

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Tübingen

Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

Sektion Pädiatrische Endokrinologie

Leiter: Professor Dr. M. B. Ranke

**Mutationsanalyse des Prop-1-Gens bei Kindern mit
hypoplastischer Adenohypophyse und ektooper
Neurohypophyse**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard Karls Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Sofia Schywalsky, geb. Tsirpouchtsidou

aus

Sindelfingen

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. B. Ranke

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. B. Gallwitz

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	7
1.1. Entwicklung und Wachstum	7
1.2. Kleinwuchs	8
1.3. Wachstumshormonmangel	10
1.3.1. Das Wachstumshormon und sein Regelkreis	13
1.3.2. Ursachen des Wachstumshormonmangels	17
1.4. Das GH-Gen-Cluster und die Regulation der Transkription	18
1.4.1. Pit-1	19
1.4.2. Prop-1	20
2. Zielsetzung und Patienten	22
2.1. Zielsetzung	22
2.2. Patienten	22
3. Material und Methoden	27
3.1. Material	27
3.1.1. Reagenzien	27
3.1.2. Enzyme	28
3.1.3. Molekulargewichtsmarker	28
3.1.4. Kits für die Molekularbiologie	28
3.1.5. Verwendete Primer	29
3.1.6. Geräte	31
3.1.7. Verbrauchsmaterialien	32
3.2. Methoden	32
3.2.1. DNA – Extraktion	32
3.2.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	35
3.2.3. Polymerase–Ketten–Reaktion	36
3.2.4. Gelelektrophorese allgemein	41
3.2.5. Einzelstrang – Konformationsanalyse	44
3.2.6. DNA – Sequenzierung	45

4.	Ergebnisse	50
4.1.	DNA – Extraktion	50
4.2.	DNA – Amplifikation mittels PCR	50
4.3.	PCR – SSCP – Analyse	54
4.4.	Ergebnisse der Sequenzier – Analyse	59
5.	Diskussion	61
6.	Zusammenfassung	70
7.	Literaturverzeichnis	72
8.	Abbildungsverzeichnis	78
9.	Tabellenverzeichnis	80
10.	Anhänge	80

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaar
CPHD	Combined pituitary hormone deficiency
CRH	Corticotropin-releasing hormone
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleotid
df	Dwarf-Genlocus für Zwergwuchs der Ames-Zwergmaus
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
gDNA	Genomische DNA
GH	Growth Hormone
GHF-1	Growth Hormone Factor 1 = Pit 1
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
hGH	Human Growth hormone
hPL (pseudo)	Humanes plazentares Laktogen (Pseudogen)
IGF-I	Insulin-like growth factor I
IGFBP-3	Insulin-like growth factor binding protein - 3
IGHD	Isolated growth hormone deficiency
kB	Kilo-Basenpaare
KEV	Konstitutionelle Entwicklungsverzögerung
LCR	Locus control region
LH	Luteinisierendes Hormon
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
OD	Optische Dichte

PAGE	Polyacrylamidelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
Pit1	Pituitary factor 1
Prl	Prolaktin
Prop1	Prophet of Pit1
SD	Standard deviation
SSCP	Single strand conformational polymorphism
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRH	Thyreotropin-releasing hormone
TSH	Thyreoidea stimulierendes Hormon
U	Units
WH	Wachstumshormon

1. Einleitung

1.1. *Entwicklung und Wachstum*

Entwicklung und Wachstum eines Menschen beinhalten Veränderungen, die innerhalb eines bestimmten Zeitraumes ablaufen und die sowohl von genetischen Anlagen vorgegeben sind wie auch durch Umwelteinflüsse modifiziert werden.

Wachstum ist bestimmt als Zunahme von Grösse und Leistungsfähigkeit.

Ob die Entwicklung eines Kindes bzw. dessen Wachstum normal verläuft oder pathologisch erscheint, hängt davon ab, ob die Zunahme von Körpergrösse und Gewicht den Kinder seiner Altersgruppe entspricht.

In den sogenannten Perzentilenkurven entspricht die 50. Perzentile als Gipfel der Gaußschen Verteilung den Mittelwerten des Normalkollektivs. Dabei entspricht die einfache Standardabweichung, die sogenannte 1-Sigma – Grenze, der 25. bzw. 75. Perzentile, und die Normgrenzen, die 2-Sigma – Grenzen, der 3. bzw. 97 Perzentile.

Ein wichtiger Begriff in Entwicklung und Wachstum eines Kindes ist die sogenannte säkulare Akzeleration, welche besagt, dass die Körpermaße von Generation zu Generation zugenommen haben, was sowohl die Wachstumsgeschwindigkeit wie auch die Endgrösse einschliesst. Auszugehen ist von einem Zusammenhang des säkulären Wachstums mit den zunehmend verbesserten Lebensbedingungen unserer Zeit, was wiederum den äußeren Einfluss der Umwelt auf das Wachstumsverhalten der Kinder hervorhebt.

Wachstumsprognosen können gestellt werden etwa ab einem Alter von 7- 8 Jahren anhand der Handwurzelentwicklung und der momentanen Grösse des Kindes. Man fertigt ein Röntgenbild der Kinderhand an und kann mit Hilfe von Atlanten, z.B. von Greulich und Pyle bestimmen, ob die Knochenreife beschleunigt oder verzögert ist.

Zusätzlich bestehen statistisch evaluierbare Beziehungen zwischen der Grösse des Kindes und derjenigen der Eltern, so dass aufgrund des genetischen

Anteils des Wachstumsverhaltens der Kinder anhand folgender Formel die sogenannte familiäre Zielgröße bestimmt werden kann:

$\text{Zielgrösse} = (\text{Grösse des Vaters} + \text{Grösse der Mutter}) / 2$	- 6,5 cm für Töchter + 6,5 cm für Söhne
---	--

Tritt das Kind in die Pubertät ein, kommt es zu weiteren Veränderungen (Veränderungen der Genitalien, Ausbildung sekundärer Geschlechtsmerkmale), wobei nach Tanner und Whitehouse verschiedene Stadien unterschieden werden, die das Kind im Verlauf seines Wachstums zu bestimmten Zeiten durchlaufen muss.

1.2. Kleinwuchs

Die Definition des Kleinwuchses orientiert sich an den bereits erwähnten Perzentilenkurven, anhand derer die Grössen- (und auch Gewichts- und Kopfumfangs) -maße eines Kindes im Vergleich zu seinen Altersgenossen in Perzentilenwerten angegeben werden können.

Per Definitionem ist ein Kind kleinwüchsig, wenn sich seine Körperhöhe unter der 3. Perzentile befindet, bzw. die sog. 2-Sigma-Grenze unterschreitet. Natürlich kann eine momentan gemessene Grösse nicht über die Diagnose einer Wachstumsstörung entscheiden. Vielmehr gilt es, die Körperhöhe über einen längeren Zeitraum von mindestens 6 Monaten zu beobachten, um die Wachstumsgeschwindigkeit zu ermitteln, wobei in den unterschiedlichen Wachstumsphasen der Kinder unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten bestehen, die berücksichtigt werden müssen.

Grundsätzlich sind parallel zu den Perzentilenkurven verlaufende Wachstumskurven weniger auffällig als plötzlich abnehmende Wachstumsraten mit abknickenden Kurven.

Die Ursachen eines Kleinwuchses können vielfältig sein, da insgesamt zahlreiche Faktoren auf die Entwicklung und das Wachstum eines Kindes einwirken.

Die folgende Tabelle fasst diese zusammen:

Ursachen für Kleinwuchs	
<p>1. Erb Faktoren Die Zielgrösse wird von den Elterngrössen bestimmt.</p> <p>1. konstitutionelle Entwicklungsverzögerung 2. familiärer Minderwuchs</p>	<p>4. Organerkrankungen und Stoffwechselleiden - Herzfehler, chronische Erkrankungen der Lungen, Nieren, Leber, des Darmtraktes, blutbildenden Systems u.a.</p>
<p>2. Chromosomale Anomalien - Down Syndrom - Ullrich – Turner – Syndrom</p>	<p>5. Hormonstörungen - Mangel an Wachstumshormon, Schilddrüsenhormon - Überschuss an Cortisol (Cushing-Syndrom)</p>
<p>3. Pränatale Störungen führen zum intrauterinen Kleinwuchs - Mangel-, Fehlernährung der Schwangeren - gestörte Funktion der Plazenta - toxische Substanzen (Alkohol, Nikotin, Drogen) - Infektionen</p>	<p>6. Minderwuchs bei Syndromen - Silver – Russel – Syndrom - Prader – Willi – Labhart – Syndrom - Pseudohypoparathyreoidismus - Bloom – Syndrom</p>
	<p>7. Psychosozialer Kleinwuchs</p>

Tabelle 1: Ursachen für Kleinwuchs (nach Zabransky S., Krankheiten der innersekretorischen Drüsen, Pädiatrie, 1995)

Von der pathologischen Form des Kleinwuchses sollten insbesondere zwei Normvarianten abgegrenzt werden.

Beim sogenannten familiären Kleinwuchs liegt die Grösse der Kinder unter der 3. Perzentile, allerdings verläuft deren Knochenentwicklung und der Eintritt in die Pubertät zeitgerecht. Und die Eltern des Kindes sind ebenfalls kleinwüchsig.

Im zweiten Fall spricht man von der sogenannten konstitutionellen Entwicklungsverzögerung (KEV). Im Gegensatz zum familiären Kleinwuchs tritt in diesen Fällen der Eintritt in die Pubertät verzögert ein, und auch die Knochenentwicklung verläuft retardiert.

Man spricht bei diesen Kindern von „Spätentwicklern“, deren Eltern häufig ebenfalls verzögert in die Pubertät eintraten.

Die Endgrösse liegt im Normbereich, zumeist im unteren. Durch den verzögerten Pubertätseintritt verläuft die Wachstumskurve dieser Patienten in dieser Phase etwas weiter vom Normbereich abweichend.

Insbesondere bei psychosozialer Belastung der Kinder durch den Kleinwuchs kann bei der KEV durch schwache, nicht – aromatisierbare Androgene die verzögerte Entwicklung annähernd normalisiert werden.

Abgesehen von diesen Normvarianten gibt es auch krankhafte Formen des Kleinwuchses.

Für diese Arbeit bedeutend war der sogenannte hypophysäre Kleinwuchs, der durch einen Mangel an Wachstumshormon zustande kommt. Manifestieren kann sich dieser bereits im Kleinkind - oder Säuglingsalter.

Wachstumshormone üben ihre Wirkung vorwiegend indirekt über die sogenannten Somatomedine aus. Gebildet werden diese in der Leber, so dass auch bei einer hepatischen Störung die wachstumsfördernde Wirkung des Wachstumshormons ausfällt und klinisch das Bild eines Wachstumshormonmangels entsteht.

1.3. Wachstumshormonmangel

Wie oben beschrieben ist also die Differentialdiagnose eines gestörten Wachstumsverhaltens umfangreich. Unter der Vorstellung allerdings, dass hormonelle Ursachen einer Wachstumsretardierung behandelbar sind, erscheint es sinnvoll, solch eine Störung frühzeitig zu erkennen und zu behandeln.

Zur Diagnosefindung können funktionelle Untersuchungen der Wachstumshormonachse herangezogen werden, welche allerdings äusserst sensibel auf innere und äussere Einflüsse reagieren können und somit wenig Sensitivität und Spezifität aufweisen. Die bildgebende Diagnostik kann hilfreich sein, allerdings nur in Fällen von Tumoren, einem völligem Fehlen oder einer Hypoplasie der Adeno- oder der Neurohypophyse.

Ein weiterer wichtiger Ansatz ist die Bestimmung des IGF-I-Wertes (Insulin – like growth Faktor I Clemmons DR and Van Wyk JJ, 1984; Rosenfeld RG et al, 1986, Blum WF, 1992).

IGF-I ist ein Wachstumsfaktor, der im Serum bestimmt werden kann und in Abhängigkeit von der Wachstumshormonsekretion gebildet wird. Da die Sekretion dieses Wachstumsfaktors, anders als beim Wachstumshormon, nicht pulsatil erfolgt, ist eine einzelne basale Messung aussagekräftig.

Auch die Synthese seines Bindungsproteins IGFBP-3 (Bindungsprotein 3) steht in Zusammenhang mit der Sekretion des Wachstumshormons und ist somit ein weiterer Parameter zur Diagnosestellung eines Wachstumshormonmangels (Blum et al., 1990). Es ist die im Blut vorherrschende Form der Bindungsproteine für die zirkulierenden IGFs (Drop SLS, 1992). Normale IGF-I und IGFBP-3-Werte machen einen Wachstumshormonmangel sehr unwahrscheinlich.

Der Zusammenhang dieser Parameter mit dem hormonellen Kleinwuchs ist durch die niedrigen Werte für IGF-I und IGFBP-3 bei Patienten mit WH-Mangel und deren Anstieg unter Therapie einerseits, und den erhöhten IGF-I und IGFBP-3-Werten bei der Erkrankung Akromegalie mit erhöhten Wachstumshormonkonzentrationen und mit unter Therapie sinkenden Werten andererseits belegt (Clemmons DR, 1979, Copeland KC et al., 1980, Blum WF und Ranke MB 1990, Jorgensen J et al 1991).

Laborchemische Untersuchungen bleiben somit richtungsweisend in der Diagnosestellung eines WH-Mangels, und zwar sowohl die Bestimmung der oben beschriebenen WH-abhängigen Parameter, wie auch die Bestimmung des Wachstumshormons selber.

Unterstehende Darstellung beschreibt das labordiagnostische Vorgehen bei Kindern mit den Symptomen eines WH-Mangels.

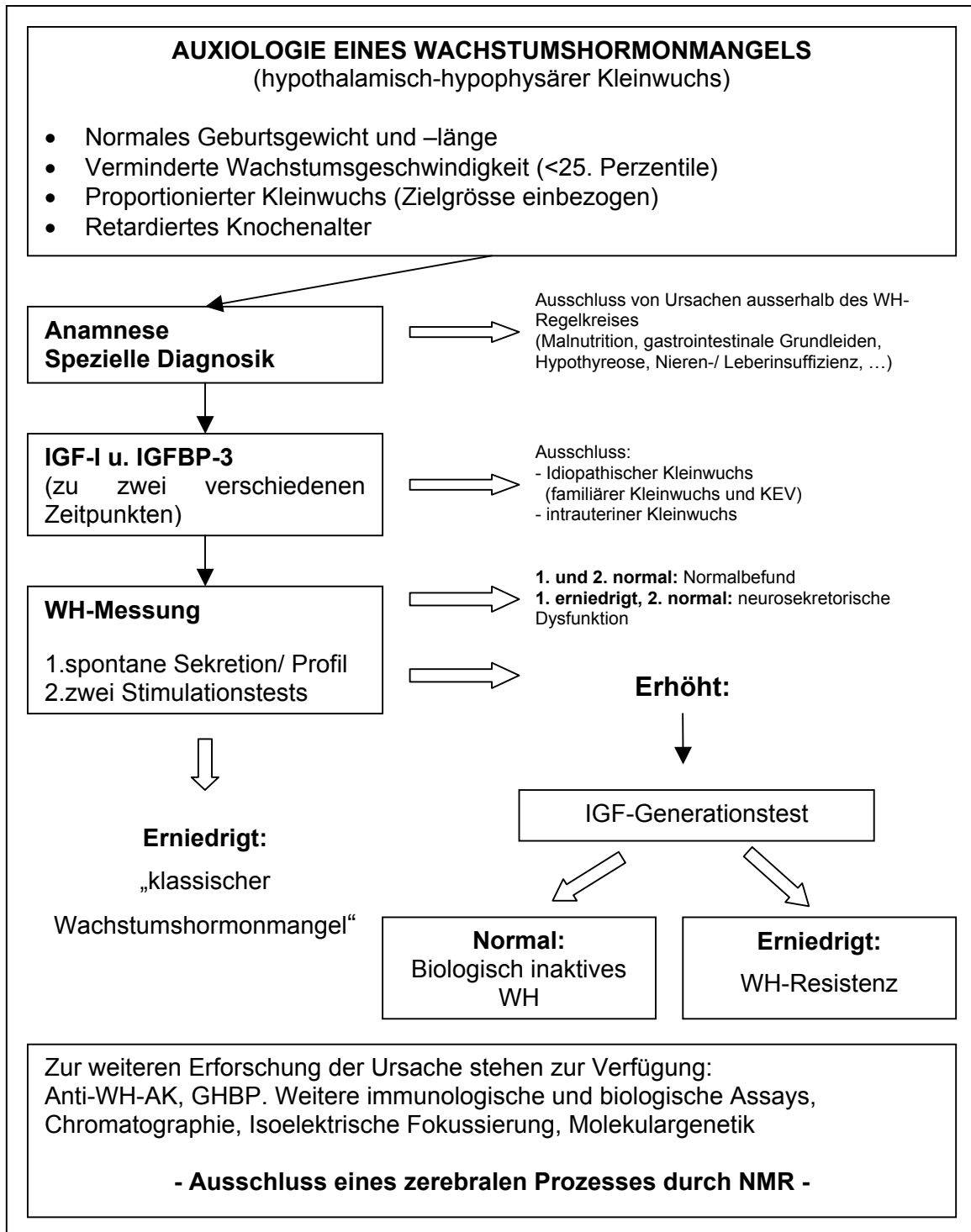


Abbildung 1: Diagnostische Strategien beim Kind mit Wachstumshormonmangelsyndrom (nach Ranke, 1999)

1.3.1. Das Wachstumshormon und sein Regelkreis

Das Wachstumshormon ist ein Polypeptidhormon, das aus 191 Aminosäuren aufgebaut und für das postnatale Wachstum verantwortlich ist (Binder G, Ranke MB, 1995). Seine Sequenz wird auf dem langen Arm von Chromosom 17 codiert. Es befindet sich in einem sogenannten Gen-Cluster, das 66 Kilobasen (KB) lang ist und auf dem sich in 5' – 3' – Richtung die Gensequenzen für das Wachstumshormon (GH-1), das Pseudogen für das plazentare Laktogen (hPLpseudo), das Gen für das plazentare Laktogen (hPL), das GH-Pseudogen (GH-2) und das plazentare Laktogen 2 (hPL2) befinden. Unter diesen Genen besteht eine Sequenzhomologie von über 90% (Pfäffle RW, 1998).

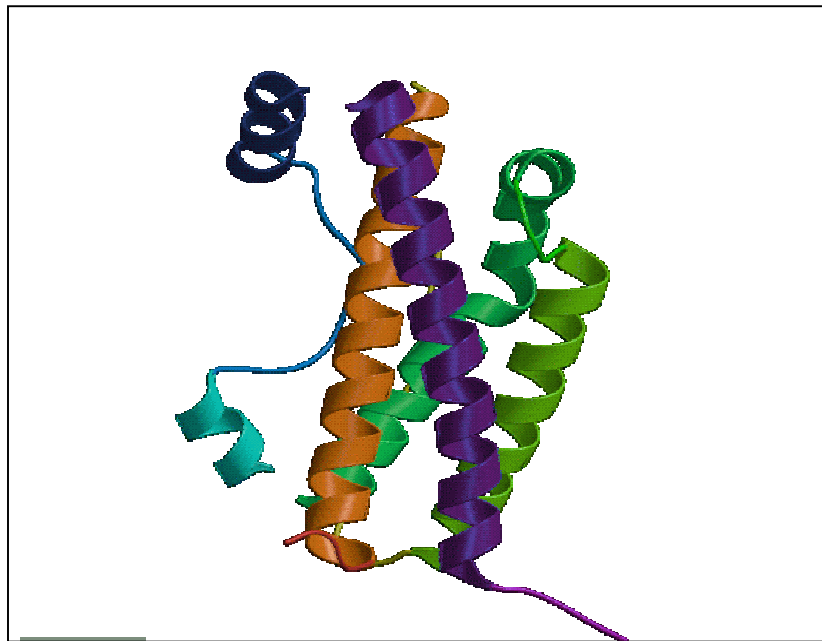


Abbildung 2: Darstellung des Wachstumshormons in seiner Sekundärstruktur bestehend aus einem Bündel von vier α -Helices

Gebildet und sezerniert wird das Wachstumshormon in den somatotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens.

Die Embryonalentwicklung der Hypophyse hat zwei Ursprünge:

Zum einen den epithelialen Teil, welcher der nach kranial reichenden Ausstülpung des Oropharynx, nach dem Erstbeschreiber Rathkesche Tasche genannt, entspringt, und zum zweiten den neuralen Anteil, welcher aus einem Anteil des Diencephalons (Saccus infundibuli) stammt.

Der Hypophysenvorderlappen umfasst 5 hormonproduzierende Zellreihen, deren Embryonalentwicklung in unterschiedlicher zeitlicher Abfolge erfolgt.

