

**Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
(Department) Tübingen  
Abteilung I  
(Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie)**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger**

**Sektion Pädiatrische Endokrinologie**

**Leiter: Professor Dr. M. B. Ranke**

**Retrospektive Untersuchung von Kindern mit  
hypophysärem Kleinwuchs, welche unter  
Substitutionstherapie eine zentrale Hypothyreose  
entwickelten. Klinischer Verlauf und Bedeutung von  
PROP-1 Defekten**

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

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Julia Maria Erhardt  
aus Tübingen**

**2009**

**Dekan:**

**Professor Dr. I. B. Autenrieth**

**1. Berichterstatter:**

**Professor Dr. G. Binder**

**2. Berichterstatter:**

**Professor Dr. B. Gallwitz**

**„Es gibt aber kaum  
ein beglückenderes Gefühl,  
als zu spüren,  
dass man für andere Menschen  
etwas sein kann.  
Dabei kommt es gar nicht auf die Zahl,  
sondern auf die Intensität an.**

**Schließlich sind menschliche Beziehungen  
doch einfach das Wichtigste im Leben;  
daran kann auch der moderne „Leistungsmensch“  
nichts ändern.“**

**Dietrich Bonhoeffer**

**Brief aus der Haft 1944**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINFÜHRUNG</b>	<b>1</b>
1.1 WACHSTUM	1
1.1.1 Definition von Wachstum	1
1.1.2 Wachstumsgeschwindigkeit	2
1.1.3 Bestimmung von Wachstum	2
1.1.4 Beurteilung von Wachstum	3
1.1.5 Genetische Zielgröße	5
1.1.6 Knochenalterbestimmung	6
1.1.7 Endgrößenvoraussage	7
1.2 REGULATIONSEBENEN FÜR WACHSTUM	8
1.2.1 Endokrinologische Ebene	9
1.2.2 Endogene Ebene	15
1.2.3 Exogene Faktoren	15
1.3 STÖRUNGEN DES WACHSTUMS	15
1.3.1 Kleinwuchs	16
1.3.2 Hochwuchs	20
1.4 PROPHET OF PIT-1 (PROP-1)	21
<b>2. ZIELSETZUNG UND PROBANDEN</b>	<b>26</b>
2.1 ZIELSETZUNG	26
2.2 PROBANDEN	27
2.2.1 Allgemeines	27
2.2.2 Einschlusskriterien	27
2.2.3 Ausschlusskriterien	27
2.2.5 Klinik der Probanden	28
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>30</b>
3.1 MATERIAL	30
3.1.1 Enzyme	30
3.1.2 Geräte	30

3.1.3 Kits	31
3.1.4 Reagenzien	31
3.1.5 Verbrauchsmaterialien	31
3.2 METHODEN	32
3.2.1 Überblick	32
3.2.2 DNA-Extraktion	32
3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion	35
3.2.4 Elektrophorese	38
3.2.6 Konzentrationsbestimmung und Verdünnung	43
3.2.7 Sequenzierung	44
3.2.8 Alignment	44
3.2.9 TA-Cloning	44
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>48</b>
4.1 KLINISCHE EVALUATION	48
4.2 ENDOKRINOLOGISCHE FUNKTIONSTESTS, SPONTANSEKRETION	51
4.3 KERNSPINTOMOGRAPHIE DES SCHÄDELS	55
4.4 ZEREBRALE FEHLBILDUNGEN	56
4.5 BEGLEITERKRANKUNGEN	56
4.6 GENETISCHE ANALYSE VON PROP-1	57
Möglichkeit der Wahl einer ungünstigen Methode	64
Möglichkeit der Wahl eines ungünstigen Kollektivs	65
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>69</b>
ARTIKEL	69
BÜCHER	75
1. DNA-SEQUENZ VON PROP-1	80
2. AS-SEQUENZ DES PROP-1-PROTEINS	81
3. DANKSAGUNG	82
4. LEBENSLAUF	83

# **1. Einführung**

Was bedeutet der Begriff „Wachstum“ im eigentlichen Sinn?

Wie lässt sich Wachstum bestimmen und wodurch ist regelhaftes Wachstum definiert?

Welche Bedingungen auf unterschiedlichen Ebenen, den Ebenen von Hormonen, Genen und Umwelt, können Wachstum beeinflussen?

Und welche Störungen von Wachstum werden letztlich unterschieden?

## **1.1 Wachstum**

### **1.1.1 Definition von Wachstum**

Es handelt sich bei Wachstum um eine Vermehrung und Vergrößerung der Körperzellen mit Zunahme der Knorpel- und Knochensubstanz im Kindes- und Jugendalter, verbunden mit einer Zunahme des Körpergewichts und der Körperlänge.

Ein fehlerfreies Zusammenspiel verschiedener Faktoren wie beispielsweise Liganden (GH und IGF-I), Transkriptionsfaktoren (PROP-1 und PIT-1), Agonisten und Antagonisten (GHRH und Somatostatin) und Rezeptoren (GHRHR [growth hormone releasing hormone receptor] und GHR [growth hormone receptor]), ist grundlegende Voraussetzung für Wachstum sowie Gleichgewicht im Kohlehydrat-, Protein- und Fettstoffwechsel. Die Haupteffekte von Wachstumshormon, Wachstum und Ausreifung von verschiedenen Geweben, darunter Knochen, Knorpel und Skelettmuskulatur, werden von IGF-I vermittelt. Die Gene, welche für die jeweiligen Faktoren kodieren, finden sich in unterschiedlichen Organen, zu denen Hypothalamus, Hypophyse, Leber und Knochen gehören.

### **1.1.2 Wachstumsgeschwindigkeit**

Wachstum ist darüber hinaus ein Vorgang, der zwar kontinuierlich, aber in unterschiedlichen Altersgruppen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit erfolgt.

Ein in Deutschland geborenes Kind deutscher Eltern zum Beispiel wird mit einer Körperlänge von ungefähr 50 cm und einem Körpergewicht von durchschnittlich 3000 bis 3500 g geboren.

Es wächst im ersten Lebensjahr ungefähr 24 cm, im zweiten Lebensjahr noch etwa 9 cm. In den nachfolgenden Jahren wird die jährliche Wachstumsrate stetig abfallen und sich bis zum Erreichen der Pubertät auf circa 5 cm pro Jahr einpendeln.

Die vom sechsten Lebensmonat bis zum dritten Lebensjahr andauernde Wachstumsphase in der frühen Kindheit wird im Infancy-childhood-puberty-Modell des Wachstums (ICP-Modell) als Infancy-Phase bezeichnet. Maßgeblich beeinflusst wird diese Wachstumsphase von der Qualität und Quantität der Ernährung des Kindes.

Vom dritten Lebensjahr an bis zum Eintreten in die Pubertät erfolgt das kindliche Wachstum vor allem in Abhängigkeit von Wachstumshormon.

Mit dem Beginn der Pubertät kommt es zum Einsetzen einer letzten wichtigen Wachstumsphase, des Puberty growth spurt.

Ein vermindertes Wachstum in der Infancy-Phase kann ebenso wie ein verfrühter oder verspäteter Puberty growth spurt Hinweis auf das Vorliegen einer Wachstumsstörung sein.

### **1.1.3 Bestimmung von Wachstum**

Die Bestimmung des Wachstums eines Kindes beinhaltet die Bestimmung von Größe, Gewicht und Kopfumfang.

Die Körperlänge wird bei Neugeborenen, Säuglingen und Kleinkindern, welche noch nicht stehen können, im Liegen gemessen. Kann ein Kind bereits stehen, so kann seine Körpergröße mit Hilfe einer Meßlatte ermittelt werden.

## 1. Einführung

Das Gewicht von Neugeborenen und Säuglingen kann mit einer Säuglingswaage gemessen werden; alternativ kann auch zuerst das Gewicht eines Elternteils bestimmt werden und anschließend sich der Elternteil mit dem Kind gemeinsam auf eine Waage stellen. Die Differenz beider Messwerte ergibt das Gewicht des Kindes. Diese Methode eignet sich besonders auch zur Ermittlung des Gewichtes etwas größerer Kinder, sofern sich diese noch nicht alleine auf eine Waage stellen können.

Der Kopfumfang des Kindes ist beschrieben als der horizontale, über Stirn und Protuberantia occipitalis externa gemessene Umfang des kindlichen Kopfes.

Die Messung sämtlicher auxologischer Parameter sollte möglichst genau erfolgen, daher sollte bei einer Wiederholung dasselbe Messinstrument verwendet werden. Sinnvoll wäre auch eine Durchführung durch denselben Untersucher, was aber im klinischen Alltag oft nicht im Rahmen des Möglichen liegt.

### 1.1.4 Beurteilung von Wachstum

Eine Beurteilung der im Rahmen der körperlichen Untersuchung erhobenen Werte ist nur bei korrekter Übertragung in eine Perzentilenkurve oder ein Somatogramm möglich.

Dabei gilt zu beachten, dass es sich bei der verwendeten Referenzkurve um die für die Population, aus der das Kind stammt, relevante Kurve handelt.

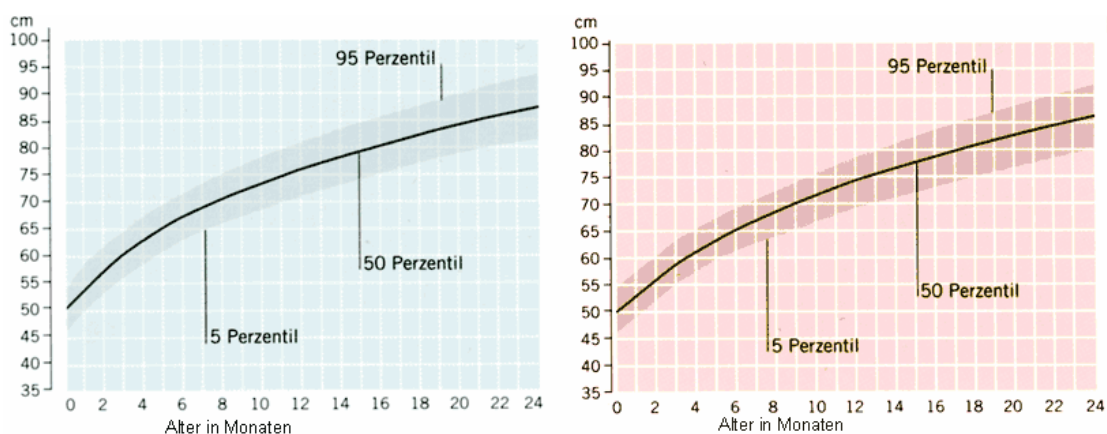


Abb. 1.1 Beispiel für Perzentilenkurven der Körpergröße von Jungen (blau) und Mädchen (rosa)



## 1. Einführung

---

Ergibt beispielsweise die Messung der Körpergröße eines Kindes, dass der ermittelte Wert auf der 60. Perzentile liegt, dann bedeutet dies, dass von 100 Kindern im selben Alter 40 Kinder größer und 60 kleiner als das eben gemessene Kind sind.

Ebenso zur Analyse der erhaltenen Daten herangezogen werden können Standardabweichungen.

Um die Größe von Kindern verschiedenen Alters zu vergleichen, wird deren Körpergröße als Standard deviation score (SDS) berechnet. Dieser ergibt sich aus der Größe des untersuchten Kindes, der durchschnittlichen Größe von Kindern desselben Alters und Geschlechts sowie der dazugehörigen Standardabweichung:

$$\text{SDS} = \frac{\text{Größe in cm} - \text{Durchschnittsgröße in cm}}{\text{Standardabweichung in cm}}$$

Eine Körpergröße, welche unter der 3. Perzentile liegt und somit ein Hinweis auf Minderwuchs ist, sollte ebenso Anlass zu weiterführenden Untersuchungen sein wie eine Körpergröße über der 97. Perzentile, was wiederum auf Hochwuchs deutet. Eine eingehende Untersuchung sollte auch erfolgen, sofern die Messwerte mehr als 2 SD von der Vergleichspopulation abweichen.

Fällt die Wachstumsrate unter die 25. Perzentile ab oder steigt sie über die 75. Perzentile an, dann erfordern auch diese Befunde eine weitere Abklärung.

Des Weiteren auffällig ist die mangelnde Gewichtszunahme eines Kindes.

Nicht nur die dauerhafte Abweichung der Größe, der Wachstumsgeschwindigkeit und des Körpergewichts eines Kindes, sondern auch das plötzliche Ausbrechen aus einem bis dato gezeigten Trend, also ein Schneiden der Perzentilen, sollten aufmerksam verfolgt werden und letztlich weitere Untersuchungen nach sich ziehen. Dies gilt insbesondere dann, wenn das Kind um mehr als 15 Perzentilenpunkte vom bisherigen Perzentilenkanal abweicht.

