. Ich werde ganz sicher ein Leben lang in besten Erinnerungen darauf zurückblicken.