Insgesamt werden 6 verschiedene Hormone in der Adenohypophyse (Hypophysenvorderlappen) gebildet: das Wachstumshormon (GH), das luteinisierende Hormon (LH) und das follikelstimulierende Hormon (FH) (=Gonadotropine), das adrenokortikotrope Hormon (ACTH), das thyreoideastimulierende Hormon (TSH) und das Prolaktin (PRL).

Von der Neurohypophyse (Hypophysenhinterlappen) werden Vasopressin und Oxytocin sezerniert, welche in den Neuronen des Hypothalamus gebildet, über den Hypophysenstiel in die Neurohypophyse transportiert und darin gespeichert und bei Bedarf sezerniert werden.

Sogenannte positive und negative Rückkoppelungsmechanismen, welche zwischen Hypophysenvorderlappen einerseits, und Schilddrüse, Nebennierenrinde und Keimdrüsen (Zielorgane) andererseits bestehen, regulieren die Produktion und Sekretion der Hormone.

Der Hypothalamus wiederum bildet Releasing- und Inhibiting-Hormone (sog. hypophyseotrope Hormone), die regulierend auf die Hormonsekretion der Adenohypophyse wirken.

Untenstehende Abbildungen stellen den Regelkreis zwischen Hypothalamus und Hypophyse dar. Ausserdem die verschiedenen hormonellen Regelkreise der Hypophyse für die Hypophysenvorderlappenhormone und die Zielorgane.

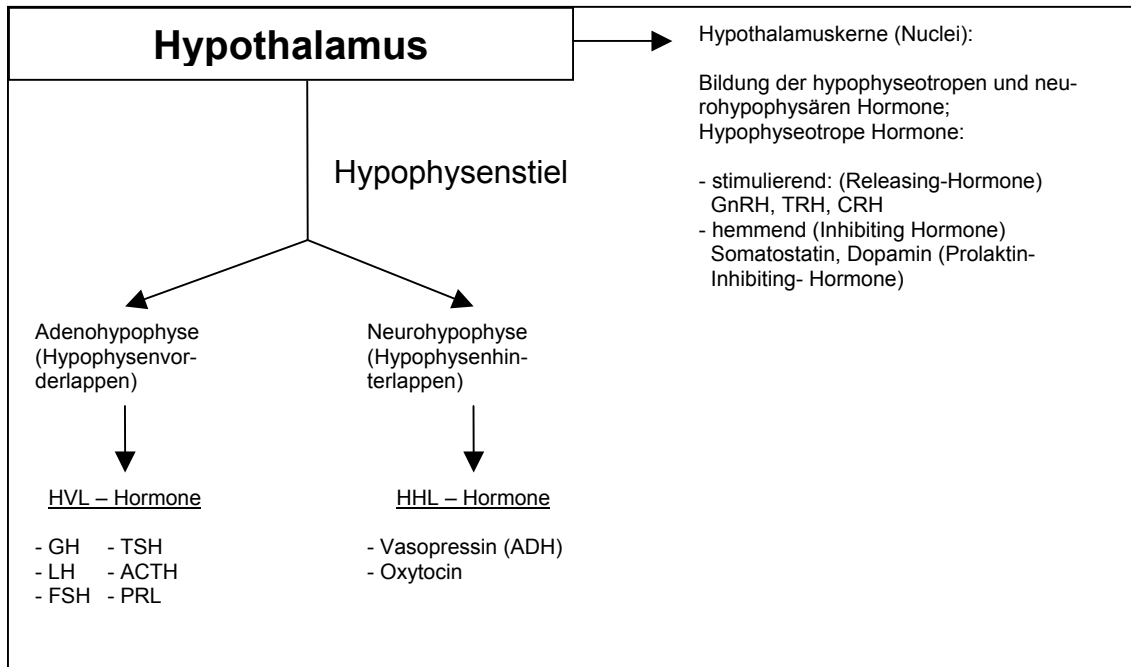


Abbildung 3: Nach HU Schweikert, Erkrankungen des Hypothalamus und der Hypophyse, Innere Medizin

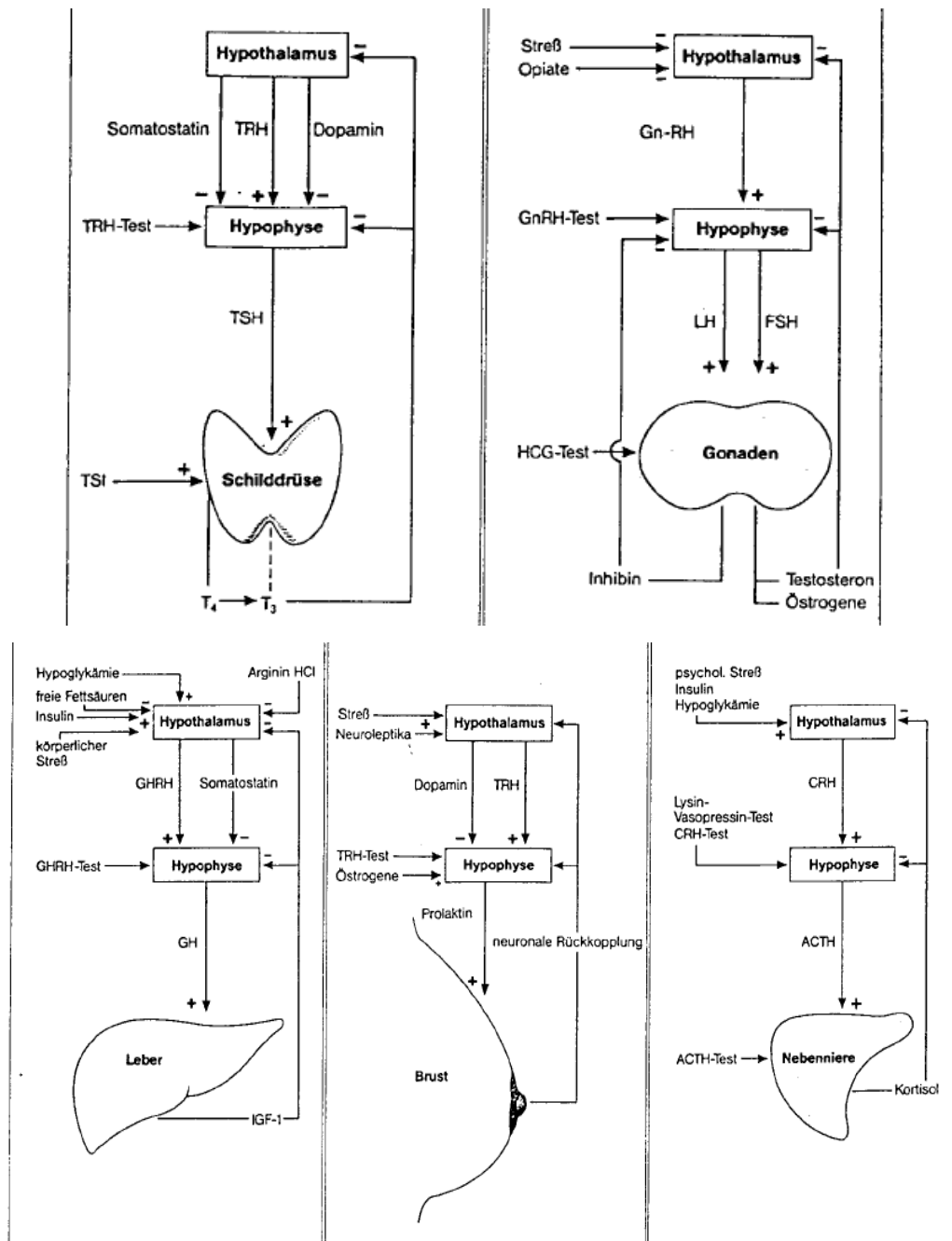


Abbildung 4: Hormoneller Regelkreis der Hypophyse für die Hypophysenvorderlappenhormone TSH, LH/FSH, ACTH und Prolaktin, stimulierende und inhibierende Einflüsse auf den verschiedenen Ebenen [aus Hesch et al., 2000]

1.3.2. Ursachen des Wachstumshormonmangels

Die häufigste Ursache des Wachstumshormonmangels bleibt idiopathisch. Embryonale Defekte mit anatomischen Anomalien, Tumoren, Traumata, oder Infektionen sind weit seltener.

Genetische Defekte durch Mutationen im Wachstumshormon – Gen – Cluster können zu einem isolierten Ausfall, bzw. zu einer verminderten Produktion von WH führen.

Bei Patienten mit isoliertem Wachstumshormonmangel (IGHD) werden vier Typen unterschieden (Rimoin , 1976; Fleisher et al. 1980).

Untenstehende Tabelle beschreibt ein System nach Phillips et al., bei dem eine Unterteilung des isolierten Wachstumshormonmangels nach dem Vererbungsmodus stattfindet:

Diagnose	Vererbungsmodus	GH
IGHD 1a	Rezessiv	Fehlt
IGHD 1b	Rezessiv	Niedrig
IGHD II	Dominant	Niedrig
IGHD III	X-gebunden	Niedrig
Bioinaktives GH	Rezessiv	Hoch
Laron Syndrom	Rezessiv	Hoch

Tabelle 2: Klassifikation des isolierten Wachstumshormonmangels (IGHD) sowie von Zuständen verminderter Wachstumshormonsensitivität (nach Phillips et al.)

Beim isolierten WH-Mangel vom Typ Ia handelt es sich um eine Makrodeletion, bei der es durch den Verlust eines häufig 67KB langen Fragmentes im Bereich des Gen-Clusters, welches das GH-1 Gen enthält, zu einem kompletten GH-Mangel kommt.

Bei diesen Patienten zeigt die Therapie mit WH ein initial gutes Ansprechen mit dann im Verlauf wieder stagnierender Wachstumsgeschwindigkeit durch die Bildung von Antikörpern gegen das Wachstumshormon.

Die Prävalenz dieser Makrodeletion bei Kindern mit WH – Mangel wird in Deutschland auf < 1% geschätzt (Pfäffle RW, 1998).

Beim IGHD Ib wurden Punktmutationen im Bereich der ersten Base der Spleiß-Donor-Stelle von Intron 4 gefunden, was zu einem alternativen Spleißen und somit zu einem Verlust der Aminosäuren 103 bis 126 führt. Dieser Frameshift betrifft die Aminosäuren die von Exon V kodiert werden. Bei diesen Patienten sind niedrige Spiegel für GH nachweisbar.

Eine Punktmutation der ersten Base der donor splice site von Intron 3, die zu einem Überspringen von Exon 3 führt und zu einem Verlust der Aminosäuren 32 bis 71 (Binder et al. 1995), führt zum IGHD von Typ II. Der Mechanismus des dominant negativen Effektes des mutierten GH auf das Wildtyp GH ist unklar.

Beim IGHD III weisen die Patienten zusätzlich zum WH-Mangel noch eine Hypo- bzw. Agammaglobulinämie auf (Conley et al, 1991). Der Vererbungsmodus erfolgt x-chromosomal.

Beim bioinaktiven Wachstumshormon (Kowarski-Syndrom) wird durch eine Mutation im Exon 4, die zu einem Austausch der Aminosäure Asparagin auf Position 112 zu Glycin führt, eine pathologische Form des GH gebildet.

Beim Laron-Syndrom handelt es sich um eine autosomal rezessiv vererbten WH - Rezeptordefekt.

1.4. Das GH-Gen-Cluster und die Regulation der Transkription

Die Expression der Gene vom GH-Gen-Cluster muss in effektiver Weise reguliert werden. So muss gewährleistet sein, dass die Hypophyse in ausreichender Menge Wachstumshormone produziert. Verantwortlich dafür sind sogenannte hypophysenspezifische Transkriptionsfaktoren, die dafür sorgen, dass der abzulesende DNA-Abschnitt in die sogenannte mRNA (messenger RNA) umgeschrieben und im weiteren Verlauf in das Protein „translatiert“ wird. Diese Transkriptionsfaktoren binden an DNA - Sequenzen, die den abzulesenden Gensequenzen vorgeschaltet sind, den sogenannten Gen-Promotoren.

Die Genpromotoren der verschiedenen Gene des gesamten GH – Gen - Clusters sind jeweils ungefähr 500 bp lang.

Zwischen den einzelnen Sequenzen besteht eine Homologie von >90%.

1.4.1. Pit-1

Der hypophysenspezifische Transkriptionsfaktor Pit-1 wurde Dank seiner Eigenschaft, spezifisch an DNA zu binden, isoliert. Da man initial irrtümlicherweise davon ausging, dass Pit-1 ausschliesslich an den GH-Genpromotor bindet, nannte man in GHF-1 (Growth Hormone Factor 1) (Castillo et al, 1989). Nachdem allerdings etwa zeitgleich ein zweiter hypophysenspezifischer Transkriptionsfaktor isoliert wurde, der sowohl an den GH- wie auch an den Prl-Promotor bindet und Pit-1 (Pituitary Factor 1) genannt wurde, stellte sich rasch heraus, dass es sich bei Pit-1 und GH-1 um denselben Faktor handelt.

Für eine ausreichende Aktivierung des GH-Gens müssen im Bereich des GH-Genpromotors zwei Bindungsstellen für Pit-1 vorhanden sein. Für eine optimale Aktivierung sind höchstwahrscheinlich weitere Transkriptionsfaktoren nötig. Der Prl- Genpromotor enthält mehrere Bindungsstellen für Pit-1 und auch der TSH-Genpromotor hat drei Bindungsstellen. Allerdings ist beim zuletzt genannten eine Transkription auch in Abwesenheit von Pit-1 möglich. Pit-1 bindet auch am Promotor des Pit-1-Gens selber und reguliert auf diese Weise fördernd und hemmend die Transkription von Pit-1 im Sinne einer Autoamplifikation.

Das von Pit-1-Gen kodierte Protein ist 291 Aminosäuren lang und 33 kD schwer und strukturell ein Homöodomän-Protein.

Es gehört als solches zur Untergruppe der sogenannten POU-Domän-Proteine (nach den Initialen von drei Proteinen benannt), welche die DNA-Bindungssequenz von Pit-1 darstellen. Als Homöodomänen werden durch eine spezifische Sequenz kodierte, sich wiederholende Motive der Transkriptionsfaktoren bezeichnet.

Diese Homöodomän-Proteine weisen in ihrer Tertiärstruktur ein sogenanntes Helix-Turn-Helix-Motiv auf, was für die Bindung an die DNA-Zielsequenz verantwortlich ist.

Die Bindung von Pit-1 an die DNA-Zielsequenz erfolgt auf nur 12 Basenpaaren, antiparallel an einander gegenüberliegenden Seiten der DNA, wie untenstehendes Schema veranschaulicht.

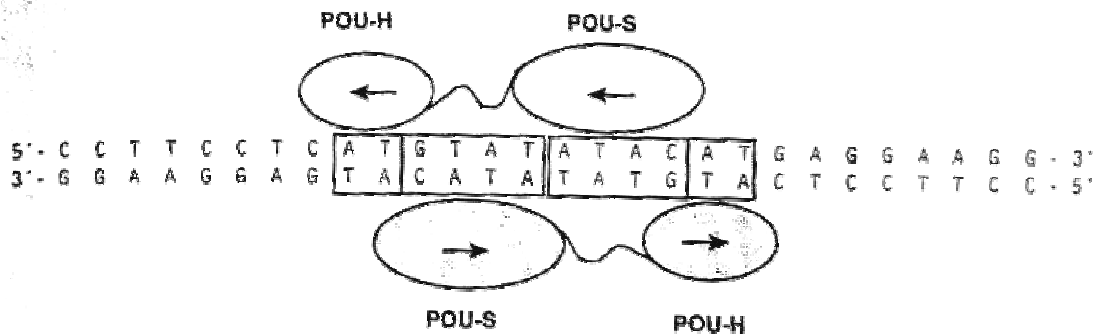


Abbildung 5: Schema zur Bindung von Pit-1 an seine Zielsequenz (nach Pfäffle RW, 1998)

Untersuchungen an zwergwüchsigen Mäusen erbrachten Mutationen im Bereich des Pit-1-Gens. Es wurde daraus geschlossen, dass eine verminderte Bindung von Pit-1 an die DNA-Zielsequenz Ursache der Zwergwüchsigkeit sein könnte (Li und Mitarbeiter, 1990).

1.4.2. Prop-1

Nach zahlreichen Untersuchungen mit rückgekreuzten Ames- Zwergmäusen, bei denen der df-Locus auf Chromosom 11 als Kandidaten-Locus für den hypophysären Kleinwuchs der Mäuse festgelegt wurde, wurden intensive Analysen durchgeführt, um eine Annäherung an den Genlocus der Zwergwüchsigkeit bei Menschen zu erreichen.

Dabei isolierte man einen Faktor, der hypophysenspezifisch und zeitlich vor Pit-1 exprimiert wurde. Aufgrund dessen wurde er Prop-1 (Prophet of Pit-1) genannt (Sornson et al 1996).

Im Bereich des Pit-1 Genpromotors existieren zwei Bindungsstellen für Prop-1. Allerdings ist in diesem Falle Prop-1 nicht allein für eine Transaktivierung verantwortlich. Eine Mutation des Prop-1-Genes führt zu einer verminderten oder fehlenden Expression von Pit-1.

Sequenzanalysen bei der zwergwüchsigen Ames-Maus erbrachten eine Punktmutation im Bereich der Prop-1-Sequenz, bei der Serin durch die Aminosäure Prolin ausgetauscht wurde (S 83 P-Mutation). Das mutierte Prop-1 wurde dennoch exprimiert.

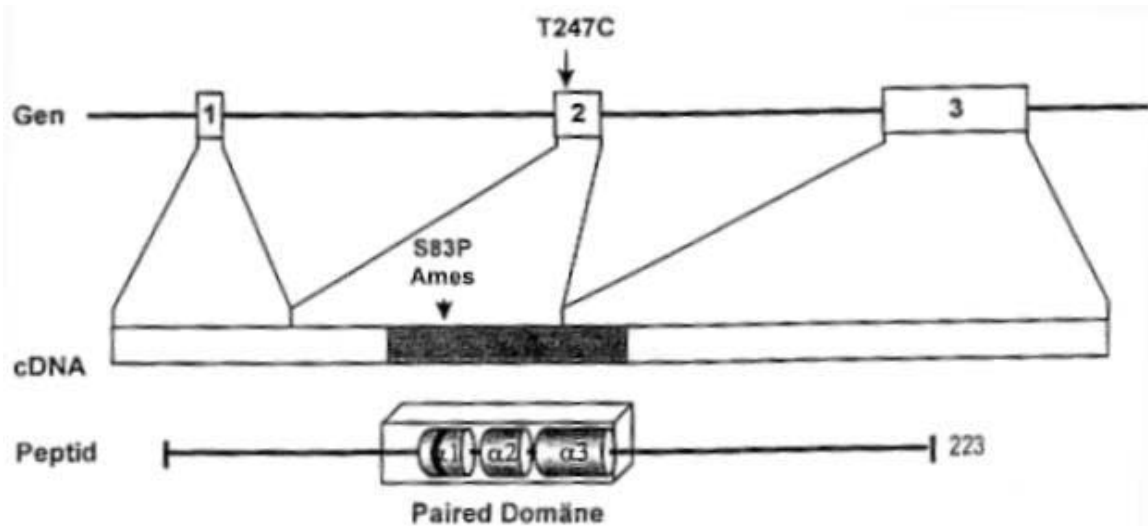


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Maus-Prop-1-Gens mit Lokalisation der bei der Ames-Zwergmaus beobachteten S83P-Mutation. (nach Pfäffle RW, 1998)

2. Zielsetzung und Patienten

2.1. Zielsetzung

Kern dieser Arbeit war die Genese des hormonellen Kleinwuchses bei Kindern mit multiplen hypophysären Ausfällen, die zusätzlich eine ektope Neurohypophyse aufwiesen.

Wir konzentrierten uns in dieser Studie auf den 1996 von Sornson und Mitarbeitern isolierten Faktor Prop-1 und postulierten dabei folgenden Zusammenhang: Kinder mit einer hypophysären Insuffizienz und nachgewiesener ektoper Neurohypophyse haben als Ursache dafür einen genetischen Defekt im Bereich des Prop-1-Gens.

Wir beabsichtigten eine systematische Analyse der uns freundlicherweise von Roland Pfäffle zur Verfügung gestellten Prop-1-Sequenz, wobei unser besonderes Interesse dem Homöodomän-Bereich galt.