Bei allem Nutzen der Perzentilenkurven, Somatogramme und des Standard deviation score im Rahmen der Beurteilung des Wachstums eines Kindes sollte die Interpretation nicht ausschließlich auf diese beschränkt bleiben, sondern immer im Hinblick auf die Entwicklung und letztlich erreichte Größe der Eltern erfolgen.

### **1.1.5 Genetische Zielgröße**

Ein Kind, dessen Körpergröße und Gewicht sich unter der dritten Perzentile befinden, scheint auf den ersten Blick klein, und Nachforschungen über mögliche Ursachen werden notwendig.

Sind dagegen die Eltern des Kindes ebenfalls verhältnismäßig klein, dann scheint das Wachstum des Kindes nicht mehr vermindert, sondern im Hinblick auf die genetische Zielgröße angemessen.

Die genetische Zielgröße ergibt sich aus den, möglichst vom Untersuchenden selbst ermittelten, Größen von Vater und Mutter des Kindes, welche in einem ersten Schritt addiert und anschließend durch 2 dividiert werden.

Handelt es sich um einen Jungen, werden nun 6,5 cm hinzugefügt, handelt es sich dagegen um ein Mädchen, so werden 6,5 cm abgezogen (um dem säkularen Trend gerecht zu werden, ermitteln einige Untersucher heutzutage die genetische Zielgröße, indem sie für Jungen zur mittleren Elterngröße 10,2 cm hinzuaddieren, für Mädchen dagegen 2,6 cm abziehen).

Statistisch gesehen erreichen 90 bis 95 % aller gesunden Kinder eines Elternpaares eine Endgröße, welche innerhalb der auf diese Weise berechneten Zielgröße mit einer möglichen Abweichung von plus oder minus 8 cm (dies entspricht einer Schwankungsbreite von plus oder minus 1,3 SD) liegt.

## 1. Einführung

---

Es gilt also für die genetische Zielgröße von Jungen:

$$\text{Genet. Zielgröße} = \frac{\text{Größe von Vater in cm} + \text{Größe von Mutter in cm}}{2} + 6,5 \text{ cm}$$

Die genetische Zielgröße für Mädchen berechnet sich folglich als:

$$\text{Genet. Zielgröße} = \frac{\text{Größe von Vater in cm} + \text{Größe von Mutter in cm}}{2} - 6,5 \text{ cm}$$

Stellen sich beispielsweise ein Vater mit einer Größe von 184 cm und eine Mutter mit einer Größe von 168 cm in der Sprechstunde vor, so besitzt ein Sohn dieser Eltern eine genetische Zielgröße von 182,5 cm. Die genetische Zielgröße einer Tochter, welche aus dieser Beziehung hervorgeht, liegt dagegen bei 169,5 cm.

### 1.1.6 Knochenalterbestimmung

Die genetische Zielgröße, welche im letzten Punkt erläutert wurde, ermöglicht also anhand der Größe der Eltern die Abschätzung der zu erwartenden Größe des Kindes.

Eine Möglichkeit, eine Aussage über die prospektive Zielgröße, sprich das noch zu erfolgende Wachstum eines Kindes zu treffen, und dies unabhängig der Kenntnis der Größe von Vater und Mutter, stellt die Bestimmung des Knochenalters dar.

Eine standardisierte Röntgenaufnahme von linker Hand und linkem Handgelenk kann hierfür unter Benutzung von Referenztabellen zur Endlängenvoraussage genutzt werden, sofern die Knochenreifung älter als 8 Jahre ist.

Heutzutage sind zwei Methoden zur Knochenalterbestimmung üblich. Zum einen die Methode nach Greulich und Pyle, bei der die Röntgenaufnahme des

Kindes in ihrem Gesamterscheinungsbild mit Referenzröntgenbildern im Greulich- und Pyle-Atlas verglichen wird. Das Knochenalter derjenigen Aufnahme, die dem Röntgenbild des Kindes am ähnlichsten sieht, wird dabei ausgewählt und der Aufnahme des Kindes zugeordnet.

Eine weitere, wenn auch kompliziertere Methode, ist die Methode nach Tanner und Whitehouse. Es werden hierzu 20 Knochen von Hand und Handgelenk einzeln begutachtet und deren Knochenreife nach festgelegten Kriterien mit Punktzahlen versehen. Die Summe aller Punkte ermöglicht abschließend die Berechnung des Knochenalters. Je erfahrener der Untersucher, desto genauer kann die Zuordnung des Knochenalters nach den genannten Methoden erfolgen, dennoch lässt sich eine ausgeprägte Abweichung oft nicht vermeiden.

### **1.1.7 Endgrößenvoraussage**

Um eine Voraussage der Endgröße zu wagen, werden neben dem Knochenalter das chronologische Alter und die individuelle Größe herangezogen. Um die Voraussage noch zu präzisieren, können weitere Informationen wie die Wachstumsgeschwindigkeit und der Eintritt der Menarche berücksichtigt werden.

Zusammenfassend handelt es sich bei Wachstum um einen Prozess, der vor allem im Kindes- und Jugendalter als anhaltender, obgleich nicht zu jedem Zeitpunkt gleichmäßiger Vorgang zu einer Zunahme von Körpergewicht, Körpergröße und Kopfumfang führt. So besitzt ein Neugeborenes beispielsweise einen Kopfumfang, der deutlich über dem Brustumfang liegt. Ein Zustand, der sich beim Erwachsenen nicht mehr nachweisen lässt, schlicht aufgrund der Tatsache, dass im Laufe von Kindheit und Jugend mit Pubertät das Wachstum des Brustkorbes deutlich über dem des Kopfes liegt.

Nicht nur die absolute Zunahme der genannten Parameter, sondern auch die Dynamik, sprich die Wachstumsgeschwindigkeit, ist hierbei von Bedeutung.

Die sorgfältige Ermittlung und Beurteilung der Messwerte, immer im Hinblick auf die genetische Zielgröße eines Kindes, ermöglichen eine Interpretation des kindlichen Wachstumsverhaltens.

Dessen Knochenalter und chronologisches Alter sowie die aktuelle Größe lassen eine Aussage über die zu erwartende Zielgröße zu.

Ebenso wichtig wie die körperliche Untersuchung sind die ausführliche Eigen- und Familienanamnese. Das Wachstum eines Kindes, welches mit einer Geburtsschädigung oder einem Fehlbildungssyndrom geboren wurde, verhält sich in der Regel anders als das Wachstum eines völlig gesunden, termingerecht geborenen Kindes.

## 1.2 Regulationsebenen für Wachstum

Die Kenntnis der verschiedenen Ebenen, welche eine Bedeutung für die Regulation von Wachstum und Entwicklung besitzen, ist Voraussetzung für das Verständnis möglicher Wachstumsstörungen.

Aktivierung oder Suppression wachstumsassoziierter Gene erfolgt auf endokrinologischer Ebene ebenso wie auf endogener und exogener Ebene (Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass eine Trennung der endokrinologischen und endogenen Ebene in der Literatur zwar häufig anzutreffen ist, deren Trennung in der Praxis sich aber oft als schwierig gestaltet. Auch bleibt zu bezweifeln, ob eine klare Unterscheidung zwischen neuronalen, genetischen und hormonellen Faktoren immer möglich ist).

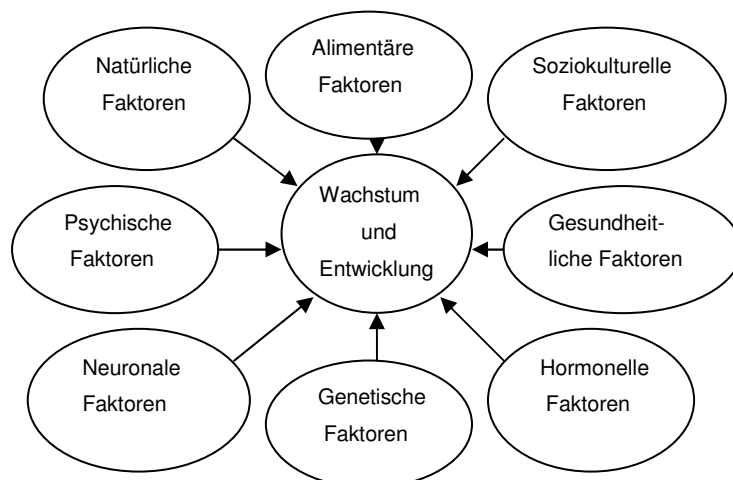


Abb.1.2 Einflussfaktoren von Wachstum und Entwicklung

## 1.2.1 Endokrinologische Ebene

Die endokrinologische Ebene von Wachstum und Entwicklung besitzt zwei Anteile. Einerseits einen zentralnervösen Anteil, repräsentiert durch Hypothalamus und Hypophyse. Andererseits einen peripheren Anteil, welcher den endokrinen Drüsen entspricht. Beide Anteile sind funktionell untrennbar verbunden.

### a. Hypothalamus

Die Freisetzung der hypothalamischen Neuropeptide erfolgt unter Kontrolle übergeordneter zentralnervöser Strukturen. Unter dem Thalamus gelegen handelt es sich beim Hypothalamus um einen Teil des Zwischenhirns. Er enthält wichtige dem VNS übergeordnete Zentren, welche der Koordination von Regulationsvorgängen wie den Wach- und Schlafrhythmus, der Blutdruck- und Atmungsregulation oder dem Wasserhaushalt dienen. Trotz der Bezeichnung als „hypothalamische Neuropeptide“ ist deren Bildung nicht streng auf den Hypothalamus begrenzt. Sie werden beispielsweise auch in einigen außerhalb des ZNS liegenden Organsystemen und von Tumoren gebildet. Auch die Wirkung der hypothalamischen Neuropeptide ist nicht auf ein bestimmtes Organ, ein spezielles Gewebe oder einen Zelltyp beschränkt, mehrere Wirkungen sind jeweils bekannt.

Bezeichnung	Vorkommen	Funktion (Auswahl)
Corticotropin Releasing hormone (CRH)	Hypothalamus, GI-Trakt	ACTH-Freisetzung, Aktivierung des Sympathikus
Gonadotropin Releasing hormone (GnRH)	Hypothalamus, Ovarien	LH- und FSH-Freisetzung
Growth hormone Releasing hormone (GHRH)	Hypothalamus, Tumoren	GH-Freisetzung

## 1. Einführung

---

<b>Bezeichnung</b>	<b>Vorkommen</b>	<b>Funktion (Auswahl)</b>
Somatostatin (SIH)	Hypothalamus, GI-Trakt, Pankreas	Hemmung von GH und zahlreicher cAMP-vermittelter Effekte
Thyreotropin Releasing hormone (TRH)	Hypothalamus, Retina	Freisetzung von TSH, PRL
Dopamin (DA)	Hypothalamus, dopaminerge Neurone	Hemmung von PRL

Tab. 1.1 Beispiele für hypothalamische Neuropeptide

### b. Hypophyse

Die Hypophyse ist ein etwa kirschgroßes endokrines Organ, welches sich in der Sella turcica der knöchernen Schädelbasis befindet. Die Organogenese der Hypophyse wird durch ein komplexes Zusammenspiel diverser hemmender (z.B. Hesx1) und aktivierender (z.B. PROP-1) Transkriptionsfaktoren gesteuert, welche zu einem festgelegten Zeitpunkt der Embryogenese aktiviert oder inaktiviert werden.

Der Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse) entwickelt sich aus der Rathke-Tasche, dem ektodermalen Epithel des Mundhöhlendaches.

Die Adenohypophyse ist über das hypophysäre Pfortadersystem mit dem Zwischenhirn verbunden.

## 1. Einführung

---

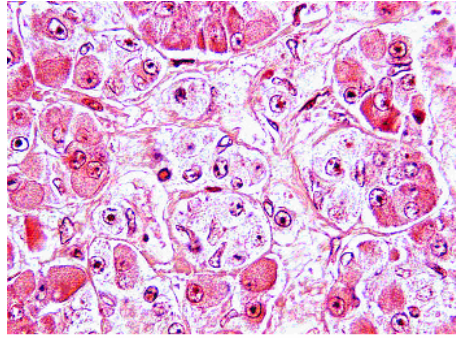


Abb. 1.3 Histologisches Bild von Zellen des Hypophysenvorderlappens

Der Hypophysenhinterlappen (Neurohypophyse) ist entwicklungsgeschichtlich betrachtet eine Ausstülpung des Zwischenhirnbodens, er steht über Nervenfasern mit den Nuclei supraoptici und paraventriculares des Hypothalamus in Verbindung.

Im Rahmen der Entwicklung der Hypophyse kommt es zunächst zu einem Dialog zwischen Rathke-Tasche und Diencephalon, der Induktion.