2.2. Patienten

Unser Patientenkollektiv setzte sich aus Kindern der endokrinologischen Ambulanz der Kinderklinik Tübingen zusammen. Dies waren Patienten, bei denen intrauterin, im Säuglings- und Kleinkind- oder teilweise auch erst im Erwachsenenalter die Diagnose eines hormonellen Kleinwuchses gestellt wurde. Mit Hilfe der bekannten und in untenstehender Tabelle erwähnten Hypophysenstimulationstests wurde geprüft, ob es sich um einen isolierten WH-Mangel oder einen kombinierten Hypophysenvorderlappenausfall für das Wachstumshormon und weitere Hormone des Hypophysenvorderlappens handelte. Der maßgebliche Faktor aber, und damit allen an der Studie teilhabenden Kindern gemeinsam, war das Krankheitsbild der ektope Neurohypophyse. Dies war unser spezifisches Einschlusskriterium. Da wir von einem genetischen Defekt als Ursache des spezifischen Krankheitsbildes unserer Patienten ausgingen, untersuchten wir auch weitere Familienmitglieder auf einen hormonellen Kleinwuchs und hielten die Ergebnisse in untenstehender Tabelle fest. Zusätzlich wurden eventuelle Geburts- oder auch

spätere Traumata der Patienten festgehalten, um bei einem fehlenden genetischen Defekt eine traumatische, als alternative Genese der hypophysären Ausfälle und ektopter Neurohypophyse unserer Patienten berücksichtigen zu können.

Insgesamt fanden sich 23 Patienten, die an der Studie teilnahmen. Die Blutentnahmen zur DNA-Analyse wurden nach Aufklärung und Einverständniserklärungen der Patienten und deren Eltern durchgeführt. Betreut wurden die Patienten im Durchschnitt alle 6 Monate in der endokrinologischen Ambulanz zur Therapiekontrolle. Die nachfolgende Tabelle fasst die erhobenen Daten zusammen:

Zielsetzung und Patienten

Name	Geburtstag	Alter bei Diagn.stellung (Jahren)	Höhe bei Diagnosestellung (cm)	Gewicht bei Diagnosestellung (kg)	Trauma oder Geburtskomplikationen	IGF-1, IGFBP-3 (ng/ml)	GH u GH nach Arginingabe (ng/ml)	TSH/ft4 ng/ml/µg/dl	Morgen Cortisol (µg/dl)	Therapie
Pat A	01.04.89	4 ½	92.1	11.9	Kaiserschnitt s.* ₁	11 1276	5.8/5.9	/	7.3	G
Pat B	09.10.80	5 2/12	93.0	12.9	Keine	57.4 2349	6.0/6.1	6.0/1.3	12.5	G/T
Pat C	26.12.80	9 ½	115.8	20.1	Ja s.* ₂	50 1188	1.0//?	1.75/?	3.6	G/T/Öst.
Pat D	17.08.77	13 6/12	132	25.8	Kaiserschnitt	12 755	1.2/.2.4	/	13.0	G/T/C
Pat E	07.02.94	1 8/12	73.5	7.1	Keine	11 1771	5.8/5.9	0.9/?	8.7	G
Pat F	03.09.84	13 2/12	138.1	33.4	Kaiserschnitt	121 2162	1.9/4.3	/	?	G
Pat G	13.10.82	13 ½	79	10.9	Keine	157 3399	0.81/ 0.94	7.9/?	?	G
Pat H	16.01.85	4 7/12	87.8	12.2	Kaiserschnitt	5 1141	3.6/2.7	/	7.5	G
Pat I	30.11.86	2 8/12	76.8	10	Ja	7 654	3.5/6.9	/	/	G
Pat J	28.12.82	8 4/12	115.1	18	Keine	43 1831	15.1/11.2	7.4/?	/	G
Pat K	10.10.79	7 5/12	111	18	Ja * ₃	22 3475	5.3/9.2	NB	23.9	G/T
Pat L	21.12.82	6-7	116	23	Kaiserschnitt	20.8 1214	2.4/27.8	/	27.7	G/T/C/Öst.
Pat M	14.02.87	2 7/12	75	7.4	Ja s.* ₄	10 368	1.8/1.4	9.2/?	/	G
Pat N	09.01.79	9 4/12	108.8	21.2	Ja * ₅	? 615	0.6/?	NB	NB	G/T/C/Öst.
Pat O	17.04.84	4 8/12	96.6	13.7	Kaiserschnitt	12 929	?//1.0	7.5/?	2.7	G/T/C
Pat P	09.09.78	14 2/12	136.1	23.3	Ja s.* ₆	38 1569	1.0/1.1	TSH niedrig	4.8	G/T/Öst./C
Pat Q	21.09.85	11/12	66	7.75	Keine	10 2077	2.3//?	2.4/?	7.0	G/T/C
Pat R	06.05.85	8 3/12	105.7	15.2	Keine	31 1203	4.7/2.7	1.08/?	15.9	G

Name	Geburtstag	Alter bei Diagn.stellung (Jahren)	Höhe bei Diagnosestellung (cm)	Gewicht bei Diagnosestellung (kg)	Trauma oder Geburtskomplikationen	IGF-1, IGFBP-3 (ng/ml)	GH u GH nach Arginingabe (ng/ml)	TSH/ fT4 ng/ml/ µg/dl	Morgen Cortisol (µg/dl)	Therapie
Pat S	06.06.96	1 Tag	50	3,69	Kaiserschnitt ⁷	30 1253	1.5/ ?	9.1	/	G/T/C
Pat U	08.08.77	9 3/12	113.2	19.8	Keine	45 2090	0.9/1.4	18.1	69.5	G/T/Te/C
Pat V	10.02.88	5 1/12	93.2	16.3	Keine	21 703	1.3/2.2	9.3	/	G
Pat W	17.06.81	6 3/12	101.3	17.8	Keine	50 3515	3.5/3.1	17.1	23.1	G/T/Te

Tabelle 3: Patientenübersicht

- *₁: Schwangerschaft durch EPH-Gestose kompliziert
- *₂: Nabelschnurvorfall bei Fusslage; Ikterus neonatorum mit Austauschtransfusion
- *₃: Clavikulafraktur bei Geburt
- *₄: Sturzgeburt im Auto auf dem Weg ins Krankenhaus
- *₅: Interruptioversuche während der Schwangerschaft
- *₆: Mit 10 Jahren und 2 Monaten Sturz gegen Radmutter eines Traktors
- *₇: Geburtsstillstand in der Eröffnungsphase bei relativem Missverhältnis.

Referenzbereiche für IGFBP-3, IGF-I und GH siehe Anhang 2

Erklärung der verwendeten Abkürzungen:

NB: Normalbefund

G: Wachstumshormon

T: Thyroxin

C: Hydrocortison

Te : Testosteron

Öst : Östradiol

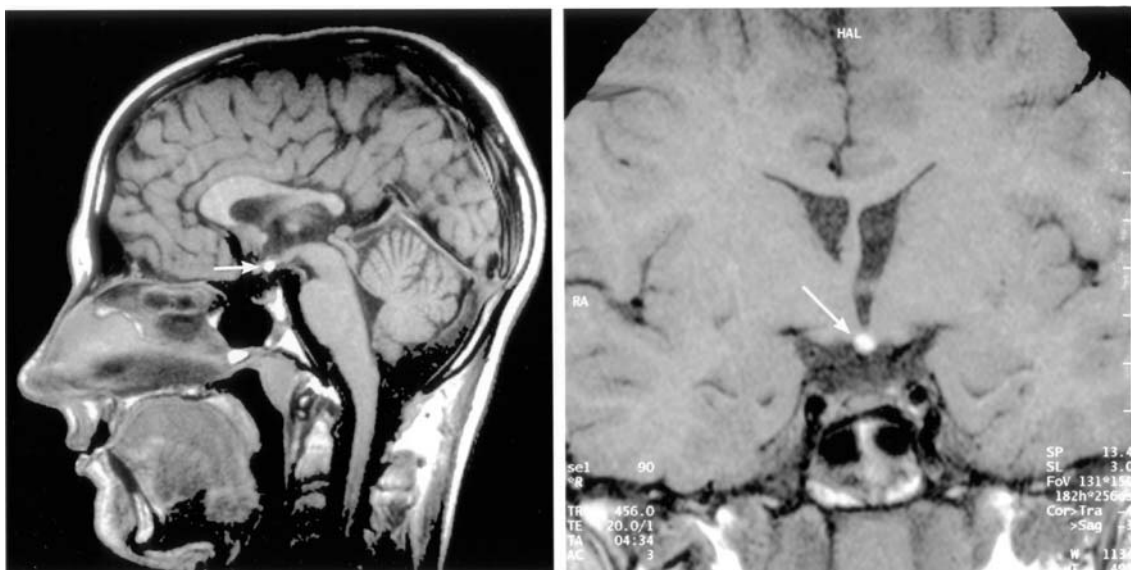


Abbildung 7: Kernspintomographisches Bild des Schädels eines Patienten mit ektopter Neurohypophyse

3. Material und Methoden

3.1. *Material*

3.1.1. Reagenzien

- 7-deaza dGTP Amersham, Cleveland, USA
- Acrylamid Gibco BRL, Eggensten
- Ammoniumpersulfat Serwa, Heidelberg, D
- Ampuwa Fresenius AG, Bad Homburg, D
- Aqua ad injectabilia Delta – Pharma GmbH
- Borsäure Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
- Bromphenolblau Merck Darmstadt, D
- Chloroform Fluka, Neu-Ulm, D
- Desoxynukleotide (d’NTP) Quiagen, Venlo, Niederlande
- Dimethylsulfoxid (DMSO) Sigma, München
- Dynabeads M₂80-Streptavidin Dynol AS, Oslo, Norwegen
- Essigsäure Merck Darmstadt, D
- Ethanol 70% Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
- Ethanol absolut Merck Darmstadt, D
- Ethidiumbromid Merck, Darmstadt, D
- Ethylendiamintetracetat (EDTA) Sigma, München
- Ficoll 400 Pharmacia, Upsola, Schweden
- Formaldehyd Merck, Darmstadt, D
- Formamid Merck, Heidelberg, D
- Glutaraldehyd Merck, Darmstadt, D
- Glycerol Merck, Darmstadt, D
- Isopropanol Merck, Darmstadt, D
- Methanol Merck, Darmstadt, D
- MgCl Promega, Madison, USA
- Natriumacetat Merck, Darmstadt, D
- Natriumchlorid Merck, Darmstadt, D

- Salzsäure Merck, Darmstadt, D
- Silbernitrat Sigma, Diesenhofen, D
- Tetramethylethyldiamin (TEMED) Pharmacia Biotech
- Trichloressigsäure Carl, Roth GmbH, Karlsruhe, D
- Urea Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
- Xylencyanol Serwa, Heidelberg, D
- α [³⁵S]-d ATP Amersham, Cleveland, USA

3.1.2. Enzyme

- Taq – DNA – Polymerase.

3.1.3. Molekulargewichtsmarker

DNA Molekulargewichtsmarker Boehringer Mannheim

Marker IV 14 Fragmente: 74, 421, 697, 925, 1150, 1489, 1882, 2322, 2690, 3140, 4254, 5526, 7743, 19329

Marker V 22 Fragmente: 8, 11, 18, 21, 51, 57, 64, 80, 89, 104, 123, 124, 184, 192, 213, 234, 267, 434, 458, 504, 287

Marker VI 15 Fragmente: 154, 154, 220, 234, 234, 298, 298, 394, 453, 517, 653, 1033, 1230, 1766, 2176

3.1.4. Kits für die Molekularbiologie

- Amersham Thermosequenzase labelled primer cycle sequencing kit / Amersham, Cleveland, USA
- Genomix scale-up kit Tolent srl, Triest, I
- Sequenzase Version 2.0 USB, Cleveland, USA

3.1.5. Verwendete Primer

Zur Definition der Primersequenzen diente die uns von Roland Pfäffle freundlicherweise zur Verfügung gestellte hProp-1-gDNA-Sequenz.

Unterstehende Primer wurden für die initiale PCR der Prop-1-gDNA-Sequenz verwendet, nachdem diese in vier Abschnitte unterteilt wurde (Die Primer PRO 5.2b und PRO 3.2 umschliessen die Homöodomäne).

A)	PRO 5.1	Sequenz	5' – AGGGTGGCATAACACAGAGGG – 3'
B)	PRO 3.1	Sequenz	5' – TCAGGGACCCACGCACACCG – 3'
C)	PRO 5.2b	Sequenz	5' – GAGCGTCTTCCTCAGAAGC – 3'
D)	PRO 3.2	Sequenz	5' – TTCCTCAGAAGCCGCCCTT – 3'
E)	PRO 5.3	Sequenz	5' – GTGGGCTCTGATGTGGTTCC – 3'
F)	PRO 3.3	Sequenz	5' – AAGGGAGGGCATGGCTGTAG – 3'
G)	PRO 5.4	Sequenz	5' – CCAGTGACCTGCTTCCCTCA – 3'
H)	PRO 3.4	Sequenz	5' – TCTTTTCACGAGGGCCGCAG – 3'

Die folgenden Primer wurden verwendet für die PCR zur Sequenzierreaktion.

I)	PRO 5.011	Sequenz	5' – AGA TTG AGC TGA CAC TCA AB – 3'
J)	PRO 3.011	Sequenz	5' – GTT CCC ACA GTT TTA ACA TG – 3'
K)	PRO 5.5	Sequenz	5' – CTG GCC ATG CTG GAG AAG CC – 3'
L)	PRO 3.5	Sequenz	5' – CTG AGC TGA CCC TCA CCA TG – 3'
M)	PRO 5.02	Sequenz	5' – ACG CAC TGA GCG CAA TCC CG – 3'
N)	PRO 3.02	Sequenz	5' – AGG CCT GTG TCT GGT GAC CA – 3'

Und schliesslich die Sequenzierprimer

- O) PRO 5.1 - 800 Sequenz 5' – AGG GTG GCA TAC ACA GAG GG – 3'
- P) PRO 3.1–800 Sequenz 5' – TCA GGG ACC CAC GCA CAC CG – 3'
- Q) PRO 5.03-800 Sequenz 5' – CCT GCA CCT CTT GTC ATT GG – 3'
- R) PRO 3.4 - 800 Sequenz 5' – TCT TTT CAC GAG GGC CGC AG – 3'
- S) PRO 5.2 blt Sequenz 5' – CCT CCC TTC TCT CCG TTC TC – 3'
- T) PRO 3.2 lt Sequenz 5' – AGC ATC ACC TGG ATT CGG GC – 3'

3.1.6. Geräte

Base Image IR	Data Collection	Li-COR, Lincoln, USA
Beckman Ultrazentrifuge	Modell L5 65B	Beckman Instruments GmbH, München
Fluoreszenztisch		Renner GmbH, Darmstadt
Gelkammern		Bio-Rad, München, D
Geltrockner	Modell 543	BioRad, München, D
Magnetrührer		Ika – Werk – Staufen
Mikroskop		Olympus
pH Meter		WTW, Weilheim, D
Phast System™		Pharmacia, Biotech
Pipettierhilfe	Fireboy	Tecuomeora, Zürich, CH
Quarzpräzisionsküvetten		Hellma
Röntgenfilmentwickler	Cyrux 24z	Agfa Gevaert
Röntgenfilmkassette	Hypercassette 18x24 cm	Amersham
Sequenzierapparat	(nicht radioaktiv)	Li-COR, Lincoln, USA
Sequenzierapparat	Modell S2	Gibco BRL, Eggenstein
Spannungsgeber	Powerpac 3000	Bio–Rad, München, D
Spektralphotometer		Pharmacia, Upsala, Schweden
Sterilbank	Hera Safe	Heraeus Instruments
Thermocycler	Trio Thermoblock	Biometra
Videosystem	Video Copy Monitor	Mitsubishi Hitachi
Vortexgerät		Bohemia, New York, USA
Waage	3P 1200	Sartorius
Wasserbad	Schüttelwasserbad 1083	GFL
Zentrifuge	Centrifuge 5402 Varifuge 3.2RS	Eppendorf Heraeus Instruments

3.1.7. Verbrauchsmaterialien

24 - Loch Mikrotiterplatte		Castor, Cambridge, GB
Combitips plus	0.5ml; 50ml	Eppendorf, Hamburg, D
Flexible Klarsichtfolie		The Dow Chemical Comp.
Kimwipes		Kimberly Clark, EEC
Multiflex Tipps		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Phast Gel	Homogeneous 12,5%, 20%	Pharmacia Biotech
Pipettenspitzen		Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße	Safelock 0.5ml; 1.5ml	Eppendorf, Hamburg, D
Röntgenfilme		Eastman, Kodak, Rochester, USA
Sicherheitspipettenspitzen		Biozyme, Hees Oldendorf
Sterile Pipetten	(1-50ml)	Castor, Cambridge, GB
Universal -ph Indikatorpapier		Merck, Darmstadt, D

3.2. Methoden

3.2.1. DNA – Extraktion

Bevor es möglich war, bestimmte DNA – Sequenzen mittels PCR zu vervielfältigen musste die genomische DNA aus dem Patientenvollblut extrahiert werden.

Das wichtigste bei diesem Verfahren war das sterile Arbeiten.

Das Patientenblut musste mindestens 2h bei -20°C lagern.

Vorteile des verwendeten Kits:

- es ist ein Arbeiten ohne Phenol möglich
- Viruspartikel werden bereits im 1. Schritt des Kits denaturiert mittels anwesender kationischer Detergenz
- bereits 30-50 µg/ml DNA können extrahiert werden
- die Extraktionszeit ist kurz durch fehlende Inkubationszeiten
- die Ergebnisse sind reproduzierbar durch die einfache Handhabe

Verwendet wurde der Genomix Scale – up kit[®] der Firma Talent.

Die durchschnittliche Größe der gewonnenen DNA beträgt 200 – 500 kb.

Die OD ratio 260/280 beträgt 1.75 – 2.0.

Die gewonnene DNA ist weder mit RNA noch mit Endonucleasen kontaminiert.

Die grundlegende Methode ist die initiale Lyse des Vollblutes mittels eines kationischen Detergenz, gefolgt von der Extraktion mittels Chloroform.

Die Präzipitation der DNA erfolgt dann durch Zentrifugation mittels eines weiteren kationischen Detergenz, welches einen Komplex mit der zu extrahierenden DNA bildet. Durch Resuspension des Pellet und erneute Präzipitation der DNA mit Ethanol wird dieses Detergenz durch ionischen Austausch eliminiert.

Zuletzt wird das Pellet in 70%igen Ethanol / Wasser gewaschen.

Reagenzien des Kits:

Blood washing Solution and modifier

Solution 1: Lysing Solution (Denaturierungslösung)

Solution 1a: Acidification

Solution 2: Precipitating Solution

Solution 3: Ionic Exchange Solution

Centrifugable gel barrier tubes

Zusammengefasst:

- => Die Blutzelllyse erfolgt mittels washing Solution und dem kationischen Detergenz der Solution 1
- => Nach dem Proteinverdau und der Proteinentfernung folgt die Präzipitation der DNA mittels einer anderen kationischen Lösung (Sol.2)
- => Solution 2 (bzw. kationische Lösung) wird durch Resuspension in Solution 3 entfernt
- => Ein erneutes Ausfällen der DNA mit Ethanol ermöglicht die Aufnahme der DNA in Puffer oder H₂O

Methode:

Zur Lyse der Erythrozyten wurde das EDTA – Blut der Patienten für mindestens 40-60 min bei 37°C aufgetaut. Danach die Denaturierungslösung exakt im Verhältnis 2:1 hinzugefügt und durch vorsichtiges Schwenken eine ausreichende Durchmischung erreicht.

Durch ein 15 minütiges Zentrifugieren mit 3300 U/min bei 4°C wurde das Pellet vom Überstand getrennt und dieser abzentrifugiert.

Danach wurde das Pellet erneut in 1ml washing Solution resuspendiert und 3x15 sec in der Vortex Maschine geschüttelt.

Nach Hinzufügen von 1ml kaltem Ampuwa H₂O und erneutem Vortexen wurden schließlich 4 ml der Lysing Solution hinzupipettiert und die Proben für exakt 10 Minuten bei 68°C im Wasserbad erhitzt. Danach wurde das erhitzte Lysat in ein Reaktionsgefäß (Gel barrier tubes) gegeben und 6.5 ml Chloroform hinzugefügt. Anschließend wurde sofort kräftig geschüttelt, um eine ausreichende Durchmischung der 2 Phasen zu erreichen und bei 4°C mit 3500 U/min 15 min lang zentrifugiert.

Die dadurch entstehende obere flüssige Phase, welche die DNA enthält, wurde in ein weiteres 50 ml Reaktionsgefäss gegeben.

Die Präzipitation der DNA wurde durch Hinzufügen von 8 ml der Precipitation Solution erreicht. Durch vorsichtiges Schwenken konnte die Bildung eines Präzipitates, der DNA entsprechend, beobachtet werden.

Danach wurde wieder 5 min lang bei 4°C mit 3700 U/min zentrifugiert. Sollte die Auflösung der DNA ausbleiben, konnte dies im Rahmen einer Alkoholfällung durch Hinzugabe von 99% igem Ethanol und 3 mol Natriumacetat erreicht werden.

Durch vorsichtiges Dekantieren des Überstandes konnte dieser nach der Zentrifugation vom Pellet getrennt, und dieses im Tube auf Filterpapier getrocknet werden.

Nun wurde das Pellet erneut in 4 ml der Ionic Exchange Solution durch vorsichtiges, mindestens 10 – 30 Minuten andauerndes Schütteln vollständig resuspendiert.

Durch Hinzufügen von 8 ml 99%igem Ethanol (Roth) konnte durch Schwenken die erneute Resuspension erreicht werden. Durch erneutes, zweiminütiges Zentrifugieren bei 4°C und 2200 U/min konnte die DNA sichtbar gemacht werden.

Erneut wurde der Überstand dekantiert, indem man darauf achtete, das Ethanol vollständig zu entfernen, und das Pellet nicht vollständig austrocknen zu lassen. Danach wurde das Pellet in 300ul TE-Puffer übertragen und über Nacht auf einem Schüttler resuspendiert, um danach die spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung durchzuführen.

3.2.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Ebenso wie die benutzten Primer eine bestimmte Konzentration haben mussten, wurde nach Extraktion der DNA eine Konzentrationsbestimmung mit einem Spektralphotometer durchgeführt.

Grundlage dieser Konzentrationsbestimmung der extrahierten DNA bildeten die beiden unterschiedlichen Absorptionsmaxima von DNA (Nukleinsäuren) bei 260 nm und der von Proteinen bei 280 nm.

Das Verhältnis der beiden Absorptionsmaxima war Maß für den Reinheitsgrad der Nukleinsäuren bzw. der Verunreinigungen mit Proteinen. Anzustreben waren Werte zwischen 1.7 und 2.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit der optischen Dichte (OD). Dazu wurde in 1ml Präzisions-Quarzküvetten 10µl der zu untersuchenden Lösung

und 990 µl ddH₂O gegeben und die optische Dichte bei 260nm und 280nm gegen Wasser als Leerwert gemessen. Somit wurde für die DNA-Bestimmung ein Verdünnungsmittelfaktor von 99 (990:10) verwendet. Des Weiteren wurde bei der Konzentrationsbestimmung der DNA folgende Absorptionseinheit (A^{260}) verwendet:

$$A^{260} = OD^{260} = 1 \text{ für eine } 50 \text{ µg/ml Lösung (Double-stranded DNA, (dsDNA))}$$

Für einzelsträngige DNA und RNA gilt:

$$A^{260} = OD^{260} = 1 \text{ für eine } 33 \text{ µg/ml Lösung (single-stranded DNA (ssDNA))}$$

$$A^{260} = OD^{260} = 1 \text{ für eine } 40 \text{ µg/ml Lösung RNA}$$

Daraus ergibt sich folgende Formel zur Berechnung der Nuklerinsäurekonzentration:

$$\boxed{\text{Konzentration [µg/µl]} = OD^{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times A^{260}}$$

Die Konzentration der Primer betrug im Durchschnitt 1µg/µl, die der DNA lag bei etwa 0.2µg/µl.

3.2.3. Polymerase - Ketten - Reaktion (Polymerase Chain Reaction = PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist inzwischen eine Routine-Methode in der Molekularbiologie zur spezifischen Vervielfältigung von DNA. Sie hat eine wichtige Bedeutung in der Diagnostik von Erbkrankheiten und bösartigen Erkrankungen, sowie in der Erforschung vieler viraler Infektionen.

Die PCR wird zur *in-vitro* – Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen herangezogen. Das Prinzip der PCR wurde erstmalig von Khorana et al beschrieben, benannt wurde es allerdings durch Mullis et al (Mullis K, Faloona F, 1987, Kleppe K, Ohstuka E, Kleppe R, Molineux L, Khorana HG, 1971, Panet A, Khorana HG, 1974, McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR, 1992).

Das Prinzip ist folgendes: Nach Denaturierung der doppelsträngigen DNA zu Einzelsträngen, lagern sich die beiden verwendeten Primer jeweils

komplementär an die Flanken der zu amplifizierenden DNA. Die Bildung neuer DNA-Stränge erfolgt ausgehend von diesen Primern jeweils in Richtung auf den gegenüber liegenden.

Für die Reaktion werden die genomische DNA und die Desoxynukleotide benötigt, welche die Bausteine der neuen DNA-Stränge liefern und als Energielieferant fungieren. Des Weiteren die hitzestabile DNA - Polymerase und die verwendeten Primer.

Durch Erhitzen der genomischen DNA werden die Doppelstränge zu Einzelsträngen getrennt, und durch die folgende Temperatursenkung im Rahmen der PCR wird es den Primern möglich gemacht anzubinden.

Die Vervielfältigung der DNA geschieht exponentiell, da jeder neu gebildete DNA – Strang zur erneuten Vervielfältigung zur Verfügung steht. Die Reaktion kommt zum Erlahmen, wenn entweder die Reagenzien zu Ende gehen oder die Funktion des Enzymes nachlässt.

Im Regelfall werden 25 bis 35 Zyklen gebraucht um 100 ng bis 1 µg DNA zu synthetisieren. Beim letzten Schritt der Inkubation bei 72°C findet schliesslich die Extension (= Polymerisation des Gegenstranges statt).

Der Sinn der Verwendung eines hitzestabilen Enzymes (Taq = *Thermus aquaticus*) zur Vervielfältigung der DNA liegt darin, dass es nicht nach jedem Denaturierungs – Schritt (Erhitzen) erneuert werden muss, und dass dieses Enzym seine optimale Funktion bei hohen Temperaturen entfaltet und somit für eine schnelle und effiziente Reaktion sorgt.

Als Reaktionszusätze werden benötigt:

(A) DNA Polymerase

Die am häufigsten verwendete Polymerase ist die Taq Polymerase, gewonnen aus den Bakterien *Thermus aquaticus*.

Die Vorteile dieses Enzyms sind in seiner Hitzestabilität und seines Wirkoptimums bei hohen Temperaturen zu sehen.

(B) Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs)

dNTPs sind stabil bei -20°C und auf diese Weise mehrere Monate haltbar. Sie werden aufgelöst und verwendet in einer Konzentration von 100 mM.

(C) Reaktionspuffer

Ein von Saiki et al 1988 beschriebenes Puffersystem beinhaltet Tris in einer Konzentration von 10mM (pH 8.4), 50mM KCL, 15 mM MgCl_2 , 0.01% Gelatine, 0.01% NP40 und 0.01% Tween 20.

Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Menge an dNTPs die man verwendet, und der Mg – Konzentration im Puffersystem. Verwendet man große Mengen an dNTPs, sollte auch die Mg-Konzentration im verwendeten Puffer erhöht werden.

(D) Primer

Die Effizienz der ausgewählten Primer konnte nach der Gelauftragung festgemacht werden: auftauchen sollte eine dominante Bande mit eventuell auftauchenden, schwächeren Banden.

Die Primer sollten aus etwa gleich vielen G+C / T+A-Nukleotiden bestehen und möglichst wenig einander komplementäre Stellen aufweisen.

Der G+C – Gehalt beträgt idealerweise 50%. Sequenzen, die sich wiederholen, sollten möglichst nicht auftauchen.

Die zu amplifizierende DNA sollte über die ausgesuchte Länge intakt sein, ebenso sollten im Reaktionsgemisch keine störenden Faktoren (wie z.B EDTA) vorhanden sein.

Die bezüglich der Reaktionsbedingungen ausgewählte Reaktionszeit, die Temperaturen und die Anzahl der Zyklen sind abhängig von der zu amplifizierenden DNA und den verwendeten Primern.

Die Inkubationszeit sollte so kurz wie möglich gehalten werden, um das Risiko einer unspezifischen Amplifizierung zu vermeiden.

Höhere Sensitivität und Spezifität können durch die Verwendung von sogenannten nested Primern erreicht werden.

Erkennung und Analyse des Reaktionsproduktes:

Das Reaktionsprodukt ist eines oder mehrere Fragmente spezifischer Länge der amplifizierten DNA.

Um das Reaktionsprodukt zu überprüfen, kann ein Teil davon gemeinsam mit einem Molekulargewichtsmarker auf ein Gel geladen und unter einem ultravioletten Licht sichtbar gemacht werden.

Das gewünschte Produkt sollte als scharfe Bande auf Höhe der erwarteten Basenpaargröße sichtbar sein. Kleinere DNA – Nebenprodukte und zeitweise auch die Primer selbst können als unscharfe Nebenbanden auftauchen.

Der Ablauf der PCR entspricht der Replikation der DNA in der Zelle, d.h. eine DNA – Polymerase synthetisiert entlang einer Nukleinsäurematrix den dazu komplementären Strang.

Primer sind chemisch synthetisierte Oligonukleotide.

Teilschritte der PCR:

Schritt 1: Die Ausgangs – DNA wird durch Hitze bei 90 – 95°C denaturiert und in die Einzelstränge überführt.

Schritt 2: Durch Abkühlung auf 50 – 70°C können die Primer sich an die komplementäre DNA anlagern (Annealing)

Schritt 3: Im letzten Schritt findet bei 72°C die Polymerisation (Extension) statt.

Bei der nested PCR wird in einer ersten PCR ein Reaktionsprodukt gebildet, das in einer zweiten PCR als Matrize fungiert. In dieser zweiten PCR werden Primer verwendet, die innerhalb des aus der ersten PCR gewonnenen PCR – Produktes liegen. Somit erhöht sich sowohl Spezifität wie auch Sensitivität.

Durchführung der PCR

Zunächst werden alle für die Reaktion benötigten Reagenzien auf Eis gelegt um aufzutauen.

Einzig die Taq – Polymerase wird nur kurz vor Gebrauch aus dem Eisfach geholt und sofort nach dem Pipettieren wieder bei -20°C gelagert.

Nach Vortexen und Zentrifugieren der Reagenzien wurde der sogenannte Mastermix angelegt, welcher sich aus festgelegten Anteilen dieser Reagenzien zusammensetzte. Eine negative Kontrolle wurde stets mitgeführt.

Aus diesem Mastermix wurden ~49µl (=50µl – cDNA Volumen) in die einzelnen Reaktionsgefäße abpipettiert, so dass nach Hinzufügen der cDNA das Reaktions-gemisch insgesamt 50µl betrug.

Nach erneutem Schütteln + Zentrifugieren wurde mit Öl überschichtet und schliesslich die cDNA hinzugegeben. Nach einem letzten Vortexen und Zentrifugieren wurden die Reaktionsgefäße in den Thermocycler gestellt und nach folgenden Protokollen inkubiert:

Denaturierung	95°C, 60sec.
Anlagerung	65°C, 60sec.
Extension	72°C, 60sec.
Anzahl der Zyklen	28

Tabelle 4: PCR mit Primer PRO 5.1/3.1

Denaturierung	95°C, 45sec.
Anlagerung	65°C, 45sec.
Extension	72°C, 45sec.
Anzahl der Zyklen	34

Tabelle 5: PCR mit Primer PRO 5.2b/3.2

Denaturierung	95°C, 60sec.
Anlagerung	67°C, 60sec.
Extension	72°C, 60sec.
Anzahl der Zyklen	30

Tabelle 6: PCR mit Primer PRO 5.3/3.3

Denaturierung	95°C, 45sec.
Anlagerung	68°C, 45sec.
Extension	72°C, 45sec.
Anzahl der Zyklen	34

Tabelle 7: PCR mit Primer PRO 5.4/3.4

3.2.4. Gelelektrophorese (allgemein)

Die Gelelektrophorese ist die Standardmethode, um DNA – Fragmente zu trennen, zu identifizieren und zu reinigen.

Durch die Färbung mit Ethidiumbromid können die DNA – Banden innerhalb des Gels detektiert werden. DNA – Mengen von 1 - 10µg können auf diese Weise unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht werden (Sharp et al. 1973).

Während Polyacrylamidgele effizienter bei kleineren DNA – Fragmenten sind (5 – 500bp), ist das Agarosegel zur Auftrennung größerer DNA – Fragmente (200bp – 50kb) geeigneter.

Der Nachteil der PAGE ist die aufwendigere Vorbereitung.

PAGE

In Anwesenheit freier Radikale, welche durch Ammoniumpersulfat gestellt und durch TEMED (N,N,N',N' – tetramethylethylendiamin) stabilisiert werden, wird das Acrylamid – Monomer ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH}_2$) zu langen Ketten polymerisiert.

Verwendet wurde hier ein 8%iges Polyacrylamidgel mit folgender Zusammensetzung:

Acrylamid 30%	13,3 ml
5 x TBE	10 ml
Ampuwa H ₂ O	31,5 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	350 µl
TEMED	60µl

Tabelle 8: 8% PAGE

Das Gel wurde zwischen 2 Gelplatten gegossen, welche durch zwei Spacer getrennt wurden. In dieser Anordnung ist Acrylamid der Luft nicht ausgesetzt, und die Polymerisation kann nicht durch Sauerstoff gestört werden. Im Rahmen einer Polyacrylamidgelelektrophorese können DNA – Fragmente getrennt werden, deren Länge bis zu 0.2% differenzieren. Zusätzlich können grössere Mengen an DNA pro Gel laufen und getrennt werden. Und letztendlich ist die im PAGE getrennte DNA extrem rein.

Verwendung fanden in dieser Arbeit nicht – denaturierende Polyacrylamidgele. Ein nicht - denaturierendes Gel ist für die Trennung doppelsträngiger DNA geeignet.

Als Laufpuffer diente 1xTBC und der Gellauf erfolgte bei nur 10V/cm um eine Denaturierung kleinerer Fragmente zu vermeiden.

Die Dicke der Spacer bestimmt die Dicke des Gels. Bevorzugt wurden eher dünnere Gele.

Zur Vorbereitung wurden die beiden Glasplatten gewaschen und mit Alkohol gereinigt. Danach wurden sie mit den Spacern in der Halterung fixiert, das Gel durch Mischen o.g. Komponenten fertiggestellt und zwischen die schräg

gehaltenen Glasplatten gegossen. Nach ca. 10 Minuten, die das Gel zur Polymerisation benötigt, konnten die Geltaschen gespült und mit der zu trennenden DNA und dem Probeauftragungspuffer beladen werden.

Parallel dazu wurden Molekulargewichtsmarker im selben Gellauf aufgetrennt, um die schärfste, sichtbare Bande einer Basensequenzlänge zuordnen zu können.

DNA – Längenstandards Boehringer Mannheim

DNA – Längenstandard VI

2176

1766

1230

1033

653

517

453

394

298

298

234

234

220

154

154

Der bromphenolhaltige Probeauftragungspuffer wurde verwendet um orientierend zu wissen, wie weit die Gelelektrophorese vorangeschritten war.

Nachdem das Gel ca. 2-3h bei 180V gelaufen und die DNA aufgetrennt wurde, wurde es vorsichtig aus den Glasplatten herausgetrennt und für ca. 10 Minuten in Ethidiumbromid – Färbelösung gefärbt und kurz mit H₂O gewaschen. Danach wurde es unter UV – Licht betrachtet und photographisch dokumentiert.

3.2.5. Einzelstrang – Konformationsanalyse

SSCP – Single – Strand conformational polymorphism analysis.

Erstmalig beschrieben wurde die Methode von Orita et al (Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T, 1989). Zunächst konnte diese Methode lediglich unter Verwendung radioaktiv markierter Nukleotide bei der PCR – Amplifikation durchgeführt werden.

Hierbei erfolgt zunächst eine Hitzedenaturierung doppelsträngiger DNA in Einzelstrang – DNA mit nachfolgender Auftrennung mittels Polyacrylamidgelelektrophorese unter nicht – denaturierenden Bedingungen und folgender Darstellung der Einzelstrang-Banden.

Nach Denaturierung doppelsträngiger DNA zu DNA – Einzelsträngen werden durch intramolekulare Hybridisierungen viel häufiger Sekundärstrukturen gebildet als in der ursprünglichen Form. Unterschiede in der gebildeten Sekundärstruktur entstehen durch abweichende Nukleotidsequenzen im Sinne einer Mutation. Mittels SSCP können diese Mutationen durch das differierende Wanderungsverhalten der Banden mit unterschiedlicher Sekundärstruktur erfasst werden.

Dafür ist eine Optimierung der Faktoren, die das Wanderungsverhalten beeinflussen erforderlich, z.B. die Ionenkonzentration des Puffers, die gewählte Gelart und die Anwesenheit schwach denaturierender Substanzen wie Glycerol. In dieser Arbeit fand eine nichtradioaktive SSCP – Methode ihre Anwendung.

Die Elektrophorese wurde auf kleinen, sog. Phast Gelen durchgeführt.

Versetzt wurden die PCR – Produkte im Verhältnis 1:1 mit einer Denaturierungslösung, welche Formamid (98%), Bromphenolblau (0,05%), Xylencyanol (0,05%) und ggf. Glycerol zur Verbesserung der Laufbedingungen enthielt. Nach einer Denaturierung des Gemisches für 3 min. bei 95°C und sofortiger Abkühlung in einem Eisbad wurden die Proben zur Elektrophorese aufgetragen

Mit aufgetragen wurden zahlreiche Proben gesunder Probanden um normale DNA, gesunde Genträger oder andere Variabilitäten zu erfassen.

Untenstehende Abbildung wird beispielhaft als möglicher Gellauf aufgeführt:

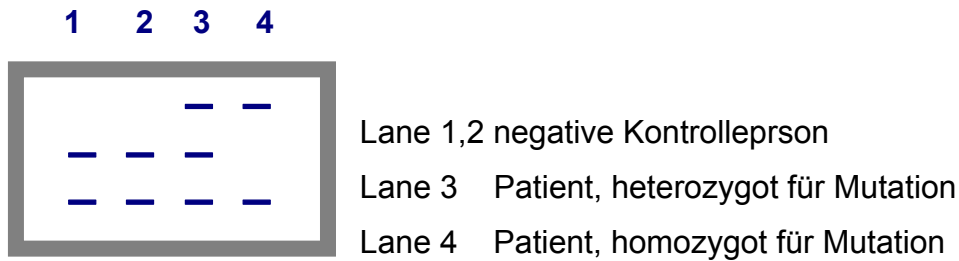


Abbildung 8: Beispiel für SSCP-Ergebnis

Nach Beendigung des Gellaufs und Darstellung der DNA-Fragmente konnten normale Einzelstränge von mutierten Einzelsträngen abgegrenzt werden, und anhand dieses Mutations-Screenings die Patienten, welche sich für die folgenden Sequenzierreaktion eigneten, ausgesucht werden.

3.2.6. DNA – Sequenzierung

Die DNA-Fragmente, welche in der SSCP-Analyse auffällige Banden gezeigt hatten, wurden sequenziert.

Zu Beginn der Arbeit wurde nach der klassischen Methode mit ³⁵S-markierten dATP und der Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert.

Hierbei diente die amplifizierte DNA in Form eines Einzelstranges als Template. Der komplementäre DNA – Strang wurde mit Hilfe einer DNA – Polymerase synthetisiert und zwar in vier verschiedenen Ansätzen. Diese enthielten zusätzlich zu den normalen Nukleotidbausteinen (dNTPs) basenspezifische Didesoxynukleotide (ddNTPs), welche sich dadurch auszeichnen, dass ihnen im Gegensatz zu den normalen dNTPs am 3'-Kohlenstoff eine Hydroxylgruppe fehlt. Dadurch werden sie zwar von der DNA – Polymerase an Stelle der normalen dNTPs akzeptiert, können aber nicht mehr verlängert werden, da hierfür eine Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-OH-Gruppe des einzubauenden Nukleotids und der 3'-OH-Gruppe des vorher eingebauten Nukleotids fehlt, und es somit zu einem Kettenabbruch kommt.

Jeder der vier Reaktionsansätze enthielt die vier dNTPs und einen der ddNTPs. Danach wurde das Sequenzierprodukt über eine Polyacrylamid-gelelektrophorese aufgetrennt. Da durch $\alpha[^{35}\text{S}] - \text{dATP}$ eine radioaktive

Markierung stattfand, konnte die Sequenz auf einem Röntgenfilm direkt abgelesen werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde auf eine fluoreszenzmarkierte Methode umgestellt. Hierbei kommen farbstoffmarkierte Didesoxynukleotide zum Einsatz. Nach Durchführung der PCR mit den entsprechenden Primern, die die interessante Sequenz eingrenzen, wurde hier zunächst ein DNA-Primer-Premix angelegt, der zum einen die PCR-Produkte und zum anderen die Sequenzierprimer enthielt. Dieser wurde dann, ähnlich einer PCR-Reaktion, auf die Reaktionsgefäße verteilt, in denen bereits die farbstoffmarkierten Didesoxynukleotide vorpipettiert wurden, und zwar ebenfalls in vier verschiedenen Ansätzen.