Gemäß dem Maus-Modell erfolgen im Anschluss an die Induktion Proliferation, Migration und anschließend Differenzierung der diversen Zelltypen der Hypophyse.

Die Expression von PROP-1 beginnt am zehnten Tag der Embryonalentwicklung, zu einem Zeitpunkt, an welchem die Entwicklung der Hypophyse längst eingesetzt hat. Sie ist zunächst auf dorsale Anteile der Hypophyse begrenzt, breitet sich aber allmählich auf die meisten hypophysären Zellen aus. Im Falle einer Mutation in PROP-1 vorliegt, kommt es dagegen am zwölften Tag der Embryonalentwicklung zur Dymorphogenese der Rathke-Tasche. Es tritt eine Störung der Zelllinien auf, welche auch im Rahmen einer PIT-1 Mutation betroffen sind (somatotrophe, thyreotrophe und lactotrophe Zellen). Zusätzlich kommt es zum verzögerten Auftreten gonadotropher Zellen, lediglich die Entwicklung corticotropher Zellen scheint unbeeinflusst (Olson et al. 2003).

Aufgrund des aus der verminderten Zahl gonadotropher Zellen resultierenden Mangels an Gonadotropinen scheinen Ames Zwergmäuse einen sekundären



Hypogonadismus zu entwickeln, welcher sich bei Snell und Jackson Zwergmäusen hingegen nicht zeigt (Pfäffle et al. 1999).

Die Hypophyse setzt sich aus drei Anteilen zusammen und steht über den Hypophysenstiel direkt mit dem Hypothalamus in Kontakt. ACTH, FSH und LH, Prolactin, TSH und GH werden in der Adenohypophyse hergestellt und sezerniert. Mit Ausnahme von Prolactin und GH handelt es sich um glandotrope Hormone, die der Steuerung untergeordneter endokriner Organe dienen.

Die im Hypothalamus gebildeten Hormone Oxytocin und Vasopressin werden in die Neurohypophyse transportiert, dort an Polypeptide gebunden gespeichert und bei Bedarf durch Exozytose freigesetzt.

### c. Wachstumshormon

Das in der Hypophyse gebildete Wachstumshormon ist Bindeglied zwischen zentralnervösem und peripherem Anteil der endokrinologischen Regulations-ebene von Wachstum.

GH ist ein Peptidhormon aus 191 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 22 kDa, welches in den somatotropen Zellen der Hypophyse synthetisiert wird. Auf Chromosom 17 des menschlichen Genoms sind mehrere einander ähnliche GH-Moleküle kodiert, exprimiert wird in der Hypophyse vor allem das 22 kDa GH.

Es besitzt eine ausgeprägte Sequenzhomologie zu Prolactin und zu humanem Plazentalaktogen (HPL).

10 % des im Serum enthaltenen GH entfallen auf das 20 kDa GH-Molekül, welches durch alternatives Splicing entsteht.

Die Transkription des GH-Gens und die Biosynthese von Wachstumshormon werden durch Growth hormone Releasing hormone und Östrogene gefördert. GH wird in den somatotropen Zellen der Hypophyse in 350-500 nm großen Granula gespeichert. Die basale Sekretion von Wachstumshormon erfolgt in Episoden, die nachts häufiger und mit höheren Amplituden auftreten. Für das Auftreten dieser gesteigerten Sekretion scheinen eine gleichzeitige Reduktion

# 1. Einführung

---

von Somatostatin und ein Anstieg von Growth hormone releasing hormone notwendig zu sein.

Bevor WH in die Peripherie sezerniert werden kann, erfolgt die Abspaltung eines Signalpeptides. Die Halbwertszeit von WH im Plasma liegt bei ungefähr 20 Minuten, etwa die Hälfte des zirkulierenden WH liegt in gebundener Form vor. Bei dem Bindungsprotein handelt es sich um den löslichen, extrazellulären Anteil des WH-Rezeptors.

In der Peripherie bindet ein WH-Molekül zunächst an einen Wachstumshormonrezeptor (GHR), welcher hierdurch eine Konformationsänderung erfährt und mit einem weiteren GHR-Molekül dimerisiert. Die Signaltransduktion erfolgt durch das an ein GHR-Dimer gebundenes WH sowie eine assoziierte Tyrosinkinase. Die durch WH vermittelten Effekte variieren je nach dem Gewebe, in welchem der GHR lokalisiert ist.

Zahlreiche Faktoren beeinflussen die Freisetzung von WH. Darunter befinden sich Growth hormone Releasing hormone und Somatostatin, Thyreotropin Releasing hormone, das Katecholamin Dopamin, die Wachstumsfaktoren IGF-I und IGF-II sowie die stoffwechselaktiven Faktoren Glukose, Amino- (AS) und Fettsäuren (FS).

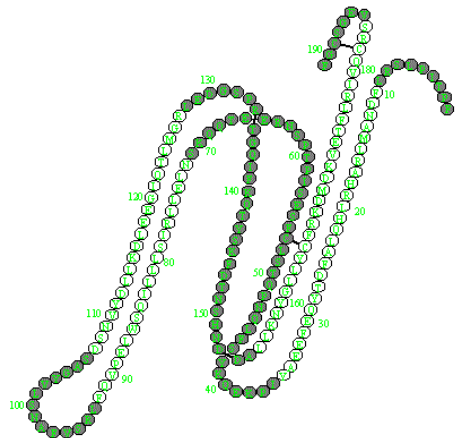


Abb. 1.4 Rekombinant durch E. coli hergestelltes Wachstumshormon

WH ist ein anaboles Hormon, es steigert die Aufnahme von AS in die Zellen und somit die Proteinsynthese. Es wirkt lipolytisch, die freigesetzten FS dienen

# 1. Einführung

als Energieträger für den Aufbau von Polypeptiden. Die Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel ist bimodal. Zum einen werden insulinähnliche Effekte beobachtet, zum anderen fördert WH die Glukoneogenese und wirkt damit dem Insulin entgegen.

In der Leber stimuliert WH die Bildung von IGF-I, welches zusammen mit WH das Längenwachstum des Knochens bewirkt.

WH fördert außerdem die Größenzunahme von Weichteilen und Muskulatur.

Humanes Wachstumshormon besitzt im Gegensatz zu anderen Proteohormonen eine deutliche Speziespezifität. Die Therapie von WH-Mangelzuständen erfolgte deswegen zunächst mit Präparaten, welche aus menschlichen Hypophysen extrahiertes WH enthielten. Seit 1988 steht gentechnisch hergestelltes humanes Wachstumshormon zur Verfügung.

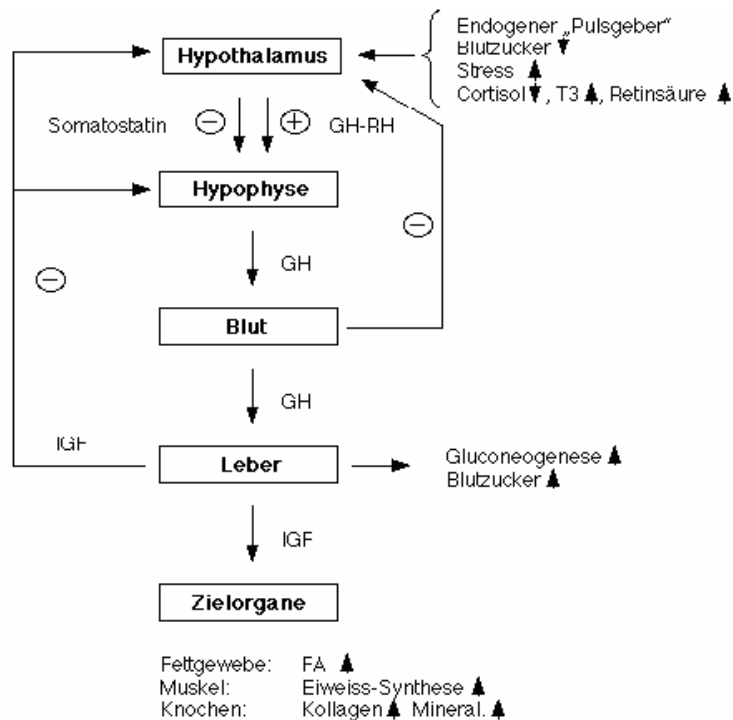


Abb. 1.5 Wachstumshormon-Regelkreis

### **1.2.2 Endogene Ebene**

Genetische Faktoren besitzen ebenso einen Einfluss auf Wachstum und Entwicklung wie zahlreiche neuronale Faktoren.

Die endogene Ebene beinhaltet sämtliche von den Eltern vererbte Anlagen und das daraus resultierende individuelle Potential für Wachstum.

### **1.2.3 Exogene Faktoren**

Das Feld der exogenen Faktoren, welche eine bedeutende Rolle für Wachstum und Entwicklung spielen, ist weit. Es beinhaltet Faktoren, welche das natürliche und soziokulturelle Umfeld prägen ebenso wie alimentäre und hygienische Gegebenheiten. Im Idealfall ergibt sich hieraus die Möglichkeit einer optimalen Entwicklung bei guter Ernährung und in Gesundheit.

Abschließend betrachtet ist Wachstum ein multifaktorielles Geschehen, welches einer Regulation auf unterschiedlichen Ebenen unterliegt. Jede Ebene für sich kann wiederum Ausgangspunkt für Störungen sein.

## **1.3 Störungen des Wachstums**

Wachstumsstörungen im Kindesalter, Kleinwuchs oder seltener Hochwuchs, gehören zu den häufigsten Symptomen, die zu einem Arztbesuch führen.

Die Folgen für Eltern und Kind in psychosozialer und physischer Hinsicht sind weit reichend.

Glücklicherweise sind Pathogenese und Pathophysiologie vieler Störungen, welche mit Klein- oder Hochwuchs einhergehen, heute bekannt. Darüber hinaus besteht häufig die Möglichkeit einer rationalen Diagnostik und Therapie.

Störungen von Wachstum und Entwicklung eines Kindes können durch Störungen auf verschiedenen Ebenen bedingt sein.

### 1.3.1 Kleinwuchs

a. Primärer Kleinwuchs

Ursächlich für einen primären Kleinwuchs sind Störungen des Skelettwachstums aufgrund eines genetischen Defekts oder einer pränatalen Störung. Derartige Kleinwuchsformen sind häufig bereits von Geburt an vorhanden und phänotypisch ausgeprägt. Es besteht des Weiteren auch die Möglichkeit einer postpartalen Manifestation.

Aufgrund des reduzierten Knochenwachstums kann eine normale Erwachsenengröße auch unter angemessener Therapie häufig nicht erreicht werden.

Ursachen	Merkmale/Beispiele
Familiärer Kleinwuchs	Eingeschränktes genetisches Potential, keine pathologischen Stoffwechselprozesse oder biochemischen Defekte
Skelettdysplasien	Angeborener Stoffwechseldefekt, abnorme biochemische oder histologische Befunde, z.B. Achondroplasie
Chromosomale Aberrationen	Häufige Ursache für Wachstumsstörungen, z.B. Deletion Chr. 5, Deletion 15q, Trisomie 15,18, 21, Monosomie X
Stoffwechseldefekte	z.B. Glykogenspeicherkrankheiten, konnataler DM, lysosomale Speicherkrankheiten
Intrauteriner Kleinwuchs (IUGR)	Charakterisiert durch ein reduziertes Geburtsgewicht bei z.B. pränatalen Infektionen durch HSV, Exposition des Ungeborenen gegenüber toxischen Substanzen wie Alkohol, fetaler Mangelversorgung bei plazentarer Infarzierung, maternale Erkrankungen wie bspw. EPH-Gestose
Syndrome mit primärem Kleinwuchs	z.B. Russell-Silver-Syndrom, Noonan-Syndrom

Tab. 1.2 Ursachen primären Minderwuchses

## 1. Einführung

---

### b. Sekundärer Kleinwuchs

Sekundäre Kleinwuchsformen entsprechen einer Störung des Skelettwachstums aufgrund extraossärer Ursachen, wie zum Beispiel chronische Organkrankheiten, psychosoziale Probleme, angeborene Stoffwechselerkrankungen oder endokrine Störungen.

Eine weitere Ursache für sekundären Kleinwuchs und zugleich die häufigste Wachstumsstörung ist die konstitutionelle Entwicklungsverzögerung (KEV).

Gemeinsam mit dem familiären Kleinwuchs entfallen ungefähr 50% aller Kleinwuchsformen auf die KEV.

Kinder mit sekundärem Kleinwuchs können eine normale Erwachsenengröße erreichen. Bei der KEV geschieht dies meist ohne Therapie. Bei den übrigen Formen des sekundären Kleinwuchses ist eine adäquate Therapie erforderlich.

<b>Ursachen</b>	<b>Merkmale/Beispiele</b>
Konstitutionelle Entwicklungsverzögerung (KEV)	Häufigste Wachstumsstörung, gekennzeichnet durch <ul style="list-style-type: none"><li>• retardiertes Knochenalter</li><li>• familiäre Häufung</li><li>• verspäteten Pubertätseintritt</li></ul>
Mangel- und Unterernährung	Häufigste Ursache für Mindergröße weltweit, führen zu Hemmung der WH-IGF-Achse
GI-Störungen	z.B. chronisches Erbrechen, chronische Diarrhoe, Zöliakie, M. Crohn
Nierenerkrankungen	z.B. chronische Niereninsuffizienz
Kardiovaskuläre Störungen	z.B. angeborene Herzfehler
Lungenerkrankungen	z.B. Asthma bronchiale, Mukoviszidose

## 1. Einführung

---

<b>Ursachen</b>	<b>Merkmale/Beispiele</b>
Psychosoziale Störungen (Deprivation)	Trias aus <ul style="list-style-type: none"><li>• auffälligem Verhalten</li><li>• gestörter sozialer Interaktion</li><li>• vorübergehendem WH-Mangel</li></ul> Aufholwachstum nach Wechsel des sozialen Umfeldes
Stoffwechselstörungen	Bei diabetischen Kindern mit schlecht eingestellter Stoffwechsellage
Chronische Infektionen	z.B. Agammaglobulinämie, chronische Granulomatose, Schistosomiasis
Medikamente und ZNS- Bestrahlung	z.B. Zytostatika, Glukokortikoide, Bestrahlung im Rahmen maligner Erkrankungen
Hämatopoetische Erkrankun- gen	z.B. Anämien wie die Sichelzellanämie oder Fanconi-Anämie, konnatale Granulozytopenien wie das Kostman- oder Shwachman-Syndrom
Endokrine Erkrankungen	z.B. WH-Mangel, WH-Rezeptor-Defekt, erworbene WH-Resistenz, Störung von Schilddrüsenfunktion oder Pubertätsentwicklung, Cushing-Syndrom

Tab. 1.3 Ursachen sekundären Minderwuchses

Die Häufigkeit, mit welcher ein Wachstumshormonmangel auftritt, wird auf 1:4000 bis 1:10000 geschätzt. In den meisten Fällen handelt es sich um einen isolierten WH-Mangel unklarer Genese (65 %). Organische Ursachen, wie beispielsweise Tumoren des Hypothalamus oder der Hypophyse, liegen in rund 22 % aller Fälle eines Wachstumshormonmangels vor.

## 1. Einführung

---

Je nach Studienlage tritt in 3 bis 30 % eine familiäre Häufung von Wachstumshormonmangel auf. Daher wird für einen signifikanten Anteil der Fälle eine genetische Ursache angenommen.

Verschiedene genetische Ursachen können einem Wachstumshormonmangel zugrunde liegen. Hierzu zählen Defekte des WH-Gens selbst, des Gens für den Wachstumshormonrezeptor sowie des Rezeptors für GHRH, außerdem Defekte in Genen, welche für die hypophysären Transkriptionsfaktoren PROP-1 und PIT-1 kodieren.

	<b>Vererbungsmodus</b>	<b>Ursache</b>
<b>Isolierter WH-Mangel Typ IA</b>	Autosomal-rezessiv	Defekt im WH-Gen
<b>Isolierter WH-Mangel Typ IB</b>	Autosomal-rezessiv	Defekt im WH-Gen
<b>Isolierter WH-Mangel Typ II</b>	Autosomal-dominant	Defekt im WH-Gen
<b>Isolierter WH-Mangel Typ III</b>	X-chromosomal	Defekt im WH-Gen
<b>Bioinaktives WH</b>	Erblichkeit wird angenommen, kein Hinweis auf speziellen Modus	Defekt im WH-Gen
<b>Laron-Syndrom</b>	Autosomal-rezessiv	Defekt im GHR-Gen
<b>GHRHR-Defekte</b>	Autosomal-rezessiv	Defekt im GHRHR-Gen
<b>CPHD bei PIT-1 Mutation</b>	Autosomal-dominant/ Autosomal-rezessiv	Defekt im PIT-1-Gen
<b>CPHD bei PROP-1 Mutation</b>	Autosomal-rezessiv	Defekt im PROP-1-Gen

Tab. 1.4 Genetische Ursachen für Wachstumshormonmangel (nach Cogan et al. 1998)



## 1.3.2 Hochwuchs

### a. Primärer Hochwuchs

Ein primärer Hochwuchs ist bedingt durch eine primäre Störung des Skelettsystems aufgrund eines genetischen Defekts oder einer pränatalen Störung. Eine klinische Ausprägung ist oft schon bei oder kurz nach Geburt gegeben.

Ursachen	Merkmale/Beispiele
Familiärer Hochwuchs	<ul style="list-style-type: none"><li>• Größe des Kindes mehr als zwei Standardabweichungen über dem Normbereich bzw. über der 97. Perzentile</li><li>• Fehlen von Dysmorphiezeichen oder klinischen Zeichen einer Stoffwechselerkrankung</li><li>• Nachweis bei mind. einem Verwandten ersten Grades</li></ul>
Syndrome mit primärem Hochwuchs	z.B. Sotos-, Weaver-, Wiedemann-Beckwith-, Klinefelter-Syndrom
Stoffwechselstörungen	z.B. Homocystinurie, Marfan-Syndrom

Tab.1.5 Ursachen primären Hochwuchses

### b. Sekundärer Hochwuchs

Auslöser sekundärer Hochwuchsformen sind extraossäre Faktoren. Ebenso kann eine konstitutionelle Entwicklungsbeschleunigung vorliegen. Sie führt zu einer normalen Erwachsenengröße.

## 1. Einführung

Ursachen	Merkmale/Beispiele
Konstitutionelle Entwicklungsbeschleunigung	Typischerweise akzeleriertes Knochenalter bei frühnormaler Pubertätsentwicklung, Erreichen einer normalen Erwachsenengröße
Endokrine Erkrankungen	z.B. Hyperthyreose, hypophysärer Hochwuchs (extrem selten), Pubertas praecox, AGS (in letzten beiden Fällen verminderte Erwachsenengröße)
Alimentärer Hochwuchs	Hochwuchs aufgrund alimentärer Adipositas

Tab. 1.6 Ursachen sekundären Hochwuchses

### 1.4 Prophet of PIT-1 (PROP-1)

Es handelt sich bei PROP-1 um einen „paired-like homeodomain“ Transkriptionsfaktor, welcher speziell in der Hypophyse exprimiert wird. Das Gen, welches für PROP-1 kodiert, befindet sich beim Menschen auf dem langen Arm von Chromosom 5 (Rosenfeld und Wu, 1998). Es besitzt drei Exons, welche 681 Basenpaare enthalten und für 227 Aminosäuren kodieren.

PROP-1 besitzt zum einen die Fähigkeit DNA zu binden, zum anderen die Fähigkeit die Transkription zu aktivieren.

Die mRNA von PROP-1 wird in der Hypophyse exprimiert, noch bevor es zur Expression der mRNA von PIT-1 („Pituitary-specific transcription factor-1“) kommt (daher rührt auch die Bezeichnung als „Prophet of PIT-1“).

PROP-1 und PIT-1 spielen eine bedeutende Rolle im Rahmen der Organogenese der Hypophyse. Dies gilt nicht nur für die menschliche Hypophyse, sondern es wird angenommen, dass dies für die Hypophyse sämtlicher Säugetiere gelten könnte (Pfäffle et al. 1999). Ein Defekt im Genlokus von PROP-1 auf Chromosom 11 bei Mäusen beispielsweise, welche als Ames Zwergmäuse bezeichnet werden, führt zu einer hypoplastischen Hypophyse ähnlich jener bei den Snell und Jackson Zwergmäusen (Buchwalter et al. 1991). Letztere wiederum weisen eine Mutation im Lokus von PIT-1 auf.

Die Unterschiede, welche sich im Phänotyp finden, sind gering, aber bedeutend. Bereits 1997 wurde von Pfäffle et al. die Vermutung aufgestellt, es könnte sich bei Mutationen in PROP-1 um eine weitere mögliche Ursache für eine CPHD handeln. Dies sei vor allem zutreffend für den Fall des Vorliegens eines zu einer Mutation in PIT-1 passenden Phänotyps, in welchem jedoch kein Mutationsnachweis in PIT-1 gelänge.

Die Mutation in PROP-1 bei Ames Zwergmäusen führt zu einem ähnlichen Phänotyp wie PIT-1-Mutationen bei Snell und Jackson Zwergmäusen, allerdings sind zusätzlich gonadotrophe Zellen betroffen (Valette et al. 1999).

Rodriguez et al. schreiben 2003, dass es sich bei Mutationen in PROP-1 häufiger als bei PIT-1-Mutationen um die Ursache einer CPHD handele.

Deladoëy et al. geben in einer Studie aus dem Jahr 1999 eine Prävalenz von 48 % für einen Defekt in PROP-1 bei kombinierten Ausfällen der Hypophyse an (35 von 73 Betroffenen insgesamt), wobei unter nicht verwandten Probanden die Prävalenz bei 32 % liegt.

Es muss allerdings erwähnt werden, dass im Rahmen sporadischer Fälle von CPHD insgesamt nur selten Mutationen in PROP-1 vorliegen (Rainbow et al. 2005, Turton et al. 2005).

Im Gegensatz zu den Snell Zwergmäusen, deren Hypophyse durch das vollständige Fehlen somatotropher, thyreotropher und lactotropher Zellen gekennzeichnet ist, finden sich bei den Ames Zwergmäusen zwischen 0,001 % (Andersen et al. 1995) und 1 % (Gage et al. 1996) der gewöhnlichen Anzahl somatotropher Zellen, darüber hinaus einige lactotrophe und thyreotrophe Zellen (Gage et al. 1996). Da bei Mutation in PROP-1 der Nachweis von PIT-1 zu einem späteren Zeitpunkt der Ontogenese nicht möglich ist, wird angenommen, die Mutation, welche den Phänotyp der Ames Zwergmäuse bedingt, müsse einen Einfluss auf die Expression von PIT-1 besitzen (Andersen et al. 1995).

Das die Veränderungen verursachende Gen, welches PROP-1 getauft wurde (Sornson et al. 1996), konnte mittels genetischer Analyse polymorpher Marker auf Chromosom 11 von rückgekreuzten Ames Zwergmäusen ermittelt werden.

Mutationen in PROP-1 und PIT-1 zählen zu den häufigsten monogenetischen Ursachen für kombinierte Ausfälle hypophysärer Hormone (Salemi et al., 2003).

Die Expression von PROP-1 findet in einer gesunden Hypophyse zeitlebens statt und kann mittels RT-PCR auch in Adenomen der Hypophyse nachgewiesen werden. Dennoch können Veränderungen in PROP-1 nicht als häufige Ursache für die Entstehung hypophysärer Tumore gewertet werden (Nakamura et al., 1999).

Erstmals im Februar 1998 wurde von Wu et al. ein Artikel veröffentlicht, welcher Mutationen von PROP-1 als eine der Ursachen einer kombinierten Insuffizienz der Hypophyse (CPHD) beim Menschen beschrieb. Bereits zwei Jahre zuvor war von Sornson et al. PROP-1 bei der Maus isoliert worden.

Eine kombinierte hypophysäre Insuffizienz beinhaltet eine verringerte GH-Produktion und eine verminderte Produktion mindestens eines weiteren der Hormone der Adenohypophyse. Sie manifestiert sich bei PROP-1-Defekten bereits zum Zeitpunkt der Organogenese des Hypophysenvorderlappens. Betroffen sind dabei zu einem frühen Zeitpunkt häufig GH, TSH, Prolactin und die Gonadotropine LH und FSH. Auch eine unzureichende hypophysäre Sekretion von ACTH, obgleich mit deutlicher Verzögerung, ist möglich.

Gemäß des Artikels von Wu et al. seien Mutationen in der Gensequenz des hypophysären Transkriptionsfaktors POU1F1 (dem menschlichen Äquivalent zu PIT-1 bei der Maus) verantwortlich für einen Mangel an PRL, GH und TSH. Die Produktion von ACTH, LH und FSH dagegen sei unbeeinträchtigt. Veränderungen der Gensequenz von PROP-1, dessen mRNA in der sich entwickelnden Hypophyse exprimiert wird noch bevor es zur Expressierung der mRNA von POU1F1 kommt, würden auch zu einem Mangel an LH und FSH führen. Daraus ergebe sich, dass ein spontaner Pubertätsbeginn bei Vorhandensein einer Mutation in PROP-1 nicht möglich sei.