Die PCR – Reaktionen wurden entsprechend den gewählten Primern nach folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

	Temp.	time
Denaturierung	95°C	45s
Annealing	65°C	45s
Extension	72°C	45s
Zyklen	30x	

Tabelle 9: Primer PRO 5.02 / 3.02

	Temp.	time
Denaturierung	95°C	45s
Annealing	60°C	45s
Extension	72°C	45s
Zyklen	30x	

Tabelle 10: Primer 5.011 / 3.011

	Temp.	time
Denaturierung	95°C	45s
Annealing	68°C	45s
Extension	72°C	45s
Zyklen	27x	

Tabelle 11: Primer 5.5 / 3.5

	Temp.	time
Denaturierung	95°C	15s
Annealing	59°C	15s
Extension	70°C	15s
Zyklen	30x	

Tabelle 12: Cycle conditions der Sequenzierreaktion

Verwendet wurde folgendes Kit: Amersham Thermo Sequenase labelled primer cycle Sequencing kit with 7 – deaza – dGTP

Durch den Zusatz von 7-deaza-dGTP konnten Artefakte durch Sekundärstrukturformationen während des Gellaufs gering gehalten werden.

Für das Gel wurden folgende Komponenten in angegebener Reihenfolge gemischt:

Urea	21g
ddH ₂ O	32 ml
Long Ranger (Biozym)	4.3 ml
Long Run Buffer (10x)	5 ml
DMSO (Sigma)	500µl
10% APS (fresh)	350 µl
Degassing	Not longer than 10min
TEMED	50 µl

Polymerisieren konnte das Gel über Nacht, zumindest aber 2h.

Nach gründlicher Reinigung der Glasplatten mit Wasser und Alkohol konnten die Glasplatten schliesslich in den Sequenzierautomaten gespannt werden.

Nach Denaturierung der Proben bei 80°C für 1 Minute, ohne folgendes Eisbad, konnte unter Verwendung eines entsprechenden Laufpuffers (0.8 x TBE) der Probenlauf gestartet werden

Nach ca. 8h konnte die Sequenz mittels entsprechender, von Licor mitgelieferter Software am PC abgelesen werden.

Wir verwendeten für diese Arbeit das Sequenzier-Gerät von Li Cor-Systems der Firma MWG-Biotech.

Hierbei werden die im Rahmen der Sequenzier-Reaktion in die DNA-Fragmente integrierten, fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide zur Fluoreszenzemittierung angeregt, wenn die DNA-Fragmente durch die Trennung mittels Gelelektrophorese auf den Diodenlaser treffen. Diese Daten der Fluoreszenzemittierung werden dann an den Computer weitergeleitet. Durch die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente treffen diese in einer zeitliche Abfolge auf den Laser. Dadurch konnten wir auf dem PC die korrekte Basenabfolge ablesen.

Der Diodenlaser des Li Cor-Systems konnte das Laufverhalten der fluoreszenzmarkierten Sequenzierprodukte mit einer Genauigkeit von > 90% erfassen und sichtbar machen. Jedes der vier Reaktionsgemische mit den farbstoffmarkierten Didesoxynukleotiden wurde in je einer Geltasche aufgetragen, so dass das Sequenzierergebnis vier Lanes lieferte (1 Lane pro Didesoxynukleotid). Dadurch war auch bildlich ein schnelles und exaktes Ablesen der einzelnen Basen möglich.

4. Ergebnisse

Folgende Ergebnisse erbrachten die molekulargenetischen Untersuchungen:

4.1. DNA – Extraktion

Die DNA wurde aus dem Patienten – EDTA – Blut gewonnen. Nach entsprechender Isolation und Verdünnung wurde mit einer Konzentration von ca. 0.2 µg/µl weiter gearbeitet.

4.2. DNA – Amplifikation mittels PCR

Die Gensequenz von Prop-1 wurde in vier (sich überlappende) Abschnitte unterteilt, welche nach sorgfältiger Auswahl von Primerpaaren amplifiziert wurden. Optimale Ergebnisse konnten nach entsprechender Anpassung der Annealing-Temperaturen, entsprechender Zeitspannen und Anzahl der Zyklen bei allen Patientenproben erreicht werden (s. Kapitel 3.2.3). Nach Auftragen der gewonnenen PCR-Produkte auf ein Polyacrylamidgel konnten je nach Ausprägung und Schärfe der sichtbar gemachten Banden im Bereich der erwarteten Basenpaar-Länge die Protokolle optimiert werden.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Gelläufe auf 8%igem Gel der PCR der Prop-1-Gensequenz mit den gewählten Primern:

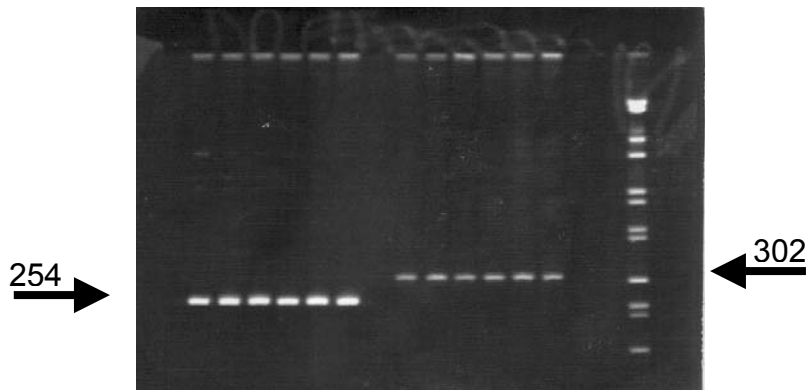


Abbildung 9: 8% Page, M VI, PRO 5.1 / 3.1, PRO 5.2b / 3.2

Abbildung 9 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese mit den verwendeten Primern PRO 5.1 / 3.1 und PRO 5.2b / 3.2. Zu sehen sind die amplifizierte DNA-Fragmente als ausgeprägte, scharfe Banden, zusätzlich der in Kapitel 3 erwähnte Molekulargewichtsmarker, mit dessen Hilfe man die Basenpaarlänge der PCR-Fragmente angeben kann. In dieser Abbildung sind zum einen die gewanderten PCR-Produkte mit einer bp-Länge von 254 (PRO 5.1/3.1) und zum anderen die Fragmente mit einer Länge von 302 bp (PRO 5.2b/3.2) zu erkennen.

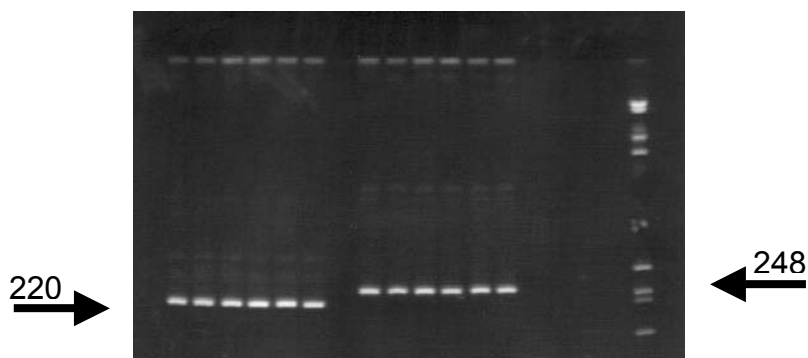


Abbildung 10: 8% PAGE, M VI, PRO 5.3 / 3.3 und PRO 5.4 / 3.4

Abbildung 10 zeigt das Ergebnis der Elektrophorese mit den verwendeten Primern PRO 5.3 / 3.3 und PRO 5.4 / 3.4. Markiert sind mit Hilfe des

Molekulargewichtsmarkern die gewanderten Fragmente mit einer Basepaar-Länge von 220 bp und 248 bp.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der PCR mit den Primern PRO 5.011 / 3.011, PRO 5.02 / 3.02 und PRO 5.5 / 3.5.

Die amplifizierten Produkte aus diesen Gelläufen wurden dann für die Sequenzierung verwendet.



Abbildung 11: 8% Page, MVI, PRO 5.011/3.011

Abbildung 11 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese der PCR mit dem Primerpaar PRO 5.011 / 3.011. Markiert sind die Banden mit einer Basenpaarlänge von 476 bp.

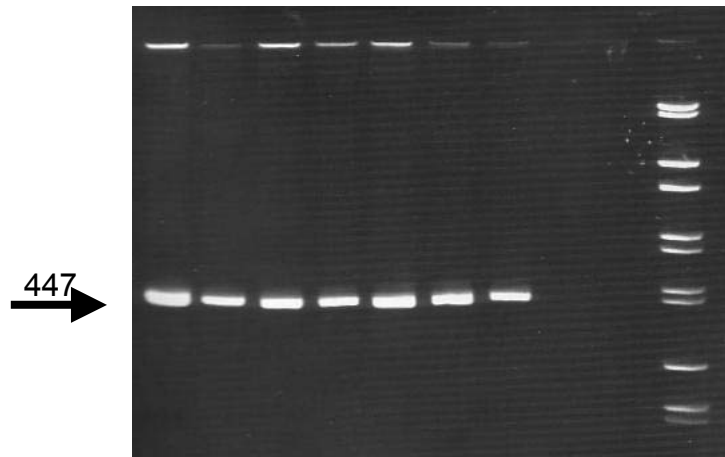


Abbildung 12: 8% Page, MVI, PRO 5.02/3.02

Abbildung 12 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese der PCR mit dem Primerpaar PRO 5.02 / 3.02. Markiert sind die Banden mit einer Basenpaarlänge von 447 bp.

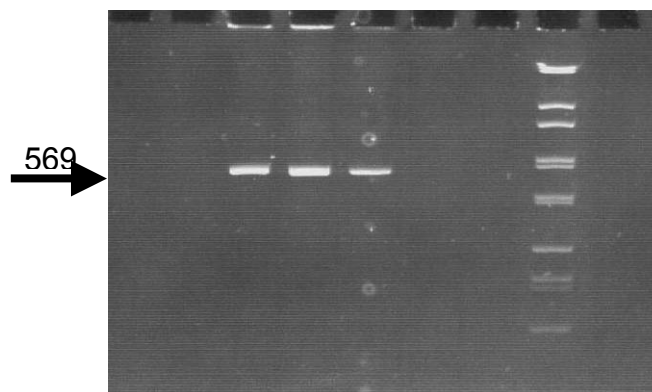


Abbildung 13: 8% Page, MVI, PRO 5.5/3.5

Abbildung 13 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese der PCR mit dem Primerpaar PRO 5.5 / 3.5. Markiert sind die Banden mit einer Basenpaarlänge von 569 bp.

4.3. PCR – SSCP – Analyse

Nachdem nun die ausgesuchten gDNA – Abschnitte erfolgreich amplifiziert waren, wurden die Proben für eine SSCP – Analyse verwendet, um eventuelle Mutationen beziehungsweise Polymorphismen erfassen und sichtbar machen zu können.

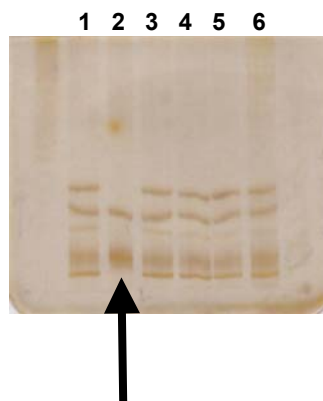


Abbildung 14: PCR Produkte mit dem Primerpaar PRO 5.1 / 3.1

Markiert ist der gesunde Proband mit dem atypischen Bandenmuster

Lane 1.3-6: negative Kontrollperson

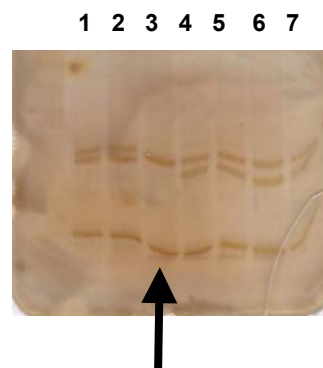


Abbildung 15: PCR – Produkte mit dem Primerpaar PRO 5.3 / 3.3

Markiert ist der gesunde Proband mit dem atypischen Bandenmuster

Lane 1.2 4-7: negative Kontrollperson

Abbildung 14 und 15 zeigen Gelläufe ausschliesslich phänotypisch gesunder Kontrollpersonen. Abgebildet sind die Banden der DNA – Bereiche, welche von den Primern PRO 5.1 / 3.1 und PRO 5.3 / 3.3 eingegrenzt werden. Einen auffälligen Gellauf lieferte lediglich ein gesunder Proband (siehe Markierung). Da es sich offensichtlich um eine gesunde Kontrollperson handelt, lag diesem atypischen Verlauf eher ein Polymorphismus denn eine echte Mutation zugrunde.

In beiden abgebildeten Gelläufen (Primerpaar PRO 5.1 / 3.1 und PRO 5.3 / 3.3) ist demnach neben den Probanden mit normaler DNA, ein gesunder Proband mit atypischem Gellauf zu sehen.

Im Bereich der Sequenzen, die jeweils von den Primerpaaren PRO 5.2b / 3.2 und PRO 5.4 / 3.4 flankiert werden, waren lediglich DNA-Abschnitte mit normaler Wanderungsgeschwindigkeit und somit mit normalem Gellauf zu detektieren.

Im weiteren Verlauf wurden dann auch die PCR – Amplifikate aller 23 Patienten mittels der SSCP – Analyse systematisch nach Polymorphismen oder Mutationen untersucht. Auch hier fanden sich im Bereich der Gensequenzen der Primerpaare PRO 5.2b / 3.2 lediglich normale Läufe.

Um eine positive Kontrolle zu erhalten wurden die PCR – Amplifikate der gesunden Kontrollpersonen mit dem auffälligen Bandenmuster mit aufgetragen. Bei Patienten die die Banden auf gleicher Höhe zeigten, wurde auf diese Weise die gleiche genetische Veränderung (z.B. ein Polymorphismus) vermutet.

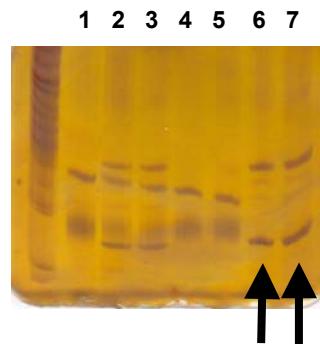


Abbildung 16: PCR – Produkte mit dem Primerpaar PRO 5.1 / 3.1

Lane 1: Kontrollperson mit auffälligem Bandenmuster

Lane 2 + 3:negativer Patient

Lane 4 + 5:Patienten mit auffälligem Bandenmuster (wie Kontrollperson)

Lane 6 + 7:Patienten mit auffälligem Bandenmuster (anders als Kontrollperson)

Abbildung 16 zeigt, wie oben beschrieben, die gesunde Kontrollperson mit dem auffälligen Bandenmuster und somit dem Verdacht auf eine genetische Veränderung. Zusätzlich zwei Patienten mit gleichem Bandenlauf und somit ebenfalls dem Verdacht auf die gleiche genetische Veränderung.

Neben den normalen Gelläufen von Patienten, sieht man die mit dem Pfeil markierten Banden, die ebenfalls ein auffälliges Bandenmuster zeigen, allerdings anders als die gesunde Kontrollperson, und somit eine andere, genetische Veränderung (z. B. eine Mutation) vermuten lassen.

Im Folgendem sind noch weitere Gelläufe abgebildet, in denen ebenfalls abgesehen von der Patienten – DNA mit dem gleichen Bandenmuster wie die Kontrollperson, auch Patienten – DNA mit einem anderen, jedoch auch auffälligem Bandenmuster zu sehen sind. Diese sind jeweils mit Pfeilen markiert.

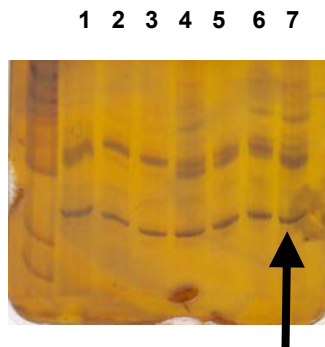


Abbildung 17: PCR – Produkte mit dem Primerpaar PRO 5.3 / 3.3

Lane 1, 4 – 6: normale Kontrollperson und Patienten

Lane 2 + 3: Patient mit auffälligem Bandenmuster (wie Kontrollperson)

Lane 7: Patient mit auffälligem Bandenmuster (anders als Kontrollperson)

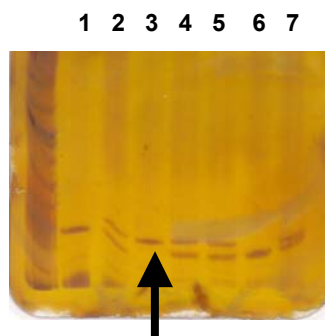


Abbildung 18: PCR Produkte mit dem Primerpaar PRO 5.1 / 3.1

Lane 1 + 6: Kontrollperson und Patient mit dem gleichen, auffälligen Bandenmuster

Lane 2,4,5 + 7:negative Patienten

Lane 3: Patient mit auffälligem Bandenmuster (anders als Kontrollperson)

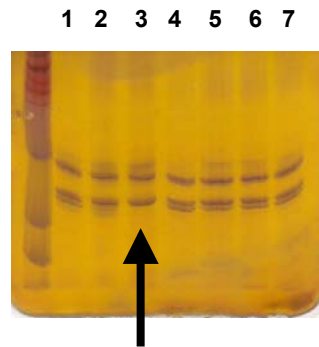


Abbildung 19: PCR Produkte mit dem Primerpaar PRO 5.4 / 3.4

Lane 1,2,4 – 7:negative Kontrollperson und Patienten

Lane 3: Patient mit auffälligem Bandenmuster (anders als Kontrollperson)

Insgesamt fanden sich im Rahmen der SSCP – Analyse sechszehn Patienten und eine Kontrollperson mit einem auffälligen Bandenmuster. Elf der sechszehn Patienten lieferten das gleiche Bandenmuster wie die Kontrollperson, fünf Patienten zeigten ein anderes Bandenmuster.

4.4. Ergebnisse der Sequenzier – Analyse

Nach den Ergebnissen der SSCP – Analyse wurden Genfragmente, bei denen Mutationen vermutet wurden, sequenziert. Außerdem die DNA von zwei gesunden Kontrollpersonen, eine mit unauffälligem SSCP-Gellauf und eine mit dem in der SSCP-Analyse auffälligem Bandenmuster, um eine Kontrolle zu erhalten.

Zusätzlich wurde die gesamte Prop-1-Homöodomäne aller 23 Patienten und die der beiden gesunden Kontrollpersonen sequenziert.

Exemplarisch ist untenstehend ein Ausschnitt der Sequenzierreaktion zweier Kontrollpersonen und zweier kleinwüchsiger Patienten aufgeführt.

Bahn 1 zeigt die Kontrollperson mit unauffälligem SSCP-Gellauf, Bahn 2 die gesunde Kontrollperson mit dem im SSCP-Gellauf auffälligem Bandenmuster, Bahn 3 und 4 letztlich die Sequenzierreaktion zweier Patienten, bei denen wir im SSCP-Gellauf ein auffälliges Bandenmuster, allerdings anders als bei der Kontrollperson gesehen hatten.

Wie immer wurde die Proben in der Reihenfolge A C G T aufgetragen und somit abgebildet.

Eine Mutation oder ein Polymorphismus konnte bei keinem der Kinder gefunden werden, bei insgesamt unauffälligen Gelläufen der Sequenzierreaktionen.