Die Arbeitsgruppe um Wu stellt vier Familien vor, die inaktivierende homozygote oder compound heterozygote Mutationen von PROP-1 aufweisen. Das Produkt, welches durch das veränderte PROP-1-Gen kodiert wird, weist eine

## 1. Einführung

verringerte DNA-Bindungsfähigkeit sowie eine verminderte Fähigkeit zur Aktivierung der Transkription auf. Drei unterschiedliche Mutationen wurden in den vier Familien gefunden:

Mutation	Folge
Arg120Cys, homozygot	AS 52 Cystein statt Arginin
Del301AG, homozygot	Frameshift-Mutation, beginnend in Codon 101, endend mit verfrühter Termination in Codon 109
Del301AG/Phe117Ile, compound heterozygot	Frameshift-Mutation, beginnend in Codon 101, endend mit verfrühter Termination in Codon 109, in Kombination mit AS 50 Isoleucin statt Phenylalanin

Tab. 1.7 PROP-1-Mutationen (nach Wu et al.)

Inzwischen sind insgesamt dreizehn Veränderungen im Bereich des „Hot spot“ PROP-1 bekannt, die zu einem kombinierten Ausfall hypophysärer Hormone führen können. Auf die Deletion der Nukleotide Adenosin und Guanosin auf Position 301 und 302 entfallen dabei etwas mehr als die Hälfte aller Mutationen aufweisenden Allele von PROP-1 (Cogan et al. 1998).

Mutation	Erstbeschreiber
Arg120Cys homozygot	Wu et al., 1998
2-BP Del 301AG homozygot	Wu et al., 1998
Phe117Ile + 2-BP Del 301AG compound heterozygot	Wu et al., 1998
2-BP Del 149GA + 2-BP Del 296GA compound heterozygot	Fofanova et al., 1998
2-BP Del 296GA homozygot	Fofanova et al., 1998

## 1. Einführung

Mutation		Erstbeschreiber
Arg73Cys	homozygot	Duquesnoy et al., 1998
13-BP Del NT112	homozygot	Agarwal et al., 2000
Phe88Ser	homozygot	Osorio et al., 2000
1-BP Del 150 + 2-BP Del 301AG	compound heterozygot	Riepe et al., 2001
Arg73His	homozygot	Valette-Kasic et al., 2001
Arg99Ter + Arg73Cys	compound heterozygot	Valette-Kasic et al., 2001
Arg99Glu	homozygot	Vieira et al., 2003
Trp194Ter	homozygot	Reyraud et al., 2005

Tab. 1.8 PROP-1-Mutationen und deren Erstbeschreiber

Das klinische Bild, mit welchem sich Patienten mit PROP-1-Mutationen in Kindheit oder Adoleszenz präsentieren, ist äußerst variabel (Arroyo et al. 2002, Deladoëy et al. 1999, Pfäffle et al. 1999). Dies betrifft sowohl den Zeitpunkt der Manifestation der Insuffizienz, als auch das jeweilige klinische Bild im Sinne der individuell betroffenen hypophysären Achsen, welches durch die diversen Mutationen in PROP-1 verursacht wird. Auch im Falle einer familiären CPHD durch PROP-1-Mutationen zeigen betroffene Familienmitglieder mit derselben Mutation variable Phänotypen (Pavel et al. 2003). Eine Assoziation zwischen einer bestimmten Form der PROP-1-Mutation sowie einem bestimmten klinischen Bild besteht nicht (Pfäffle et al. 1999).

Deutlich wird diese Variabilität vor allem im Vergleich zu Patienten mit Mutationen in PIT-1, welche sich mehr oder weniger einheitlich mit WH-, TSH- und PRL-Mangel manifestieren (Pfäffle et al. 2002).

## **2. Zielsetzung und Probanden**

### **2.1 Zielsetzung**

Zahlreiche Patienten endokrinologischer Sprechstunden werden aufgrund eines Minderwuchses behandelt. Sofern es sich hierbei ursächlich um einen Mangel an Wachstumshormon handelt, kann dieser seit dem Jahr 1988 mit rekombinant hergestelltem Wachstumshormon behandelt werden.

Bei einigen dieser Patienten ist es möglich, aufgrund der vorliegenden Klinik und anschließender Gensequenzierung die Diagnose einer „PROP-1-Mutation“ zu stellen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit liegt in der Beantwortung der Fragestellung, ob Kinder, welche aufgrund eines isolierten Wachstumshormonmangels einer Substitutionstherapie mit Wachstumshormon unterzogen werden, und welche unter dieser Therapie eine zentrale Hypothyreose entwickeln, möglicherweise einen PROP-1-Defekt als monogenetische Ursache besitzen?

Um diese Fragestellung angemessen zu bearbeiten werden im Rahmen einer retrospektiven klinischen Studie zunächst, unter Einhaltung definierter Ein- und Ausschlusskriterien, Patienten mit dem klinischen Bild einer PROP-1-Mutation erfasst, welche aufgrund eines isolierten WH-Mangels einer Substitution mit WH unterzogen wurden und unter dieser Substitutionstherapie einen Mangel an TSH entwickelten. Ergänzend werden auch diejenigen Patienten berücksichtigt, welche zum Diagnosezeitpunkt zusätzlich zum Mangel an Wachstumshormon einen TSH-Mangel aufwiesen.

Anschließend soll eine Sequenzierung der drei Exons von PROP-1 zeigen, ob die vermutete Mutation bei den Probanden tatsächlich vorhanden ist.

### 2.2 Probanden

#### 2.2.1 Allgemeines

Basierend auf den vor Beginn der Studie festgelegten Ein- und Ausschlusskriterien wurden 43 geeignete Probanden ausgewählt. Es konnten Blutproben von 31 der 43 Probanden gewonnen werden. Bei den 31 Probanden PR 1 bis PR 38 (PR 20 und 21 sowie PR 19 und 37, jeweils Geschwisterpaare, zusätzlich PR 30 und PR 35 wurden nachträglich aus der Studie ausgeschlossen), deren Blutproben ausführlich untersucht wurden, handelt sich überwiegend um Patienten der endokrinologischen Sprechstunde der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Unter den Probanden befinden sich ein Geschwisterpaar (PR 5 und PR 6).

Bei den übrigen Probanden ist keine Verwandtschaft bekannt.

#### 2.2.2 Einschlusskriterien

Die Probanden wurden aus den Patienten der pädiatrischen Endokrinologie anhand folgender Einschlusskriterien ausgewählt:

- I. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung der Hypophyseninsuffizienz isolierter WH-Mangel oder kombinierter Mangel an WH und TSH
- II. Bei Vorliegen eines isolierten WH-Mangels zum Diagnosezeitpunkt der Hypophyseninsuffizienz Auftreten eines TSH-Mangels vor dem vollendeten achtzehnten Lebensjahr

#### 2.2.3 Ausschlusskriterien

Zu einem Ausschluss führten dagegen:

- A. Zusätzliche hypophysäre Ausfälle bei Diagnosestellung (ACTH, LH, FSH, ADH)
- B. Alle sekundären Formen der Hypophyseninsuffizienz (Z.n. zerebralem Tumor wie beispielsweise Kraniopharyngeom, Z.n. Bestrahlung, Z.n. Chemotherapie, chronische Systemerkrankungen wie z.B. eine Thalassämia major)



### 2.2.4 Definition von WH- und TSH-Mangel

Als WH-Mangel definiert wurde eine Erniedrigung des WH-Spiegels in zwei Tests unter 8 ng/ml (Im Falle einer Diagnose vor dem Jahr 1999 liegt ein WH-Mangel aufgrund der hier erfolgten Änderung des Assay-Standards vor bei einer Erniedrigung unter 10 ng/ml).

Ein TSH-Mangel war vorhanden bei pathologisch verändertem T<sub>4</sub>

(T<sub>4</sub> < 6,2 µg/dl bei Ein- bis Zehnjährigen und < 5,1 µg/dl bei Elf- bis Zwanzigjährigen) oder fT<sub>4</sub> (fT<sub>4</sub> < 0,9 ng/dl) sowie ein niedriges, normales oder leicht erhöhtes TSH (TSH < 10 mU/l).

### 2.2.5 Klinik der Probanden

Ursächlich erfolgte die Vorstellung der Probanden dieser Studie bei einem pädiatrischen Endokrinologen aufgrund eines Minderwuchses unterschiedlichen Ausmaßes (zu den möglichen Differentialdiagnosen für Minderwuchs siehe 1.3.1).

Sofern ein vorhandener Minderwuchs auf einem Mangel an Wachstumshormon beruht, zeigt sich dies an verminderten Messwerten für IGF-I und IGFBP-3 sowie einem reduzierten WH-Spitzenwert im Arginin- oder Insulin-Test. Darüber hinaus ist die Wachstumsgeschwindigkeit dieser Kinder reduziert und das Knochenalter, welches sich mittels Handröntgen ermitteln lässt, retardiert. Ebenso besteht die Möglichkeit von Auffälligkeiten in der Bildgebung der Hypophyse.

Ein TSH-Mangel als Ausdruck einer zentralen Hypothyreose tritt nur in extrem seltenen Fällen in isolierter Form auf. Mögliche Ursachen hierfür sind Mutationen im TSH-, TSH-Rezeptor- oder TRH-Gen. Derartige Veränderungen folgen einem autosomal-rezessiven Vererbungsmodus.

Häufiger, obgleich nach wie vor selten, liegen einem TSH-Mangel Hypophysenstörungen globaler Art zugrunde. Diese sind zumeist idiopathisch und gehen in 90 % der Fälle mit Fehlbildungen wie beispielsweise einer Ektopie einher. Bei rund 10 % der Betroffenen findet sich eine normale Morphologie, selten stellt sich eine hypertrophe Hypophyse dar (z.B. im Rahmen einer Mutation in LHX-3 oder -4 beziehungsweise in PROP-1).

## 2. Zielsetzung und Probanden

---

Zum Diagnosezeitpunkt wiesen 28 der Probanden einen isolierten Wachstumshormonmangel auf. Ein kombinierter Mangel an WH- und TSH zeigte sich dagegen bei 15 Probanden.

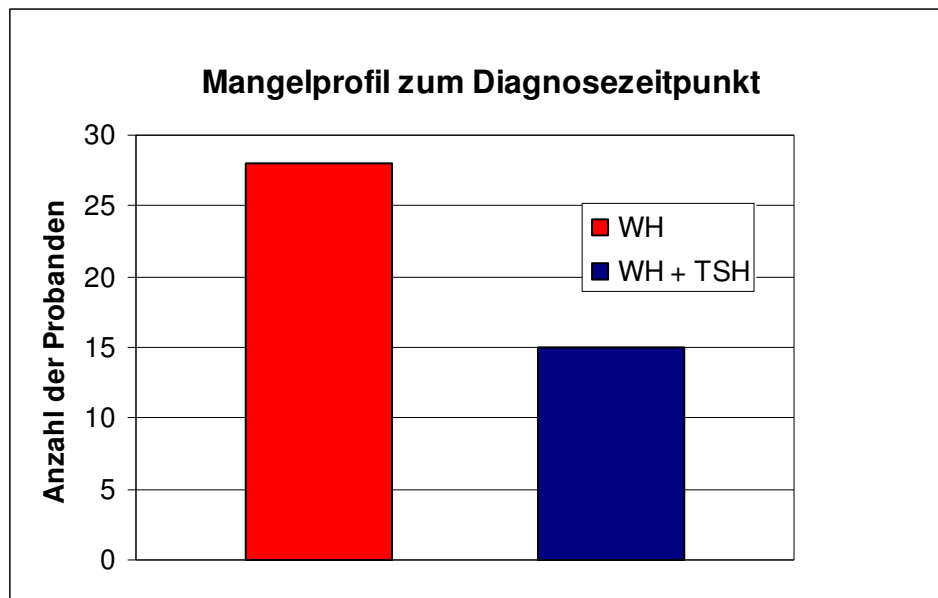


Abb. 2.1 Mangelprofil zum Diagnosezeitpunkt

Ein Mangel an LH, FSH oder ACTH war nicht nachzuweisen.

Symptome, welche als Hinweis auf eine ADH-Insuffizienz gewertet werden könnten, waren bei den Probanden zu keinem Zeitpunkt vorhanden.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Enzyme**

- § Pfu-Polymerase

#### **3.1.2 Geräte**

- § Abzug
- § Computer
- § Drucker
- § Erlenmeyerkolben
- § Gelkammer mit Kamm
- § Kunststoffrahmen für Thermocycler
- § Kunststoffschale
- § Messzylinder
- § Pipette
- § Plexiglasständer für Tubestreifen
- § Quarzglasküvette Helma Präzisionsküvette
- § Schüttelplatte
- § Spannungsgeber „Power Supply“ Power Pac 200 [Bio Rad]
- § Spatel
- § Spektralphotometer GeneQuantII [Pharmacia Biotech]
- § Sterilbank „HERA Safe“ [Heraeus]
- § Styroporwanne
- § Thermocycler Gene Amp PCR System 9700 [PE Applied Biosystems]
- § UV-Platte
- § Videosystem
- § Vortexgerät Vortex-Genie 2 [Scientific Industries]
- § Waage BP 1200 [Sartorius]
- § Wasserbad [Mettler]

- § Zentrifuge - klein: Centrifuge 5415 C [Eppendorf]
- groß: Rolixa 50 RS [Hettich]

#### **3.1.3 Kits**

- § Nucleo Spin<sup>®</sup> Blood XL [Macherey-Nagel]
- § QIAquick PCR Purification Kit [QIAGEN]
- § pGEM<sup>®</sup>-T Easy Cloning Kit [Promega]

#### **3.1.4 Reagenzien**

- § Agarose
- § Aqua dest.
- § Ethanol
- § Ethidiumbromid
- § Ladepuffer
- § 1 kb ladder
- § Primer (PCR und Sequenzierung)
- § Pfu-Puffer
- § Desoxynukleotide (dNTP)
- § Tris Puffer

#### **3.1.5 Verbrauchsmaterialien**

- § Einmalhandschuhe
- § Eisbad
- § Eppendorfcups
- § Klebeband
- § Küvetten
- § Pipettenspitzen
- § PCR-Tubes und Tubedeckel

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Überblick

Insgesamt neun Arbeitsschritte waren von der Blutentnahme bis zum Alignment der drei Exons von PROP-1 notwendig.

Die Blutproben der Probanden wurden in EDTA-Röhrchen abgenommen.

Danach erfolgte mit Hilfe eines NucleoSpin<sup>®</sup> Blood XL-Kits die Isolierung der Erbinformation der Probanden aus deren Leukozyten.

Um die benötigte Menge an DNA zu erhalten, wurde das isolierte genetische Material mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt.

In einem nächsten Schritt konnte anhand einer Gelelektrophorese die Qualität des PCR-Produktes überprüft werden.

Dieser Schritt wurde, nachdem das PCR-Produkt mit einem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt wurde, wiederholt.

Nach der anschließenden Verdünnung wurden sämtliche Proben zur Sequenzierung an den Sequenzierservice der Firma GENterprise versandt.

Abschließend wurde dann, um die einzelnen Proben miteinander vergleichen zu können, ein Alignment durchgeführt, wofür das Programm LI-COR AlignIR genutzt wurde.

#### 3.2.2 DNA-Extraktion

##### A. Beschreibung der Methode

Die Gewinnung der Erbinformation der Probanden aus deren weißen Blutzellen erfolgte unter Einsatz eines Komplettkits.

Dieser Kit ermöglicht die Isolierung genomischer DNA aus Vollblut, kultivierten Zellen, Serum, Plasma oder anderen Körperflüssigkeiten.

### 3. Material und Methoden

---

Die Lyse der Blutzellen wird bei diesem Verfahren durch Inkubieren in einer Lösung mit hohem Gehalt an chaotropischen Ionen und gleichzeitigem Vorhandensein von Proteinase K erreicht.

Durch Zugabe von Ethanol zum Lysat werden geeignete Voraussetzungen für das Binden der DNA an die Silicatmembran der Kolonnen geschaffen.

Der Vorgang des Bindens ist in diesem Fall reversibel, darüber hinaus spezifisch für Nukleinsäuren. Eine gründliche Entfernung von Schmutzpartikeln ist bereits durch einmaliges Auswaschen gegeben.

Die reine genomische DNA kann schließlich unter Verwendung eines leicht alkalischen Puffers ausgewaschen werden.

#### B. Komponenten des Kits

Puffer BQ1

Puffer BQ2

Puffer BE

Proteinase K

Proteinasepuffer

NucleoSpin<sup>®</sup> Blood XL Kolonnen plus Sammeltubes

50 ml Elutiontube



Abb. 3.1 Kit zur DNA-Extraktion

#### C. Durchführung der Methode

Vor Beginn der eigentlichen DNA-Isolierung hat es sich zur Vermeidung unfreiwilliger Pausen im weiteren Ablauf bewährt, das Wasserbad auf 56° C zu erwärmen und den Puffer BE des Kits auf 70° C zu erhitzen.

Zunächst wurden je 5 ml Blut des Probanden, welches Raumtemperatur besitzen sollte, mit 500 µl Proteinase K und 5 ml Puffer BQ1 in ein 50 ml Tube pipettiert und gründlich für zehn Sekunden durch das Vortexgerät gemischt. Es folgte das Inkubieren der Proben für 15 Minuten bei 56° C, wobei sich das Lysat typischerweise braun färbt. Im Anschluss an die Inkubation wurden jeweils 5 ml Ethanol in die Tubes gegeben und erneut 10 Sekunden gemischt. Vor dem Beladen der Kolonnen sollte das Lysat ungefähr 5 Minuten abkühlen, um eine verminderte Ausbeute durch Zugabe von noch heißem Lysat auf die Kolonne zu vermeiden. Jede Säule wurde in ein für die Zentrifuge geeignetes 50 ml Falcon-Tube gesetzt. Die Säulen wurden mit 15 ml der lysierten Blutproben beladen und für 5 Minuten bei 4000 Umdrehungen in der Zentrifuge belassen.

Anschließend wurden 7,5 ml Waschpuffer BQ2 zugegeben und die Proben bei 4000 Umdrehungen 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Verwerfen der abgetrennten Flüssigkeit wurde ein zweites Mal Waschpuffer, wiederum 7,5 ml, zugegeben, und anschließend ein letztes Mal, für 12 Minuten, bei 4000 Umdrehungen zentrifugiert.

Um die DNA auszuwaschen, wurden die Säulen ein weiteres Mal in neue 50 ml Falcon-Tubes gesetzt und mit Hilfe einer Pipette 600 µl des auf 70° C vorgewärmten Puffer BE in das Zentrum der Silicatmembran getropft.

Nach 2-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Säule für weitere 2 Minuten bei 4 g zentrifugiert.

Das Eluat wurde anschließend in sterile Eppendorf-Cups pipettiert und bis zur weiteren Verarbeitung im Gefrierschrank bei -20° C gelagert.

### 3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

#### A. Beschreibung der Methode

Gentechnische Verfahren spielen in Medizin und Forschung heutzutage eine bedeutende Rolle.

Bereits winzige Mengen einer bestimmten DNA, sogar ein einziges Molekül, können durch geeignete gentechnische Methoden vervielfältigt oder überhaupt erst nachgewiesen werden. Um solch eine geeignete Methode handelt es sich seit dem Jahr 1986 auch bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Das Prinzip der PCR ist simpel. Benötigt wird zuallererst das Stück DNA, welches vervielfältigt werden soll. Als nächstes sind die Startpunkte der Replikation zu wählen, die so genannten Primer. Bei den Primern handelt es sich um Oligonukleotide. Das sind DNA-Einzelstrangstücke mit einer Länge von ungefähr zwanzig bis dreißig Nukleotiden.

Aufgrund der Primer kann die DNA-Polymerase erkennen, welchen Abschnitt der DNA sie vervielfältigen soll. Die DNA-Polymerase ist ein hitzestabiles Enzym, welches auch Temperaturen über 90° C toleriert. Um ein geeignetes Milieu für das Enzym zu schaffen, wird dem Reaktionsansatz ein Puffer beigegeben. Nun sind noch die Bausteine der genetischen Information, die Desoxynukleotide, zu erwähnen. Sie müssen ebenfalls zugegeben werden.

Sämtliche Reagenzien werden in ein Reaktionsgefäß pipettiert und zur Reaktion in ein PCR-Gerät, den Cycler, gestellt. Dort wird der DNA-Doppelstrang zuerst auf etwa 90° C erhitzt und somit denaturiert. Die Denaturierung beruht auf dem Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen der beiden DNA-Stränge. Anschließendes Abkühlen der DNA auf ungefähr 50° C ermöglicht das Hybridisieren der Primer an die DNA-Einzelstränge.

Nun synthetisiert die DNA-Polymerase die komplementären Stränge in Richtung dem 5'-Ende.



### 3. Material und Methoden

Der gewünschte DNA-Abschnitt ist somit verdoppelt, der Zyklus kann erneut beginnen.

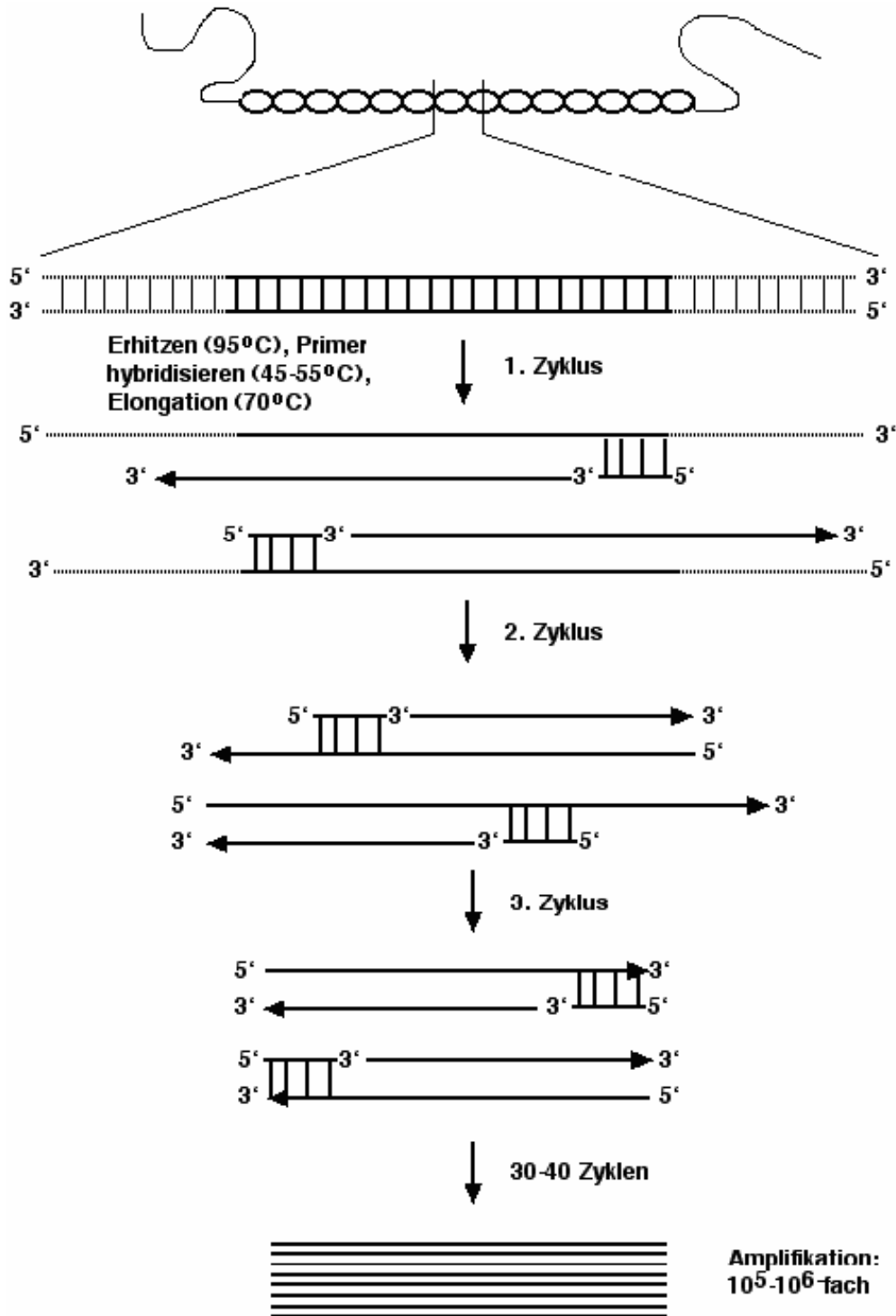


Abb. 3.2 Beispiel einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### B. Komponenten des PCR-Mixes

Aqua dest.

Pfu-Puffer, 10fach

Primer 31, 5  $\mu$ M

Primer 51, 5  $\mu$ M

dNTP, 100 mM

Pfu-Polymerase

#### C. Durchführung der Methode

Zur Vorbereitung der Polymerase-Kettenreaktion wurden eine geeignete Anzahl an Tubestreifen und passenden Deckeln herausgesucht. Die Tubestreifen wurden bereits in den zum Cycler passenden Kunststoffrahmen, beides danach in einen stabilen Plexiglasständer gesetzt.