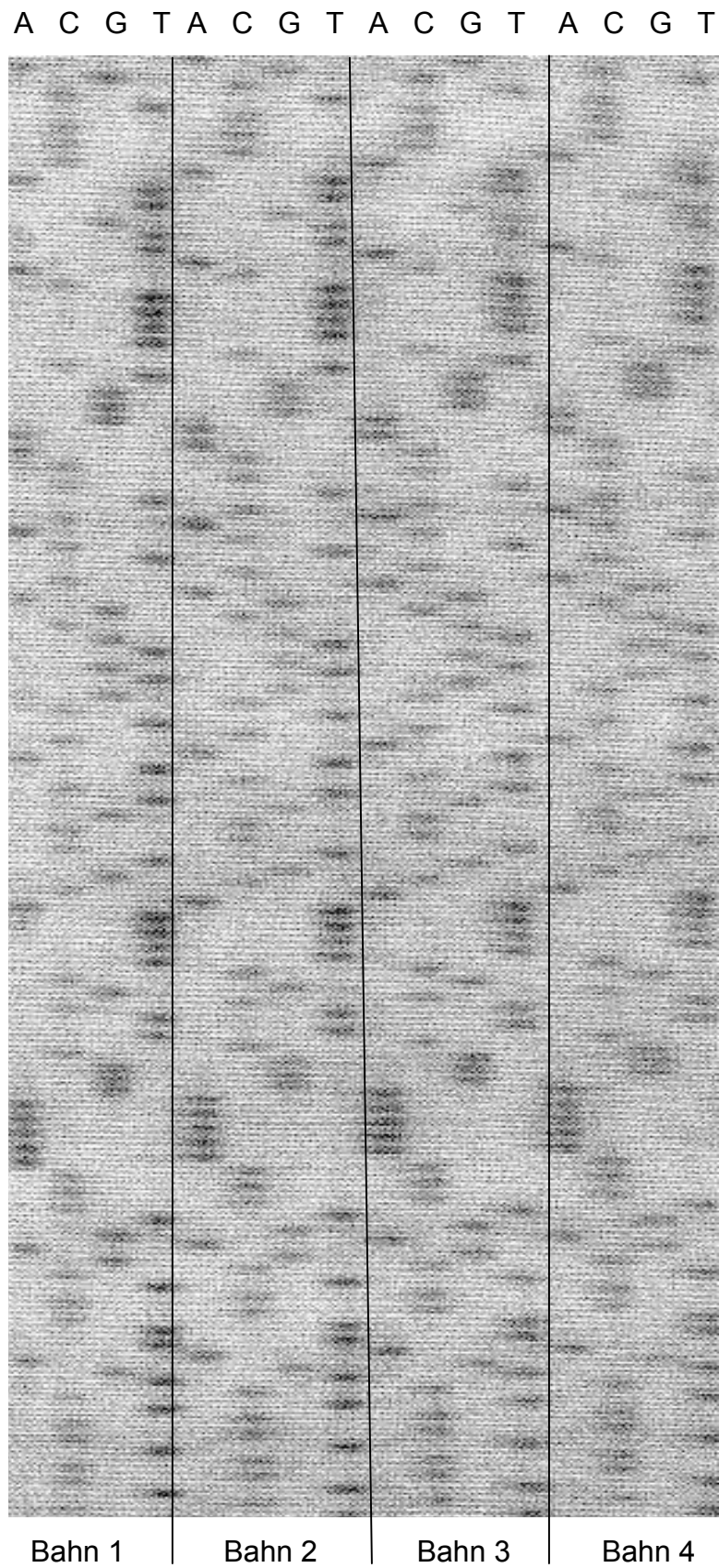


Abbildung 20: Sequenzierreaktion mit dem Primerpaar PRO 5.1-800/3.1-800

5. Diskussion

In dieser Studie führten wir eine Mutationsanalyse des Prop-1-Gens bei 23 Patienten mit einer spezifischen Hypophysenfehlbildung, nämlich einer Ektopie der Neurohypophyse und einer hypoplastischen Adenohypophyse durch. Alle Patienten hatten im Rahmen dieser hypophysären Fehlbildung einen Mangel an mindestens einem hypophysären Hormon.

Wir untersuchten die Sequenz des 1991 klonierten Transkriptionsfaktors Prop - 1 bei allen Patienten und bei einer phänotypisch gesunden Kontrollgruppe.

Nach Amplifikation der Gensequenz führten wir ein Mutationsscreening mit einer SSCP-Analyse durch. In dieser Analyse lieferten 16 Patienten und eine phänotypisch gesunde Kontrollperson ein abweichendes Wanderungsverhalten der Einzelstränge, das auf einen Polymorphismus (z.B. der gesunden Kontrollperson) oder eine funktionelle Mutation der Prop-1-Sequenz hinwies.

Zur genaueren Identifizierung der den SSCP-Polymorphismen zugrundeliegenden Basenveränderungen führten wir in der Folge eine Sequenzierung der DNA durch.

Überraschenderweise konnte eine Mutation der Prop-1-Sequenz bei keiner der untersuchten Personen nachgewiesen werden. Die SSCP-Polymorphismen sind demnach auf Instabilitäten der Einzelstrang-Konformation im Rahmen des SSCP-Protokolls zurückzuführen.

Das klinische Bild von bisher mit Prop-1-Mutation identifizierten Patienten kennzeichnete sich durch einen kombinierten Hypophysenvorderlappenausfall für GH, Prl, TSH und den Gonadotropinen, ohne Ektopie der Neurohypophyse. Unsere Studie stellte den Versuch dar, dieses phänotypische Spektrum zu erweitern.

Das humane Prop-1-Gen wurde 1996 kloniert, nachdem es zunächst in der Ames-Maus identifiziert wurde (Ames-Maus: Punktmutation im Prop-1-Gen: S83P), (siehe Kapitel1). Inzwischen wurden 7 verschiedene Mutationen im

Prop-1-Gen beim Menschen entdeckt und es gilt als das bisher am häufigsten betroffene Gen bei monogenetischem Hypopituitarismus.

Die Mutationen, die bisher nur rezessiv vererbt gefunden wurden, verändern die Bindungseigenschaften des Transkriptionsfaktors und führen somit zu einer verminderten Genaktivierung. Es konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren bei der Organentwicklung der Hypophyse eine wesentliche Rolle spielen, und dass sie sowohl die Differenzierung der hypophysären Vorläuferzellen in reife, hormonproduzierende Zellreihen induzieren, wie auch zu deren zahlenmäßigen Proliferation führen. Das Protein wird zeitlich vor Pit-1 exprimiert. Der Mangel an Prop-1 führt zu einem im Vergleich zu Pit-1-Defekten relativ milderen Mangel an folgenden Hormonen: GH, TSH, Prolaktin und den Gonadotropinen LH und FSH.

Erstmalig wurde 1998 über einen Prop-1-Defekt beim Menschen berichtet, fast 1 ½ Jahre nach der Publikation von Sornson et al über die Prop-1-Mutation der Ames-Maus. Alle bisher beschriebenen Prop-1-Mutationen betreffen die DNA-Bindungsregion des Proteins (Pfäffle RW, 1998) und sind rezessiven Erbgang (Parks JS, Brown MR, Hurley DL, Phelps CJ and Wajnrajch MP, 1999)

Die beschriebenen Mutationen treten sowohl sporadisch wie auch familiär gehäuft auf und betreffen immer den Bereich der Homöodomäne. Zahlenmäßig am häufigsten wurde die 301-302 del AG-Mutation im Exon 2 beschrieben. Ein Zusammenhang mit der AG-reichen Sequenz des Exon 2 wird dabei vermutet. Durch diese Deletion ergibt sich ein Frameshift auf Codon 102 mit einem vorzeitigen Stoppcodon nach Aminosäure 108 und einer dadurch bedingten, herabgesetzten DNA-Bindungs-fähigkeit.

Der am zweithäufigsten beschriebene Prop-1-Defekt beschreibt eine 1- bzw 2-Bp-Deletion auf Codon 50. Fofanova et al beschrieben eine 2-Bp-149-150-Deletion (Fofanova OV, Takamura N, Kinoshita E et al. 1992), wohingegen Parks et al eine 1-Bp-150-Deletion entdeckten (Parks JS, Brown MR, Hurley DL, Phelps CJ, Wajnrajch MP. 1999). Die 1-Bp-Deletion führt zu einem vorzeitigen Stoppcodon nach Aminosäure 164, während sich durch die 2-Bp-

Deletion eine Stoppcodon nach Aminosäure 108 ergibt. In beiden Fällen weist das mutierte Protein eine herabgesetzte DNA-Bindungsfähigkeit auf.

Der C -> T - Basenaustausch auf Nukleotid 295 führt dazu, dass aus Codon 99 ein Stoppcodon wird (Parks JS, Brown MR, Hurley DL, Phelps CJ and Wajnrajch MP, 1999) und in der Folge davon ein unwirksames Prop-1-Protein entsteht.

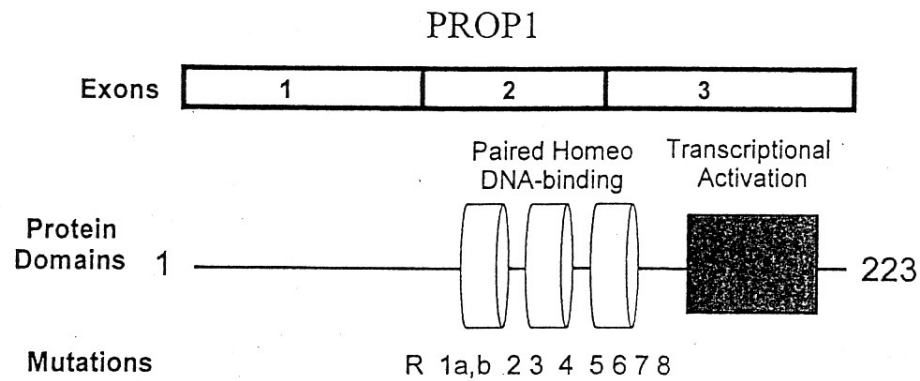
Deladoey et al. beschrieben einen A ->T – Basenaustausch auf Nukleotid 343, was zu einem weitgehenden Verlust der dritten α -Helix der DNA-Bindungsregion ebenso wie zu einem Verlust der Transaktivierungsregion des Proteins führt. Dies führt am wahrscheinlichsten zu einem kompletten Funktionsverlust des Proteins (Deladoey J, Fluck C, Buyukgebiz A et al. 1999).

1997 amplifizierten und sequenzirten Wu et al die Prop-1-Sequenz bei Patienten mit CPHD. Sie fanden bei einer Familie einen Basebaustausch C -> T, welcher zu einem Aminosäureaustausch von Arg -> Cys auf Codon 120 führte (betrifft die 52. Aminosäure der dritten Helix der Homöodomäne) (R120C) (Wu W, Cogan JD, Pfäffle RW, Dasen JS, Frisch H, O'Connell SM, Flynn SE, Brown MR, Mullis PE, Parks JS, Phillips JA, Rosenfeld MG, 1998). Ein Jahr später beschrieben auch Fluck et al die R120C-Mutation bei 2 Familien. Das mutierte Prop-1-Protein hat eine Rest - DNA - Bindungsfähigkeit von nur 10% (Fluck C, Deladoey J, Rutishauser K, Eble A, Marti U, Wu W et al, 1998).

Bei einem zweiten Patienten fanden Wu et al einen T -> A – Austausch im Bereich des Nukleotids 349, was einen Austausch von Phe -> Ile auf Codon 117 zur Folge hat. Auch hier bleibt lediglich eine Rest-DNA-Bindungsaktivität.

Patienten mit Mutationen, die zu einem vollständigen Funktionsverlust des Proteins führen, haben einen ausgeprägteren Mangel an den hypophysären Hormonen als die Patienten mit einer Rest-Aktivität des Prop-1-Proteins.

Untenstehende Tabelle fasst die bisher detektierten Prop-1-Mutationen noch mal zusammen.



Recessive Mutations (R)

1a	150 delA ✓	Frameshift, 164 aa protein, complete LOF
1b	149-150delGA ✓	Frameshift, 108 aa protein, complete LOF
2	Arg73Cys	Missense, probably complete LOF
3	Ser 83 Pro (Ames)	Missense, partial (80%) LOF
4	Arg99Ter	Nonsense, 98 aa protein, complete LOF
5	301-302delAG ✓	Frameshift, 108 aa protein, complete LOF
6	A→T nt 343-2 ✓	Splice error, complete LOF
7	Phe 117 Ile	Missense, complete LOF
8	Arg 120 Cys	Missense, nearly complete (90%) LOF

Abbildung 21: Prop1 c DNA, protein domains and mutations

(nach Parks et al, 1999)

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass alle Patienten bei denen in Studien Mutationen der Prop-1-Sequenz nachgewiesen wurden, eine kombinierte hypophysäre Insuffizienz als endokrinen Phänotyp aufwiesen. Bei Ärzten vorstellig und im Weiteren untersucht wurden sie aufgrund einer aufgefallenen Wachstumsretardierung. Radiologisch fanden sich bei diesen Patienten sowohl normale wie auch hypoplastische oder auch tumorös veränderte Hypophysen. Nie aber eine ektope Neurohypophyse, wie dies bei unserer Patienten der Fall war. Hier fiel ebenfalls, zunächst meist im frühen Kleinkindalter, eine Wachstumsverzögerung auf. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten dann ebenfalls eine kombinierte hypophysäre Insuffizienz, oder einen isolierten Wachstumshormonmangel.

Unsere Hypothese war nun, dass ein Prop-1-Defekt, wie er bereits nachgewiesen wurde, nicht nur definierte multiple hypophysäre Ausfälle und eine Hypoplasie der Hypophyse verursacht (Pfäffle RW, 1998), sondern als Ausdruck eines erweiterten phänotypischen Spektrums auch für eine Ektopie der Hypophyse zusätzlich zu den hypophysären Ausfällen verantwortlich ist.

Im Rahmen unserer Mutationsanalyse bei 23 Patienten mit ektoper Neurohypophyse konnten wir allerdings keinen Prop-1-Defekt nachweisen. Auch in vorausgegangenen Studien konnte der Phänotyp der Ektopie bei Patienten mit Prop-1-Defekt nicht detektiert werden. Ob nun eine Ektopie durch eine Mutation des Prop-1-Gens verursacht wird, kann mit dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden. Allerdings kann gesagt werden, dass ein Prop-1-Defekt zumindest nicht häufig die Ursache für eine Ektopie ist.

Defekte oder Veränderungen anderer Transkriptionsfaktoren der hypothalamo-hypophysären Hormonachse könnten für das Krankheitsbild der ektope Neurohypophyse bei Patienten mit multiplen hypophysären Ausfällen ursächlich in Frage kommen. Hesx-1 (auch Rpx, Rathkes's pouch homeobox genannt) ist ein homöotisches Gen das zeitlich vor Prop-1 und Pit-1 exprimiert wird und dessen kodiertes Protein mit dem von Prop-1 kodierten Protein um die Ziel-DNA-Bindungsstelle konkurriert. Lokalisiert ist das Gen bei der Maus auf

Chromosom 14, beim Menschen auf Chromosom 3p21.2 (Parks JS, Brown MR, Hurley DL, Phelps CJ, Wajnrajch MP, 1999). Es ist ebenso wie Prop-1 und Pit-1 maßgeblich an der Morphogenese und Organogenese der Hypophyse beteiligt.

2003 untersuchten Kim et al 12 Patienten mit einem kombinierten Hypophysenvorderlappenhormonausfall auf Mutationen von Pit-1, Prop-1, Lhx-3 und Hesx-1. Auch hier wiesen alle Patienten in der magnetresonanztomographischen Aufnahme der Hypophyse pathologische Befunde auf, so eine ektope Neurohypophyse, eine hypoplastische Adenohypophyse, das Empty-Sella-Syndrom oder eine septo-optische-Dysplasie (SOD). Da nun die Embryonalentwicklung der Hypophyse von einer effektiven Expression der Transkriptionsfaktoren abhängt, postulierten Kim et al wiederum, dass genetische Defekte im Bereich der Transkriptionsfaktoren für den Phänotyp der malformierten Hypophyse verantwortlich sind. Allerdings konnten sie bei den untersuchten Patienten keine Mutationen nachweisen (Kim SS, Kim Y, Shin YL, Kim GH, Kim TU, Yoo HHW, 2003).

Die septo-optische Dysplasie und die ektope Neurohypophyse gehören zum selben Formenkreis. Patienten mit SOD wurden von Dattani et al auf Mutationen untersucht. Dabei fanden sie eine homozygote Mutationen (Arg160Cys, siehe unten) (Dattani MT, Martinez-Barbera J-P, Thomas PQ, Brickman JM, Gupta R, Mårtensson I-L, Toresson H, Fox M, Wales JKH, Hindmarsh PC, Krauss S, Beddington RSP & Robinson ICAF, 1998)

2003 untersuchten Mitchell et al wiederum Patienten mit dem Phänotyp der Ektopie ohne SOD und fanden eine heterozygote Mutation des Hesx-1-Gens bei einem der Patienten (Mitchell LA, Thomas PQ, Zacharin MR, Scheffer IE, 2003). Somit steht das mutierte Hesx-1-Gen in direktem Zusammenhang mit diesen cerebralen Missbildungen.

Auch Brickman et al beschrieben in ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen dem Phänotyp der ektope Neurohypophyse und Defekte des Hesx-1-Gens. Sie konzentrieren sich hierbei auf die R 160C- und die S 170L-Mutationen (siehe Bildbeschreibung) (Brickman JM, Clements M, Tyrell R,

McNay D, Woods K, Warner J, Stewart A, Beddington RSP and Dattani M, 2001).

In untenstehender Abbildung sind magnetresonanztomographische Aufnahmen des Kopfes von gesunden Kindern und solchen mit den oben beschriebenen Mutationen des Hesx-1-Gens zu sehen.

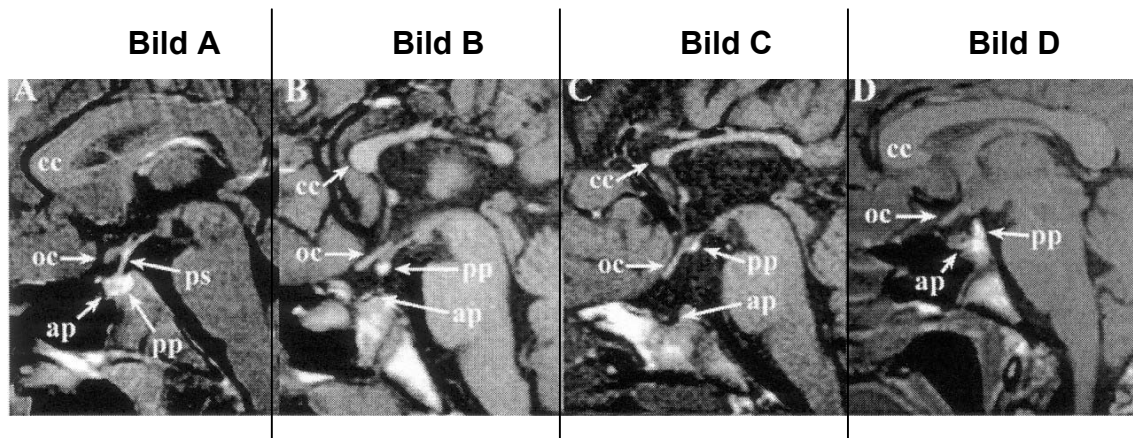


Abbildung 22: Kernspintomographische Bilder von Patienten mit normal geformter und ektopter Neurohypophyse (nach Brickman et al, 2001)

Bild A zeigt das kernspintomographische Bild eines gesunden Patienten. Es zeigt normal geformten Strukturen, wie den Großhirnbalken (Corpus callosum, cc), das Chiasma opticum (optic chiasm, oc), die Adenohypophyse (anterior pituitary, ap), den Hypophysenstiel (pituitary stalk, ps) und die Neurohypophyse (posterior pituitary, pp).

Bild B zeigt das kernspintomographische Bild eines Patienten mit einer Hesx-1-Mutation (R 160C-Mutation, homozygote Punktmutation, die zu einem Aminosäurenaustausch Arg160Cys führt, Wales JKH and Quarrell OWJ, 1996, Dattani et al, 1998). Zu sehen sind ein hypoplastischer Großhirnbalken und eine ektope Neurohypophyse.

Bild C zeigt ebenfalls das kernspintomographische Bild eines Patienten mit einer homozygoten R 160C-Mutation des Hesx-1-Gens. Auch hier sind ein hypoplastischer Großhirnbalken und Chiasma opticum zu sehen. Zusätzlich eine ektope Neurohypophyse und ein fehlender Hypophysenstiel.

Bild D zeigt das kernspintomographische Bild eines Patienten mit einer S 170L-Mutation des Hesx-1-Gens (heterozygote Mutation mit der Folge eines Aminosäureaustausches). Zu sehen ist eine ektope und atrophische Neurohypophyse, zusätzlich eine hypoplastische Neurohypophyse. Großhirnbalken und Chiasma opticum sind normal geformt.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der wesentlich an der Organogenese der Hypophyse beteiligt ist, und deshalb bei Patienten mit CPHD und einer malformierten Hypophyse, und insbesondere einer ektope Neurohypophyse auf Mutationen untersucht wurde, ist das homöotische Gen LHX-4. LHX-4 reguliert gemeinsam mit dem ähnlichen, homöotischen Gen LHX-3 die Differenzierung und die Proliferation der hypophysären Zellreihen. Lokalisiert ist LHX-4 beim Menschen auf Chromosom 1.

Bis dato wurde lediglich in einer Studie über Patienten mit einem LHX-4-Defekt und einer Ektope der Neurohypophyse berichtet (Machinis K, Pantel J, Netchine I, Léger J, Camand OJA, Sobrier M-L, Dastot-Le Moal F, Duquesnoy P, Abitbol M, Czernichow P and Amselem S, 2001). Dabei handelt es sich um eine heterozygote Punktmutation, die einen G -> C – Basenaustausch auf dem dem Exon 5 vorausgehenden Intron zur Folge hat.

Insgesamt sind also bisher zwei Transkriptionsfaktoren bekannt, bei denen Defekte der Gensequenz in einem Zusammenhang mit einer ektope Neurohypophyse steht. Es handelt sich hierbei um die homöotischen Gene HESX-1 und LHX-4, die wesentlich an der Morphogenese und Organogenese der Hypophyse beteiligt sind. Detektiert wurden die Mutationen bei Patienten, die neben einem kombinierten hypophysären Hormonausfall insbesondere eine Ektope der Neurohypophyse aufwiesen.