Der PCR-Mix wurde unter der Sterilbank mit eigens dafür gedachten Pipetten und sterilen Spitzen auf Eis pipettiert. Es wurden während des gesamten Prozesses Handschuhe getragen, um eine Kontamination mit der eigenen DNA zu vermeiden. Pro Tube wurden 49  $\mu$ l PCR-Mix vorgelegt.

Diese 49  $\mu$ l enthielten 32,4  $\mu$ l destilliertes Wasser, 5  $\mu$ l 10fach Pfu-Puffer, je 5  $\mu$ l Primer 31 und 51 (jeweils 5  $\mu$ M), 0,6  $\mu$ l dNTP (100 mM) sowie 1  $\mu$ l Pfu-Polymerase, wobei die einzelnen Bestandteile in der aufgeführten Reihenfolge pipettiert wurden. Jedem Tube wurde 1  $\mu$ l DNA eines Probanden zugegeben, für jeden Probanden wurden zwei Ansätze ausgeführt.

Nach Abschluss des Pipettierens wurden die Tubes verschlossen und, nach einer Aufwärmphase von 2 Minuten, in den Cycler gestellt.

Der Cycler war zuvor bereits auf eine Denaturierungsphase von 95° C für 30 Sekunden, eine nachfolgende Anlagerungsphase von 58° C für 30 Sekunden und abschließend eine Verlängerungsphase von 72° C für 7 Minuten eingestellt worden.

### 3. Material und Methoden

---

Dieser Zyklus sollte sich 37 Mal wiederholen, anschließend verblieb die replizierte DNA bis zur Entnahme aus dem Cyclor bei 4° C.

#### 3.2.4 Elektrophorese

##### A. Beschreibung der Methode

Die Elektrophorese stellt eine Methode zur Trennung von Partikeln nach ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld in einer gepufferten Lösung dar. Diese Wanderungsgeschwindigkeit hängt hierbei maßgeblich von Größe und Ladung der Teilchen ab.

Im vorliegenden Fall wurde eine Trägerelektrophorese angewandt; als Trägerschicht kam ein 1 %iges Agarosegel zum Einsatz. Die Netzstruktur des Gels bewirkt hierbei eine Größentrennung der replizierten DNA-Fragmente.

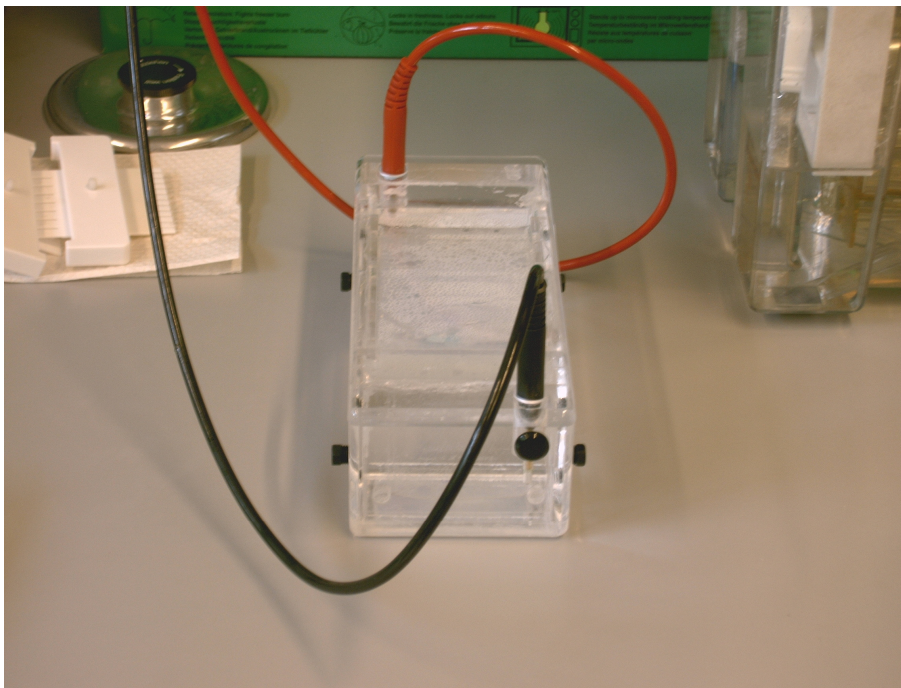


Abb. 3.3 Gelelektrophoresekammer

#### B. Komponenten des Agarosegels

Agarose, 0,5 g

Tris Puffer, 50 ml

#### C. Durchführung der Methode

Zunächst wurde ein Agarosegel gegossen. Dazu wurde die jeweils benötigte Menge an Agarose beziehungsweise Tris Puffer mit Hilfe von Waage und Messzylinder abgemessen. Beides wurde in einen Erlenmeyerkolben gegeben und durch vorsichtiges Schwenken und Rühren mit dem Spatel vermischt.

Anschließend wurde das Gemisch in der Mikrowelle unter ständiger Beobachtung erhitzt und zum Zeitpunkt des Aufkochens aus der Mikrowelle genommen.

Die heiße Lösung wurde in eine vorbereitete Kammer gegeben, die mittels zweier Klebestreifen abgedichtet worden war. Außerdem war bereits ein Kamm angebracht, der die Taschen, welche später beladen werden sollten, formte.

Das Gel konnte nach dem Abkühlen entweder sofort eingesetzt oder über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt werden.

Nach dem Entfernen von Kamm und Klebestreifen konnte das Gel, welches in die Elektrophorese-Laufkammer eingebracht worden war, beladen werden.

Hierzu wurden zuvor je 10 µl PCR-Produkt und 1 µl Ladepuffer in ein Eppendorf-Cup pipettiert und mit dem Vortexgerät gründlich gemischt. Pro Proband wurden auf diese Weise je zwei Ansätze vorbereitet.

Das Gel wurde nun links beginnend beladen, zuerst mit 10 µl der 1 kb ladder zum Vergleich, anschließend mit den eigentlichen Proben. Die Elektrophorese-Laufkammer wurde nun bei 80 V für ungefähr zwei Stunden belassen.

Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Gel gefärbt. Hierzu wurde es in eine Kunststoffschale gegeben und auf eine Schüttelplatte, welche sich in einem Abzug befindet, gestellt. Nach dem Anschalten der Schüttelplatte wurde die

### 3. Material und Methoden

---

Schale mit Ethidiumbromidlösung gefüllt und das Gel darin für ungefähr 15 Minuten gleichmäßig gefärbt.

Nach Ablauf der Zeit und nach Abgießen des Ethidiumbromids wurde das Gel auf eine UV-Platte gegeben und fotografiert.

Abschließend wurde das Foto ausgedruckt und das Gel entsorgt.

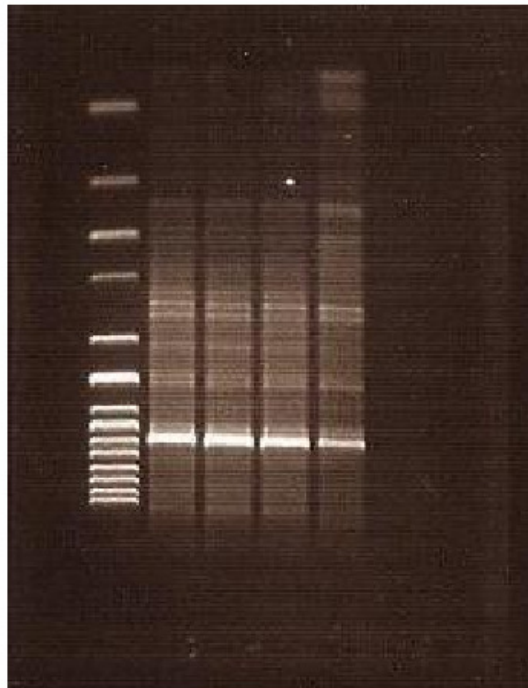


Abb. 3.4 Foto des Agarosegels nach Färben mit Ethidiumbromid

Stellte sich die Probe eines Probanden nach PCR in der Gelelektrophorese zu schwach dar, so wurde für diesen Probanden ein weiterer PCR-Ansatz durchgeführt. Sämtliche Ansätze eines Probanden wurden vor der Reinigung gepoolt.

#### 3.2.5 Reinigen

##### A. Beschreibung der Methode

Die Verwendung des QIAquick PCR Purification Kits ermöglicht die Reinigung einzel- oder doppelsträngiger DNA-Fragmente, welche im Rahmen der Polymerase-Kettenreaktion oder anderer enzymatischer Reaktionen entstehen.

Es können Bruchstücke mit einer Größe von 100 bis 10 000 Basenpaaren von überschüssigen Primern, Nukleotiden, Polymerasen oder Salzen gesäubert werden.



Abb. 3.5 Kit zur DNA-Reinigung

#### B. Komponenten des Kits

Puffer PE (Konzentrat)

Puffer PB

Puffer EB

QIAquick Säulen für Zentrifuge

Sammeltubes, 2 ml

#### C. Durchführung der Methode

Zur Vorbereitung wurde Ethanol, 96-100 %ig, zum Lösen des Waschpuffers PE benötigt. Die Zentrifuge wurde auf 13 000 rpm eingestellt.

Zuerst wurden zu einem Anteil PCR-Produkt fünf Anteile Bindepuffer PB gegeben und daraufhin gut gemischt.

Die QIAquick Kolonne wurde in das dafür vorgesehene 2 ml fassende Sammeltube gesetzt, anschließend das PCR-Produkt zupipettiert.

Sammeltube mit QIAquick Kolonne und dem PCR-Produkt wurden danach für 30 bis 60 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen werden, die QIAquick Kolonne konnte erneut in das Sammeltube gesteckt werden.

Zum Auswaschen wurden nun 0,75 ml Waschpuffer PE zugegeben und wieder für 30 bis 60 Sekunden zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen, die Kolonne in dasselbe Tube zurückgesetzt und die Kolonnen eine weitere Minute zentrifugiert.

Zum Auswaschen der DNA wurde die QIAquick Säule in ein neues, 1,5 ml fassendes Mikrozentrifugentube gesteckt, 50 µl H<sub>2</sub>O ins Zentrum der Membran pipettiert und ein weiteres Mal für eine Minute zentrifugiert.

Im Anschluss an die Reinigung wurde erneut eine Elektrophorese durchgeführt, wobei 10 µl 1 kb ladder, jeweils aber nur 5 µl DNA und 1 µl Ladepuffer pro Bahn verwendet wurden.

#### 3.2.6 Konzentrationsbestimmung und Verdünnung

##### A. Beschreibung der Methode

Dieser Schritt dient zunächst der photometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration, somit also der Bestimmung der optischen Dichte (OD) der Probe.

Anschließend wird mit Hilfe der folgenden Formel die DNA-Konzentration in Mikrogramm pro Mikroliter bestimmt:

$$\begin{aligned} \text{Konzentration} &= \text{OD}_{260\text{nm}} \times \frac{1000}{30} \times \frac{50}{1000} \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l} \\ &= \text{OD}_{260\text{nm}} \times 1,66 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

Zuletzt wird die Probe auf 100 ng/ $\mu\text{l}$  verdünnt. Dies entspricht der üblichen DNA-Konzentration für den PCR-Gebrauch.

##### B. Komponenten der Methode

Aqua dest.

PCR-Produkt

##### C. Durchführung der Methode

Es wurden 970  $\mu\text{l}$  Aqua dest. sowie 30  $\mu\text{l}$  der extrahierten DNA in eine Quarzglasküvette mit Schichtdicke 10 mm gegeben.

Nach Einbringen der Küvette in den Strahlengang des Photometers folgte die Bestimmung der Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm.



Der hierbei erhaltene Wert, die optische Dichte bei 260 nm ( $OD_{260nm}$ ), wurde wie unter A. zu entnehmen mit dem konstanten Faktor 1,66 multipliziert.

Die Probe wurde in einem letzten Schritt auf 100 ng/ $\mu$ l verdünnt.

#### **3.2.7 Sequenzierung**

Die Sequenzierung der DNA erfolgte durch den Sequenzierservice der Firma GENterprise in Mainz.

#### **3.2.8 Alignment**

Das Alignment, sprich die Zusammenschau der einander entsprechenden Stellen im kodierenden Genabschnitt der sequenzierten Proben, wurde mithilfe des Programms Align-IR der Firma Li-COR durchgeführt.

Nach dem Einlesen der Daten führt das Programm eigenständig das Alignment der einzelnen Proben durch. Die Exons 1 bis 3 wurden hierbei getrennt voneinander beurteilt.

Das Programm ermöglicht eine übersichtliche Betrachtung der einzelnen Proben durch Einfärben der vier Basen, was die abschließende Beurteilung deutlich erleichterte.

#### **3.2.9 TA-Cloning**

Da bei der Bearbeitung der Probe PR 38 trotz mehrfacher Wiederholung der PCR das Ergebnis der Sequenzierung nicht gelesen werden konnte, kam an dieser Stelle die Methode des TA-Cloning zum Einsatz.