Prop-1 ist ebenfalls ein wichtiger Transkriptionsfaktor, dessen korrekte Expression wesentlich an der Embryonalentwicklung der Hypophyse beteiligt ist. Aber weder wir noch andere Untersucher konnten bisher an Patienten mit CPHD und insbesondere einer ektope Neurohypophyse einen Prop-1-Defekt nachweisen.

Auch nicht-genetische Ursachen einer ektopen Neurohypophyse wurden in früheren Arbeiten diskutiert, z.B. eine traumatische Genese im Rahmen einer komplizierten Geburt, oder auch teratologische Faktoren während der Schwangerschaft. Allerdings konnte bisher kein adäquater, direkter Zusammenhang hergestellt werden.

6. Zusammenfassung

Der hormonelle Kleinwuchs ist eine Differentialdiagnose beim pathologischen Wachstumsverhalten des Kindes. Diese Kinder weisen einen isolierten Wachstumshormonmangel auf, oder auch multiple hypophysäre Ausfälle mit einem konsekutiven Mangel an TSH, Prolaktin und den Gonadotropinen LH und FSH, zusätzlich zum Wachstumshormon.

Zahlreiche Studien in der Vergangenheit wiesen auf eine molekulargenetische Ursache für dieses endokrine Krankheitsbild hin. So identifizierte man Transkriptionsfaktoren, die sowohl für die Embryonalentwicklung der Hypophyse, wie auch für die Differenzierung und zahlenmäßige Proliferation der hypophysären Zellreihen verantwortlich sind. Mutationen der Gensequenz dieser Faktoren führen zum klinischen Krankheitsbild des Hypopituitarismus.

In unserer Studie untersuchten wir den Transkriptionsfaktor, der zeitlich vor Pit-1 exprimiert wird und somit Prophet- of- Pit-1 (Prop-1) genannt wird.

Die Kinder aus der endokrinologischen Ambulanz der Kinderklinik Tübingen, die an dieser Studie teilnahmen, wiesen einen gemeinsamen, klinischen Phänotyp auf: die kernspintomographische Darstellung ihrer Schädel erbrachte den Nachweis einer ektopen Neurohypophyse. Zusätzlich wiesen sie den endokrinen Phänotyp der kombinierten hypophysären Insuffizienz auf.

Wir unterstellten nun einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der ektopen Neurohypophyse, und einem genetischen Defekt im Bereich der Prop-1-Gensequenz.

Dafür amplifizierten wir die Prop-1-Sequenz aller Patienten mittels PCR und unterzogen die Amplifikate einer SSCP-Analyse. Alle dort auffälligen Sequenzen und die gesamte Homöodomäne aller Patienten wurden im weiteren Verlauf sequenziert.

Eine Mutation der Prop-1-Sequenz konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

Es wurden von anderen Untersuchern weitere Transkriptionsfaktoren bei Patienten mit Ektopie der Neurohypophyse und CPHD untersucht und in der

Folge auch Mutationen gefunden. Dazu gehören das homöotische Gen HESX-1, dessen genetische Defekte auch insbesondere mit dem Krankheitsbild der septo-optischen Dysplasie in Zusammenhang stehen, und der Transkriptionsfaktor LHX-4.

Wir können im Rahmen unserer Studie feststellen, dass genetische Defekte des Transkriptionsfaktors Prop-1 zumindest keine häufige Ursache für die Ektopie der Neurohypophyse ist.

7. Literaturverzeichnis

1. Andersen B, Pearse RV, Jenne K, Sornson M, Lin SC, Bartke A, Rosenfeld MG. The Ames dwarf gene is required for Pit-1 gene activation. *Develop. Biol.* 172: 495-503, 1995
2. Bartke A. Genetic models in the study of anterior pituitary hormones. *Genetic Variation in hormone system.* 111-126, 1979
3. Benz MR. Studie zum Syndrom des biologisch inaktiven Wachstumshormons: Messung der biologischen Aktivität in vitro und Mutationsanalyse des GH-1. Medizinische Dissertation, 2001
4. Binder G, Brown M, Parks JS. Mechanisms Responsible for Dominant Expression of Human Growth Hormone Gene Mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 81: 4047-4050, 1996
5. Binder G, Ranke MB. Screening for Growth Hormone (GH) Gene Splice-Site Mutations in sporadic Cases with severe isolated GH Deficiency Using Ectopic Transcript Analysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1995. 80: 1247- 1252
6. Blum WF, Insulin-like growth factors and their binding proteins. In Ranke MB, ed. *Functional endocrinologic diagnostics in children and adolescence.* Mannheim: J & J Verlag 1992, 102-107
7. Blum WF, Ranke MB, Kietzman K, Gauggel E, Zeisel HJ, Bierich JR. A specific radioimmunoassay for the growth hormone (GH)-dependent somatomedin binding protein. Its use for diagnostic of GH deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1990. 70: 1292-1298
8. Blum WF, Ranke MB. Use of insulin like growth factor binding protein 3 for the evaluation of growth disorders. *Hormone Research* 1990, 34: 31-37
9. Brickman JM, Clements M, Richard T, McNay D, Woods K, Warner J, Stewart A, Beddington Rosa SP and Dattani M. Molecular effects of novel mutations in *Hesx1/HESX1* associated with human pituitary disorders. *Development* 128, 5189-5199 (2001).
10. Brown RS, Bhatia V, Hayes E. An apparent Cluster of Congenital Hypopituitarism in Central Massachusetts: Magnetic Resonance Imaging and Hormonal Studies. *J Clin Endocrinol Metab*, 72: 12-18, 1991
11. Brown-Borg HM, Borg KE, Meliska CJ, Bartke A. Dwarf mice and the ageing process. *Letter Nature* 384: 33 only, 1996
12. Buckwalter MS, Katz RW, Camper SA. Localization of the panhypopituitary dwarf (df) mutation on mouse chromosome 11 in an intersubspecific backcross. *Genomics* 10: 515-526, 1991
13. Carvalho LR, Woods KS, Mendonca BB, Marcal N, Zamparini AL, Stifani S, Brickman JM, Arnhold IJP and Dattani MT. A homozygous mutation in *HESX1* is associated with evolving hypopituitarism due to impaired repressor-corepressor interaction. *J. Clin. Invest.* 112: 1192-1201 (2003)
14. Castrillo JL, Bodner M, Karin M. Purification of growth hormone-specific transcription factor GHF-1 containing homeobox. *Science* 243: 814-817, 1989
15. Clemmons DR, Van Wyk JJ, Ridgway EC, Kliman B, Kjellberg RN, Underwood LE. Evaluation of acromegaly by radioimmunoassay of somatomedin C. *New England Journal Med* 1979. 301: 1138-1142
16. Clemmons DR, Van Wyk JJ., Factors controlling blood concentration of somatomedin C. *Clin Endocrinol Metab* 1984;13: 113-143

17. Cogan JC, Phillips JA III, Sakati N, Frisch H, Schober E, Milner RD. Heterogeneous growth hormone (GH) gene mutations in familial GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 76: 1224-1228, 1993
18. Cogan JD, Wu W, Phillips JA, Arnhold IJ, Agapito A, Fofanova OV et al. The Prop-1 2-base pair deletion is a common cause of combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 3346-3349, 1998
19. Conley ME, Burks AW, Herrod HG, Puck JM. Molecular analysis of X-linked agammaglobulinemia with growth hormone deficiency. In *J Pediatrics* 119: 392-397, 1991
20. Copeland KC, Underwood LE, Van Wyk JJ. Induction of immunoreactive somatomedin C in human serum by growth hormone: dose-response relationships and effect on chromatographic profiles. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1980. 50: 690-697
21. Dattani Mehul T. Novel Insights into the Aetiology and Pathogenesis of Hypopituitarism. *Horm Res* 2004; 62 (suppl 3): 1-13
22. Dattani MT, Martinez-Barbera JP, Thomas PQ, Brickman JM, Gupta R, Mårtensson IJ, Toresson H, Fox M, Wales JKH, Hindmarsh PC, Krauss S, Beddington RSP, Robinson ICAF. Mutations in the homeobox gene *Hesx 1/ HESX 1* associated with septo-optic dysplasia in human and mouse, *nature genetics*, Vol 19, 1998
23. Deladoey J, Flück C, Büyükgebiz A, Kuhlmann BV, Eble A, Hindmarsh PC, Wu W, Mullis PE. "Hot Spot" in the Prop 1 Gene Responsible for Combined Pituitary Hormone Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1645-1650, 1999
24. Drop SLS. Report on the nomenclature of the IGF binding proteins. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1992. 74: 1215-1216
25. Duquesnoy P, Roy A, Dastot F, Ghali I, Teinturier C, Netchine I et al. Human Prop-1: Cloning, mapping, genomic structure. Mutations in familial combined pituitary hormone deficiency. *FEBS Lett* 437: 216-220, 1998
26. Dutour A. A new step understood in the cascade of tissue-specific regulators orchestrating pituitary lineage determination: the Prophet of Pit-1 (Prop-1). *European Journal of Endocrinology* 137: 616.617, 1997
27. Elzaouk L, Leimbacher W, Turri M, Ledermann B, Bürki K, Blau N, Thöny B. Dwarfism and Low Insulin-like Growth Factor-1 Due to Dopamine Depletion in Pts Mice Rescued by Feeding Neurotransmitter Precursors and H4-biopterin, *Journal of Biological Chemistry* Vol 278, No 30, 28303-28311, 2003
28. Fleisher TA, White RM, Broder S et al. X-linked hyogammaglobulinemia and isolated growth hormone deficiency. *New England Journal*, 1980, 302: 1429-1434
29. Flück C, Deladoey J, Rutishauser K, Eble A, Marti U, Wu W et al. Phenotypic variability in familial combined pituitary hormone deficiency caused by a Prop-1 gene mutation resulting in the substitution of Arg-Cys at codon 120 (R120C). *J Clin Endocrinol Metab* 83: 3727-3734, 1998
30. Fofanova O, Takamura N, Kinoshita E, Parks JS, Brown MR, Peterkova VA et al. Compound heterozygous deletion of the Prop-1 gene in children with combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2601-2604, 1998
31. Fofanova OV, Takamura N, Kinoshita E et al. Rarity of Pit-1 involvement in children from Russia with combined pituitary hormone deficiency. *Am J Med Genet.* 77: 360-365, 1998
32. Gage PJ, Brinkmeier ML, Scarlett LM, Knapp LT, Camper SA, Mahon KA. The Ames dwarf gene, *df*, is required early in pituitary ontogeny for the extinction of *Rpx* transcription and initiation of lineage-specific cell proliferation. *Molec Endocr* 10: 1570-1581, 1996
33. Hesch RD, Becker H, Brabant EG, Schulte HM. Erkrankungen des Hypothalamus-Hypophysensystems. 827-846, in *Die Innere Medizin*, 10. Auflage, Schattauer Verlag Stuttgart, 2000

34. Hoge S. Verlaufsbeobachtungen der Hypophysenfunktion bei Patienten mit Hypophysenadenomen und anderen sellären Raumforderungen. Medizinische Dissertation, Universität München, 2003
35. Holz C, Rieger A, Burkert W, Holzhausen HJ. Das gleichzeitige Auftreten eines Hypophysenadenoms und eines parasellären Meningeoms-zwei Fallberichte. Klinik für Neurochirurgie / Institut für Pathologie der Universität Halle-Wittenberg
36. Hoya M, Villa V, Jimenez O, Castrillo JL. Anterior pituitary development and Pit-1 / GHF-1 transcription factor. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54 (10): 1059-1066, 1998
37. Ingraham HA, Flynn SE, Voss JW et al. The POU-specific domain of Pit-1 is essential for sequence-specific, high affinity DNA binding and DNA-dependent Pit-1-Pit-1 interactions. *Cell* 61: 1021-1033, 1990
38. Jacobson EM, Li P, Leon-del-Rio A, Rosenfeld MG, Aggarwal AK. Structure of Pit-1 POU domain bound to DNA as a dimmer: unexpected arrangement and flexibility. *Genes Dev* 11: 198-212, 1997
39. Jones BK, Monks BR, Liebhaber SA, Cooke NE. The Human Growth Hormone Gene Is Regulated by a Multicomponent Locus Control Region. *Molecular and Cellular Biology*. 15: 7010-7021, 1995
40. Jorgensen JOL, Blum WF, Moller N, Ranke MB. Short-term changes in serum insulin-like growth factors (IGF) and IGF binding protein 3 after different modes of intravenous growth hormone (GH) exposure in GH-deficient children. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1991; 72: 582-587
41. Kim SS, Kim Y, Shin YL, Kim GH, Kim TU, Yoo, HW. Clinical Characteristics and Molecular Analysis of Pit-1, Prop-1, Lhx-3 and Hesx-1 in Combined Pituitary Hormone Deficiency Patients with Abnormal Pituitary MR Imaging. *Horm Res* 2003; 60: 277-283, 2003
42. Kleppe K, Ohstuka E, Kleppe R, Molineux L, Khorana HG. *Journal of Molecular Biology*, 56, 341, 1971
43. Li S, Crenshaw EBd, Rawson EJ, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene Pit-1. *Nature*, 347: 528-533, 1990
44. Lowe T, Sharefkin J, Yang SQ, Dieffenbach CW. A computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reactions. *Nucleic Acids Research*, Vol 18 No 7, 1989
45. Machinis K, Pantel J, Netchine I, Léger J, Camand OJA, Sobrier M-L, Dastot-Le Moal F, Duquesnoy P, Abitbol M, Czernichow P and Amselem S. Syndromic Short Stature in Patients with a Germline Mutation in the LIM Homeobox LHX4. *Am. J. Hum. Genet.* 69: 961-968, 2001
46. Mangalam HJ, Albert VR, Ingraham HA et al. A pituitary POU domain protein, Pit-1, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally. *Genes Dev.* 3: 946-958, 1989
47. McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR. *PCR A Practical Approach*. Oxford University Press, 2. Auflage, 1992
48. Mendonca BB, Osorio MG, Latronico AC, Estefan V, Lo LS, Arnhold IJ. Longitudinal hormonal and pituitary imaging changes in two females with combined pituitary hormone deficiency due to deletion of A301, G302 in the Prop 1 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 84: 942-945, 1999
49. Mitchell A, Thomas PQ, Zacharin MR and Scheffer IE. Ectopic Posterior Pituitary Lobe and Periventricular Heterotopia: Cerebral Malformations with the Same Underlying Mechanism? *AJNR AM J Neuroradiol* 23: 1475-1481, October 2002

50. Mitchell LA, Thomas PQ, Zacharin MR, Scheffer IE. Ectopic posterior pituitary lobe and periventricular heterotopia: cerebral malformations with the same underlying mechanism? Department of Radiology, Royal Children's Hospital, Melbourne, Australia.
51. Mullis K, Faloona F. In *Methods in enzymology*, Vol 155 (ed. R. Wu), p. 335. Academic Press, New York and London, 1987
52. Nagel BHP, Palmbach M, Petersen D, Ranke MB. Magnetic resonance images of 91 children with different causes of short stature: pituitary size reflects growth hormone secretion. *Eur J Pediatr*, 156: 758-763, 1997
53. Nakamura Y, Usui T, Mizuta H, Murabe H, Muro S, Suda M, Tanaka K, Tanaka I, Shimatsu A, Nakao K. Characterization of Promoter of Pit-1 gene expression in normal pituitary and pituitary adenomas in humans. *J Clin Endocrinol Metabol* 84: 1414- 1419, 1999
54. Neuhäuser G (1995) *Entwicklung und Wachstum*, 29-35 in *Pädiatrie*, 1. Auflage, Hippokrates Verlag Stuttgart
55. Nogueira CR, Leite CC, Chedid EP, Liberman B, Pimentel-Filho FR, Kopp P et al. Autosomal recessive deficiency of combined pituitary hormones except ACTH in a consanguineous Brazilian kindred. *J Endocrinol Invest* 20: 629-633, 1997
56. Nogueira CR, Sabacan L, Jameson JL, Medeiros-Neto G, Kopp P. Combined Pituitary Hormone Deficiency in an Inbred Brazilian Kindred Associated with a Mutation in the Prop-1-Gene. *Molecular Genetics and Metabolism* 67: 58-61, 1999
57. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformational polymorphisms. *Proc. Acad. Sci. USA*, 86: 2766-2770, 1989
58. Osorio MGF, Kopp P, Marui S, Latronico AC, Mendonca BB, Arnhold IJP. Combined pituitary hormone deficiency caused by a novel mutation of a highly conserved residue (F88S) in the homeodomain of Prop1. *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 2779-2785, 2000
59. Panet A, Khorana HG. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 5213-21, 1976
60. Parks JS, Adess ME, Brown MR. Genes regulating hypothalamic and pituitary development. *Acta Paediatr Suppl.* 423: 28-32, 1997
61. Parks JS, Brown MR, Hurley DL, Phelps CJ, Wajnrajch P. Heritable Disorders of Pituitary Development. *J Clin Endocrinol Metabolism*, Vol 84: 4362-4370, 1999
62. Parks JS, Brown MR. Transcription factors regulating pituitary development. *Growth Hormone IGF Res* 9: 2-11, 1999
63. Pfäffle RW, DiMattia GE, Parks JS, Brown MR, Wit JM, Jansen M et al. Mutation of the POU-specific domain of Pit-1 and hypopituitarism without pituitary hypoplasia. *Science* 257: 1118.1121, 1992
64. Pfäffle RW. *Molekulargenetische Untersuchungen zur Rolle von hypophysären Transkriptionsfaktoren bei der Entstehung des hormonellen Kleinwuchses*, Habilitationsarbeit, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, 1998
65. Phillips JA. Inherited defects in growth hormone synthesis and action. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, D. V, eds. *The metabolic basis of inherited disease*. Vol 2. New York: McGraw-Hill. pp. 1965-1983. 1989
66. Pinto G, Netchine I, Sobrier ML, Brunelle F, Souberbielle JC, Brauner R. Pituitary Stalk Interruption Syndrome: A Clinical-Biological-Genetic Assessment of Its Pathogenesis. *J Clin Endocrinol Metabolism*, Vol 82: 3450-3454, 1997
67. Prillinger JH. Expression der 17.5 kD Variante des humanen Wachstumshormons in S2-Insektenzellen. *Medizinische Dissertation*. 2001
68. Procter AM, Phillips JA, Cooper DN. The molecular genetics of growth hormone deficiency. *Human Genetics*, 103 (3): 255-272, 1998
69. Pschyrembel (1990), *Klinisches Wörterbuch*, 256. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, New York

70. Radovick S, Nations M, Du Y, Berg LA, Weintraub BD, Wondisford FE. A mutation in the POU-homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. *Science* 257: 1115-1118, 1992
71. RaffinSanson ML. Mistrust false prophets! Congenital inactivation of Prop-1 results in a combined familial pituitary deficiency. *MS Medicine Sciences*, 14 (6-7): 796-796, 1998
72. Ranke MB (1999) Proportionierter Kleinwuchs, 445-450, in Michalik, Schönau *Differentialdiagnose Pädiatrie*, 1. Auflage, Urban & Schwarzenbergverlag München, Wien, Baltimore
73. Ranke MB, Binder G, Wollmann HA. Krankheiten von Hypophyse und Hypothalamus (464-468) in: Lentze MJ, Schaub J, Schulte FJ, Spranger J. *Pädiatrie, Grundlagen und Praxis*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg (2001)
74. Ranke MB, Haber P. Wachstumshormonstimulationstests (70-86) in: *Endokrinologische Funktionsdiagnostik im Kindes-und Jugendalter*. Ranke MB. J&J Verlag Mannheim (1993)
75. Ranke MB, Schwaderer ML, Bierich JR. Die konstitutionelle Entwicklungsverzögerung: Eine einfache Normvariante des Wachstums. *Klinische Pädiatrie*, 289-294, 1982
76. Raskin S et al. Genetic mapping of the human pituitary-specific transcriptional factor gene and its analysis in familial panhypopituitarism dwarfism. *Hum Genetics* 98: 703-705, 1996
77. Rimoin DL. Hereditary forms of growth hormone deficiency and resistance. *Birth defects*. 1976, 12: 15-29
78. Rosenbloom AL, Almonte AS, Brown MR, Fisher DA, Baumbach L, Parks JS. Clinical and biochemical phenotype of familial anterior pituitarism from mutation of the Prop-1 Gene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 84 (1): 50-57, 1999
79. Rosenfeld RG, Wilson DM, Lee PDK, Hintz RL, Insulin-like growth factor I and II in evaluation of growth retardation. *Journal Padiatry* 1986; 109: 428-433
80. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239: 487-491, 1988
81. Schweikert HU (1999) Erkrankungen des Hypothalamus und der Hypophyse, 748-751 in *Innere Medizin*, 1. Auflage, Hippokrates Verlag Stuttgart
82. Scully KM, Rosenfeld MG. Pituitary Development: Regulatory Codes in Mammalian Organogenesis. *Science's Compass*, Vol 295, 2002
83. Slabaugh MB, Lieberman ME, Rutledge JJ, Gorski J. Growth Hormone and Prolactin Synthesis in Normal and Homozygous Snell and Ames Dwarf Mice. *Endocrinology*, 109: 1040. 1981)
84. Sloop KW, Walvoord EC, Showalter AD, Pescovitz OH, Rhodes SJ. Molecular analysis of LHX3 and Prop1 in pituitary hormone deficiency patients with posterior pituitary ectopia. *J Clin Endocr Metab* 85: 2701-2708, 2000
85. Sornson MW, Wu W, Dasen JS, Flynn SE, Norman DJ, SM OC, Gukovsky I, Carriere C, Ryan AK, Miller AP, Zuo L, Gleiberman AS, Andersen B, Beamer WG, Rosenfeld MG. Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature*, 384: 327-333, 1996
86. Spinass GA, Heitz PhU, L2üthi N. Eine Zusammenstellung der pathophysiologischen und klinischen Grundlagen im Bereich Endokrinologie, 2004
87. Thomas PQ, Dattani MT, Brickman JM, McNay D, Warne G, Zacharin M, Cameron F, Hurst J, Woods K, Dunger D, Stanhope R, Forrest S, Robinson ICAF and Beddington RSP. Heterozygous HESX1 mutations associated with isolated congenital pituitary hypoplasia and septo-optic dysplasia. *Human Molecular Genetics*, 2001, Vol. 10, No 1, 39-45.

88. Thomas PQ, Johnson BV, Rathjen J and Rathjen PD. Sequence, Genomic Organization and expression of the Novel Homeobox Gene Hesx1. Vol 270, No 8, pp. 3869-3875, 1995.
89. Treier M, Rosenfeld MG. The hypothalamic pituitary axis: codevelopment of two organs. *Current Opinions in Cell Biology*, 8: 833-843, 1996
90. Voss JW, Rosenfeld MG. Anterior Pituitary Development: Short Tales from Dwarf Mice. *Cell Press*. 70: 527-530, 1992
91. Wales JKH, Quarrell OWJ. Evidence for possible Mendelian inheritance of septo-optic dysplasia. *Acta Paediatr*. 85: 391-392. 1996
92. WatkinsChow DE, Camper SA. How many homeobox genes does it take to make a pituitary gland? *Trends in Genetics*, 14 (7): 284-290, 1998
93. Wu W, Cogan JD, Pfäffle RW, Dasen JS, Frisch H, O'Connell SM, Flynn SE, Brown MR, Mullis PE, Parks JS, Phillips JA, Rosenfeld MG. Mutations in Prop-1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nature genetics*, 18: 147-149, 1998
94. Zabransky S (1995) Krankheiten der innersekretorischen Drüsen, 265-267 in *Pädiatrie*, 1. Auflage, Hippokrates Verlag Stuttgart

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Diagnostische Strategien beim Kind mit Wachstumshormonmangelsyndrom (nach Ranke, 1999)	12
Abbildung 2:	Darstellung des Wachstumshormons in seiner Sekundärstruktur bestehend aus einem Bündel von vier α -Helices	13
Abbildung 3:	Nach HU Schweikert, Erkrankungen des Hypothalamus und der Hypophyse, Innere Medizin	15
Abbildung 4:	Hormoneller Regelkreis der Hypophyse für die Hypophysenvorder-lappenhormone TSH, LH/FSH, ACTH und Prolaktin, stimulierende und inhibierende Einflüsse auf den verschiedenen Ebenen [aus Hesch et al., 2000]	16
Abbildung 5:	Schema zur Bindung von Pit-1 an seine Zielsequenz (nach Pfäffle RW, 1998)	20
Abbildung 6:	Schematischer Aufbau des Maus-Prop-1-Gens mit Lokalisation der bei der Ames-Zwergmaus beobachteten S83P-Mutation. (nach Pfäffle RW, 1998)	21
Abbildung 7:	Kernspintomographisches Bild des Schädels eines Patienten mit ektopter Neurohypophyse	26
Abbildung 8:	Beispiel für SSCP-Ergebnis	45
Abbildung 9:	8% Page, M VI, PRO 5.1 / 3.1, PRO 5.2b / 3.2	51
Abbildung 10:	8% PAGE, M VI, PRO 5.3 / 3.3 und PRO 5.4 / 3.4	51
Abbildung 11:	8% Page, MVI, PRO 5.011/3.011	52
Abbildung 12:	8% Page, MVI, PRO 5.02/3.02	53
Abbildung 13:	8% Page, MVI, PRO 5.5/3.5	53
Abbildung 14:	PCR Produkte mit dem Primerpaar PRO 5.1 / 3.1	54
Abbildung 15:	PCR – Produkte mit dem Primerpaar PRO 5.3 / 3.3	54
Abbildung 16:	PCR – Produkte mit dem Primerpaar PRO 5.1 / 3.1	56
Abbildung 17:	PCR – Produkte mit dem Primerpaar PRO 5.3 / 3.3	57
Abbildung 18:	PCR Produkte mit dem Primerpaar PRO 5.1 / 3.1	57
Abbildung 19:	PCR Produkte mit dem Primerpaar PRO 5.4 / 3.4	58

Abbildung 20: Sequenzierreaktion mit dem Primerpaar PRO 5.1-800/3.1-800	60
Abbildung 21: Prop1 c DNA, protein domains and mutations (nach Parks et al, 1999)	64 64
Abbildung 22: Kernspintomographische Bilder von Patienten mit normal geformter und ektopter Neurohypophyse (nach Brickman et al, 2001)	67

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ursachen für Kleinwuchs (nach Zabransky S., Krankheiten der innersekretorischen Drüsen, Pädiatrie, 1995)	9
Tabelle 2: Klassifikation des isolierten Wachstumshormonmangels (IGHD) sowie von Zuständen verminderter Wachstumshormonsensitivität (nach Phillips et al.)	17
Tabelle 3: Patientenübersicht	25
Tabelle 4: <u>PCR mit Primer PRO 5.1/3.1</u>	40
Tabelle 5: <u>PCR mit Primer PRO 5.2b/3.2</u>	40
Tabelle 6: <u>PCR mit Primer PRO 5.3/3.3</u>	40
Tabelle 7: <u>PCR mit Primer PRO 5.4/3.4</u>	41
Tabelle 8: <u>8% PAGE:</u>	42
Tabelle 9: <u>Primer PRO 5.02 / 3.02</u>	46
Tabelle 10: <u>Primer 5.011 / 3.011</u>	47
Tabelle 11: <u>Primer 5.5 / 3.5</u>	47
Tabelle 12: <u>Cycle conditions der Sequenzierreaktion</u>	47

Anhang 1

Human Prop-1

TGGGGAGAAGGGCCAGGCAGAGAAAAGTAGTCAGAAACAGAGCAACAGGTGAGGCTGAGG
ACCCCTCTCCCGGTCCGTCTCTTTTCATCAGTCTTTGTCTCGTTGTCCACTCCGACTCC -300

CAGGAGATTGAGCTGACACTCAAGCCAAGGAAGGGGAATTAGGAAACAATTAGAAAAA
GTCCCTTAACCTCGACTGTGAGTTCGGTTCCTTCCCCCTTAATCCTTTGTTAATCTTTTTT -240

AGTAAAGACAGTGAAAAAGTCAGAGACAGCTGCCTGCACCTACACACACATTCAGAGACA
TCATTTCTGTCACCTTTTTCAGTCTCTGTCGACGGACGTGGATGTGTGTGTAAGTCTCTGT - 80

GAGTCCAGAGGGTGGCATAACAGAGGGGAGAAGGGGAGGGAACAGGTGTGGAGAGGAGC
CTCAGGGTCTCCCACCGTATGTGTCTCCCTCTTCCCCTCCCTTGTCACACCTCTCCTCG -120

TGCGGAAGCAGAGAAATCTCAAGTCAGAGATTCAGGGACACTTGGTCCCCGTGGCGAGCC
ACGCCTTCGTCTCTTTAGAGTTCAGTCTCTAAGTCCCTGTGAACCAGGGGCACCGCTCGG 5' / -60

ATGGAAGCAGAAAGGAGGCGCCAGGCCGAGAAGCCAAGAAGGGGCGAGTCGGCAGCAGC 60
TACCTTCGTCTTTCTCCCGGGTCCGGCTCTTCGGTTTCTTCCCCTCAGCCGTCGTCG Exon1

CTGTTGCCTGAGAGACACCCGGCCACTGGGACCCCGACCACCACGGTGGgtgagtgaccg
GACAACGGACTCTCTGTGGGCCGGTGACCCTGGGGCTGGTGGTGCCACCcactcactggc

tcccgggtgtgcggtgggtccctgagga-gcagcnggtgtgaggetgaaagentangetcca 3'
agggccacacgcacccagggactcct-cgtcgnccacactccgactttcgtatnchaggt

tnaagaaggttaggaggaaaaattaanacccgaatcctatcatgttaaaactgtgggaac
anttcttccaatcctcctttttaatntgggcttaggatagtacaattttgacacccttg

ctttgaaagtaaaagggactggagcacccttggctttacanaactggggaactgaccct 3'
gaaactttcattttccctgacctcgtggggaaccgaaatgntgacccttgactgggga

tggcaggagggggcggtgaacactcacatcgcagtggggatgtgagacanttacctctg
accgtcctccccgcgacttgtgagtgtagcgtcaccctacactctgtnaatggagac

tccccactcctgacctcagattgggttagcccaagccactgccttctctgatgaacgga
aggggagtgaggactggagtctaaccaatcgggttcgggtgacggaagagactacttgct

.....

tgtggtcacaccattgcattcca-tctgggagacagagcaaga-t-tgtctcaaaaaaag
acactagtgtggtaacgtaaggtnagaccctctgtctcgttctnanaacagagtttttttc 5'

attggagcagcacaggacgcactgagcgcfaatcccgggacaggcacatgtgggtccagcac
taacctcgtcgtgtcctgcgtgactcgcgttagggccctgtccgtgtacaccagggtcgtg 5'

cgaggagcgtc-tcctcagaagccgccccctcccttctctcctgttctcagACTCGAGTGCT 120
gctcctcgcagnaggagtcttcggcggggaggggaagagaggcaagagctTGAGCTCACGA

CCACCCTGCAGAAGGCTCCCTGGTGCAGGAGGGGGGAGATCAAGGTTCTCCCCGCAAGGA 180
GGTGGGACGTCTTCCGAGGGACCACGTCCTCCCCCTCTAGTTCCAAGAGGGGCGTTCCT Exon 2

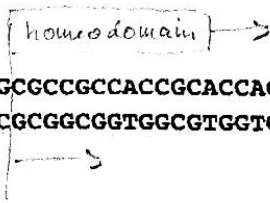
GGACAGAGGGGCCCGCCGCACTCCCGGCGCCGCCACCCGACCACCTTCAGCCCAGTGCAG 240
CCTGTCTCCCCGGCGGGCGTGAGGGCCCGGGCGGTGGCGTGGTGGAAAGTCGGGTACGTC

TTGGAACAGCTGGAGTCAGCCTTTGGGAGGAACCAGTACCCGACATCTGGGCCCCGAGAG 300
AACCTTGTCGACCTCAGTCGGAAACCTCCTTGGTTCATGGGGCTGTAGACCCGGGCTCTC

AGTCTTGCCCGGGACACTGGCCTCAGTGAGGCCCGAATCCAGGTgatgetccaggatcct
TCAGAACGGGCCCTGTGACCGGAGTCACTCCGGGCTTAGGTCCAactacgaggtcctagga

cctctctcaggaagaaatgcagatttctttgggtgctatcatagaatggttgggcattata 3'
ggagagagtccttctttacgtctaaagaaaccaagatagtagtcttacaaccgtaatat

accctaacctaaatggteaccagacacaggcctcatctcaccaccagcatcagagcaact
tgggattggatttaccagtggtctgtgtccggagtagagtggtgggtcgtagctcgttga



gcattgagaatatcatatcacttgagtttaaccctagctataagctaacttaacttgaat
cgtaactctttatagtatagtgaaactcaaattgggatcgatattcgattagattgaactta

ttcaacacctaccctcaatatttaaatagtgatgcccaattccggctgggcacaatagctca
aagttgtggatgggagttataaattatcactacgggtaaggccgacccgtgttatcgagt

cacctgtaatcccagcacttt -----
gtggacattagggtcgtgaaa -----

atacattattacagtcttaatcgttaaacttaccctaggggaaatttcccattctctggg
tatgtaataatgtcagaattagcaatttgaatgggatccccctttaaagggtgaagagacc 5'

gaagggaaatgtcattgtcaccatctttatctccttgggtggaagctgacacttcttactt
cttcccccttacagtaacagtggtataaatagaggaaccaccttcgactgtgaagaatgaa 5'

gccccgagtgttagaaaagggcacatgtggacagaggctggggacaagtctgtgggttcc
cggggctcacaatcttttccccgtgtacacctgtctccgacccctgttcagacacccaagg 5'

tttgtcagcagaccaggtcagccaagccttgtggaagagctttactccccctctggccatg
aaacagtcgtctggtcccgagtcggttcggaacaccttctcgaaatgagggagaccggtac 5'

ctggagaagcctgctccccgtccctgcacctcttgtcattggagtagggtgtcaccacct
gacctcttcggacaggggacagggacgtgggagaacagtaacctcatcccacagtggtgga 5'

PAIRED

atgtcaagtgtgggctctgatgtggttcctacccttctCAGGTCTGGTTCAGAACCCGC 360
tacagttcacaccccgagactacaccaaggatggggaagaGTCCAGACCAAGGTCTTGGCG

AGAGCTAAGCAACGGAAGCAAGAGCGCTCACTGCTTCAGCCTCTGGCCCATCTGTCTCCT 420
TCTCGATTTCGTTGCCTTCGTTCTCGCGAGTGACGAAGTCGGAGACCGGGTAGACAGAGGA Exon 3

GCCGCCTTTTCCAGCTTCTTGCCAGAGTCCACTGCTTGCCCCTATTCTTACGCAGCACCA 480
CGGCGGAAAAGGTGGAAGAACGGTCTCAGGTGACGAACGGGGATAAGAATGCGTCGTGGT

CCACCACCAGTGACCTGCTTCCCTCACCCCTACAGCCATGCCCTCCCTTCCCAGCCCTCC 540
GGTGGTGGTCACTGGACGAAGGGAGTGGGGATGTCGGTACGGGAGGGAAGGGTCCGGGAGG

ACAGGAGGGCCCTTTGCTTTGTACACCAGTCTGAGGACTGGTACCCTACCTTGCACCCA 600
TGTCCTCCGCGGAAACGAAACAGTGTGGTCAGACTCCTGACCATGGGATGGAACGTGGGT

2

GCCCCTGCCGGCCATTTGCCCTGCCCCCACCCCCTCCCATGCTCCCCCTCAGCCTTGAG 660
CGGGGACGGCCGGTAAACGGGACGGGGGTGGGGGAGGGTACGAGGGGGAGTCGGAATC

STOP!

CCATCCAAGTCCTGGAAC TGAGGTCAAACAAGTACCACCAAGGTGATCCCCAGCCTGCGG 720
GGTAGGTT CAGGACCTTGACTCCAGTTTGTTCATGGTGGTTCCACTAGGGGTCGACGCC

CCCTCGTGAAAAGACAAGAAAATGGGGTGGCTTCCTTTCCATCTATGGGTGAAGCAGATG 780
GGGAGCACTTTTCTTTCTTTTACCCACCGAAGGAAAGGTAGATACCCACTTCGTCTAC

CATGGTGAGGGTCAGCTCAGCGACTAGAAATTTAAAAATGGGAGATCATGGTGAATTCCT 840
GTACCACTCCCAGTCGAGTCGCTGATCTTTAAATTTTTACCCTCTAGTACCACTTAAGGA

GCAGCCCAGGGGATCCACTANTTTTAAANAAGCNCGCCAC 880
CGTCGGGCCCCCTAGGTGATNAAAATTTNTTCGNGCGGTG

Freundliche Überlassung von PD Dr. med. Roland Werner Pfäffle

Anhang 2: Tabellen

Lebensalter	Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) ng/ml		Insulin-like growth I (IGF-1) ng/ml	
	0-1 Woche	770	(420-1390)	36
1-4 Wochen	1290	(770-2090)		
1-3 Monate	1480	(870-2540)		
3-6 Monate	1610	(980-2640)		
6-12 Monate	1720	(1070-2760)	56	(17-95)
1-3 Jahre	2050	(1410-2970)	67	(25-146)
3-5 Jahre	2250	(1520-3320)	96	(39-194)
5-7 Jahre	2440	(1660-3590)	116	(54-220)
7-9 Jahre	2630	(1820-3800)	137	(71-237)
9-11 Jahre	3010	(2120-4260)	183	(94-330)
11-13 Jahre	3300	(2220-4890)	275	(148-495)
13-15 Jahre	3480	(2310-5240)	319	(185-540)
15-17 Jahre	3390	(2330-4950)	265	(145-460)
20-30 Jahre	3290	(2200-4930)	195	(110-247)

Anhang 2.1: Altersspezifische Normwerte für IGF-I und IGFBP-3 im Serum

(aus Pädiatrie, Grundlagen und Praxis; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 2001)

Alter	Norm (ng/ml)
Postpubertär	0-8
Präpubertär	1-10
Neugeborene	14-40
Nabelschnurblut	10-50

Anhang 2.2: Altersspezifische Normwerte für hGH

(aus Lexikon der Labordiagnostik, 2004, Dr. med. Olav Hagemann)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. M. B. Ranke danke ich für die freundliche Überlassung dieses interessanten Themas und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. G. Binder, der bei allen aufkommenden Fragen und Problemen immer erreichbar war und hilfreich zur Seite stand. Seine wissenschaftliche Kritik und seine freundliche Geduld sind wesentlich an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt.

Allen Mitarbeitern des Hormonlabors, wie auch den Schwestern der endokrinologischen Ambulanz, möchte ich für die nette Unterstützung und Hilfsbereitschaft danken, auch wenn dies den eigenen Arbeitsablauf häufig verzögerte. Mein besonderer Dank gilt hierbei Frau Christina Urban, die häufig auch zu ungewöhnlichen Zeiten erschien, um unterstützend wirken zu können.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Doktoranden und Mitstreitern des Hormonlabors, insbesondere bei Frau Dr. med. Konstantina Mavridou-Lönne, die immer bereit war, ihre Arbeits- und Lebenserfahrung mit mir zu teilen.

Ausserdem danke ich meinen Eltern Ioakim und Dimitra Tsirpouchtsidis, die mich fortwährend unterstützen, und meinem Bruder Dr. rer. nat. Anastasios Tsirpouchtsidis, der mir wohl immer ein Vorbild sein wird.

Ganz besonders dankbar bin ich meinem Mann, Klaudius Schywalsky, der durch sein Verständnis und seine liebevolle Geduld das Gelingen dieser Arbeit erst ermöglichte.

Curriculum vitae

ANGABEN ZUR PERSON

Name: Schywalsky, Sofia, geb. Tsirpouchtsidou
geboren: 03.07.1974 in Sindelfingen
Familienstand: verheiratet
Nationalität: griechisch

SCHULBILDUNG

1981-1985 Grundschole Sindelfingen
1985-1994 Unterrieden Gymnasium Sindelfingen, Abschluss: Abitur
1981-1990 paralleler Besuch der griechischen Schule

MEDIZINISCHE AUSBILDUNG

Okt 1994-Mai 2001 Studium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Ärztliche Vorprüfung: 9/1996
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 9/1997
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 3/2000
Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 8/5/2001

April 2000-März 2001 Praktisches Jahr
1. Tertial: Chirurgie Krankenhaus Sindelfingen
2. Tertial: Pädiatrie Uniklinik Thessaloniki
3. Tertial: Innere Medizin Krankenhaus Sindelfingen

Okt 2001- März 2003 Ärztin im Praktikum: Krankenhaus Bietigheim,
Gastroenterologie
Prof. Walker

Seit April 2003 Assistenzärztin Krankenhaus Bietigheim,
Kardiologie, PD Dr. Wolf

FAMULATUREN

Feb 1997- März 1997 6 Wochen Innere Medizin- Krankenhaus
Sindelfingen

September 1997 3 Wochen Pädiatrie-Kreiskrankenhaus Böblingen

Aug 1998-Okt 1998 5 Wochen Chirurgie-Praxis Dr. Buchmüller

Feb 1999-März 1999 5 Wochen Chirurgie-Uniklinik Thessaloniki

WEITERE PRAKTISCHE TÄTIGKEITEN

Juli 1994-Sept 1994 9 Wochen Krankenpflegepraktikum in Sindelfingen