#### A. Beschreibung der Methode

Es handelt sich beim TA-Cloning um ein Verfahren zur Klonierung von PCR-Produkten. Mithilfe von Vektoren wird das PCR-Produkt, dessen Vervielfältigung erfolgen soll, in Bakterien eingebracht. Als Vektoren werden bakterielle Plasmide genutzt. Das Einbringen des PCR-Produktes via Plasmid in das Bakterium gelingt, indem zunächst der Vektor enzymatisch derart aufgespalten wird, dass es zum Auftreten eines Restes dreier Thymidin-Nukleotide an beiden Plasmidenden kommt. Das PCR-Produkt wiederum wird durch thermostabile Polymerasen derart geschnitten, dass Enden mit Adenosin-Resten entstehen. Die so entstandenen kompatiblen Enden ermöglichen den Einbau des PCR-Produktes in das bakterielle Plasmid.

Zur Erfolgskontrolle enthält der Vektor einen Abschnitt, der für die Resistenz gegenüber Ampicillin kodiert. Des Weiteren befindet sich der Bereich, in welchem das PCR-Produkt eingefügt werden soll, in einer Region, welche für das  $\alpha$ -Peptid des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase kodiert. Dies ermöglicht die Auswahl derer Kolonien, welche das gewünschte Plasmid tragen, zum einen anhand der Möglichkeit des Wachstums der Vektor tragenden Bakterien auf Platten, welche mit Ampicillin versetzt wurden. Zum anderen führt ein Ausfall des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase zu einem Ausbleiben tiefblau gefärbter Kolonien (die erhaltenen Kolonien stellen sich weiß dar).

#### B. Komponenten des Kits

2X Rapid Ligation Buffer

pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vectors

Control Insert DNA

T4 DNA Ligase

IPTG stock solution

X-Gal

LB medium

SOC medium

#### C. Durchführung der Methode

##### *Ligation*

Bevor mit dem Pipettieren begonnen wird, sollten die Tubes mit Vektor und Kontroll-DNA kurz zentrifugiert werden. Der 2X Rapid Ligation-Puffer sollte vor Anwendung gründlich mit dem Vortex gemischt werden.

Es wurden insgesamt vier Ansätze pipettiert.

Ansatz 1 enthielt 7,5 µl Pufferlösung, 1,5 µl des Vektors, 4,0 µl des Inserts (Exon 2 von PR 38) sowie 1,5 µl Ligase und 0,5 µl destilliertes Wasser.

Ansatz 2 enthielt 7,5 µl Pufferlösung, 1,5 µl des Vektors, 2,0 µl des Inserts (Kontrollinsert der Firma Promega) sowie 1,5 µl Ligase und Aqua dest. 2,5 µl.

Ansatz 3 enthielt 7,5 µl Pufferlösung, 1,5 µl des Vektors, kein Insert (Background-Kontrolle) sowie 1,5 µl Ligase und 4,5 µl destilliertes Wasser.

Ansatz 4 (Transformationskontrolle) wurde erst zu einem späteren Zeitpunkt pipettiert. Die Ansätze wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Zwischenzeitlich wurden gemäß der Angaben des Herstellers die Agarplatten vorbereitet. Hierfür wurden 15 g Agar in einem Liter des LB Mediums aufgelöst und anschließend autoklaviert. Nachdem die Lösung auf 50° C abgekühlt war, konnte Ampicillin hinzugeführt werden (100 µg/ ml). Abschließend wurden 0,5 mM IPTG sowie 80 µg/ml X-Gal dazugegeben und 30 bis 35 ml der Lösung in Petrischalen gefüllt. Es wurden insgesamt acht Platten benötigt.

##### *Transformation*

Vor dem Ausbringen der kompetenten Zellen sollten die Platten Raumtemperatur besitzen. Die Tubes, in welche die Ligationsansätze pipettiert worden waren, wurden zunächst abzentrifugiert. Aus jedem der vorbereiteten Ansätze wurden jeweils 2,0 µl in ein steriles 1,5 ml Tube auf Eis pipettiert.

Zusätzlich wurde zur Überprüfung der Effizienz der Transformation 0,1 ng des ungeschnittenen Plasmids ebenfalls in ein Tube auf Eis pipettiert (Ansatz 4).

### 3. Material und Methoden

---

Jeweils 50 µl der kompetenten Zellen wurden nach kurzem Antauen in jedes der kurz zuvor vorbereiteten Tubes gegeben. Die Zellen wurden für 20 Minuten im Eisbad belassen, anschließend für 50 Sekunden im Wasserbad auf 42° C erhitzt und dann erneut für 2 Minuten im Eisbad gekühlt.

Im nächsten Schritt wurden 950 µl SOC Medium zu den Tubes der Ligationsreaktion zugegeben, 900 µl zum dem Tube, welches die Zellen mit dem ungeschnittenen Plasmid zur Transformationskontrolle enthielt. Es folgte die Inkubation bei Raumtemperatur für ungefähr 90 Minuten. Je 100 µl der Transformationskulturen wurden auf je zwei Platten gegeben, im Falle der Transformationskontrolle war zuvor noch eine 1:10 Verdünnung mit SOC Medium durchgeführt worden. Die Platten wurden über Nacht bei 37° C inkubiert.

Aus Ansatz 1 ergaben sich sieben weiße Kolonien. Ansatz 2, welcher das Kontrollinsert des Herstellers beinhaltet, ergab 150 Kolonien, davon jeweils ungefähr die Hälfte weiß, die andere Hälfte blau. Die Background-Kontrolle aus Ansatz 3 zeigte ausschließlich blaue Kolonien. Aus der Transformationskontrolle (Ansatz 4) ergab sich kein Wachstum von Kolonien.

Fünf der sieben weißen Kolonien aus Ansatz 1 wurden gepickt und anschließend eine über Nacht Kultur in LB Medium mit Ampicillin angesetzt.

# **4. Ergebnisse**

Es folgt die Darstellung der Ergebnisse der klinischen Evaluation, der endokrinologischen Funktionstests, teils auch der Spontansekretion in Bezug auf die somatotrophe (WH), thyreotrophe ( $T_4$ ,  $fT_4$  und TSH), corticotrophe (Cortisol) und gonadotrophe (LH und FSH) hypophysäre Achse sowie jene der endokrinologischen Funktionstests und Spontansekretion von Prolactin.

Anschließend soll, sofern vorhanden, auf die Ergebnisse der Kernspintomographie (MRT) des Schädels, zerebrale Fehlbildungen und Begleiterkrankungen eingegangen werden.

Der letzte Teil dieses Abschnittes dient der Darstellung der Ergebnisse der genetischen Analyse von PROP-1 bei denjenigen Probanden, von denen eine Blutprobe erhalten werden konnte.

## **4.1 Klinische Evaluation**

Basierend auf den bereits in Abschnitt 2.2.2 und 2.2.3 vorgestellten Ein- und Ausschlusskriterien wurden 43 Probanden in die vorliegende Studie aufgenommen. Die Probanden wurden in den Jahren zwischen 1977 und 2003 geboren, daher gelten in Abhängigkeit vom Diagnosezeitpunkt und den hiervon abhängigen Schwankungen der Referenzwerte der verschiedenen Labore zum Teil unterschiedliche Normwerte.

72 % der ausgewählten Probanden sind männlich (31 versus 12).

Das durchschnittliche Gestationsalter liegt bei 40 Wochen (Minimum 37, Maximum 42 Wochen). Die Geburtslänge reicht von 46 bis 56 cm und beträgt durchschnittlich 51 cm.

Das Geburtsgewicht der Probanden, entsprechend den Schwankungen von Gestationsalter und Geburtslänge, beträgt im Durchschnitt 3449 g, wobei die erhobenen Werte von 2270 g bis 4500 g reichen.

#### 4. Ergebnisse

---

	<b>Mittelwert</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
<b>Gestationsalter</b> (Wochen)	40	37	42
<b>Geburtslänge</b> (cm)	51	46	56
<b>Geburtsgewicht</b> (g)	3449	2270	4500

Tab. 4.1 Gestationsalter und Geburtsmaße

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (Zeitpunkt +0) waren die Probanden zwischen 1,4 und 14,2 Jahre alt (Mittelwert 5,4 Jahre).

Die Standardabweichung der Körpergröße des Einzelnen lag zwischen -4,50 und -0,96 SDS (Mittelwert -3,28 SDS).

Bei erneuter Messung ein Jahr nach Beginn der Therapie (Zeitpunkt +12) mit Wachstumshormon zeigte sich bereits ein erster Effekt der Behandlung, die Standardabweichung der Körpergröße reichte nun von -3,67 bis -0,28 SDS (Mittelwert -2,17 SDS).

Somit liegt die Differenz der Standardabweichungen zum Zeitpunkt +0 und zum Zeitpunkt +12 bei durchschnittlich 1,11 SDS.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
<b>SDS +0</b>	-3,28	-0,96	-4,50
<b>SDS +12</b>	-2,17	-3,67	-0,28

Tab. 4.2 SDS der Körpergröße zum Diagnosezeitpunkt und nach einem Jahr

## 4. Ergebnisse

---

Die Wachstumsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt +0 konnte aufgrund der Datenlage bei den meisten Probanden nicht bestimmt werden (lediglich bei drei Probanden wurde eine Messung in ausreichendem Abstand zum Zeitpunkt +0, sprich mindestens oder >4 Monate vor der Diagnosestellung durchgeführt, bei drei weiteren Probanden dagegen war keine vorausgehende Messung der Körpergröße erfolgt).

Ein Jahr nach Beginn der Gabe von Wachstumshormon reichten die Werte für die Standardabweichung der Wachstumsgeschwindigkeit von -2,03 bis 11,20 SDS, mit einem Durchschnittswert von 3,81 SDS.

Auch der so genannte Body-mass-Index (BMI) änderte sich unter WH-Gabe. Lag er bei Diagnosestellung durchschnittlich bei -0,20 SDS (Minimum -3,25, Maximum 3,02 SDS), so zeigte sich bei Wiedervorstellung nach einem Jahr eine Abnahme auf -0,56 (Minimum -2,27, Maximum 2,09 SDS).

Das Spektrum der Größe seitens der Mütter der Probanden reichte von 148,0 cm (-2,81 SDS) bis zu 177,6 cm (2,19 SDS). Die durchschnittliche Standardabweichung ließ sich mit -0,12 SDS angeben.

Auf väterlicher Seite erstreckte sich die Bandbreite von 162,0 cm (-2,31 SDS) bis hin zu 193,0 cm (2,16 SDS), der Mittelwert der Standardabweichung entsprach -0,19 SDS.

Für die Standardabweichung der familiären Zielgröße konnte ein Minimum von -1,64 SDS sowie ein Maximum von 1,32 SDS berechnet werden.

## 4.2 Endokrinologische Funktionstests, Spontansekretion

Ein Arginin-Test war bei 38 der 43 Probanden durchgeführt worden, bei 36 vor Beginn einer Therapie mit WH, bei zwei der Probanden erst danach. Die durchschnittliche Ausschüttung an WH im Arginin-Test lag bei 3,80 ng/ml, das Minimum bei 0,20 ng/ml, das Maximum bei 9,40 ng/ml, wobei dieser Wert bereits 1999 erhoben wurde und somit den Ein- und Ausschlusskriterien genügt. Ein Insulin-Test war bei 17 Probanden, hiervon bei 14 vor Beginn der Wachstumshormonbehandlung, bei drei jedoch nach deren Beginn, zur Diagnose eines WH-Mangels herangezogen worden. Die Werte reichten von 1,00 ng/ml bis zu 8,10 ng/ml (Mittelwert 3,30 ng/ml). Eine Untersuchung des WH-Tagesprofils wurde bei insgesamt 28 Probanden durchgeführt, wobei die Untersuchung bei nur zwei der Probanden nach dem Start der WH-Substitution begonnen wurde. Die mittlere Sekretionsrate lag bei durchschnittlich 2,02 ng/ml, der Gipfel der Ausschüttung bei maximal 11,60 ng/ml.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
<b>WH bei Arginin-Test (ng/ml)</b>	3,80	0,20	9,40
<b>WH bei Insulin-Test (ng/ml)</b>	3,30	1,00	8,10
<b>WH bei Tagesprofil, mean (ng/ml)</b>	2,02	0,70	5,33
<b>WH bei Tagesprofil, peak (ng/ml)</b>	4,40	1,10	11,60

Tab. 4.3 Wachstumshormon-Ausschüttung bei Arginin- und Insulin-Test sowie Tagesprofil



## 4. Ergebnisse

Der Vergleich der IGF-I Werte zum Zeitpunkt +0 und nach einem Jahr zeigt eine deutliche Zunahme: der Mittelwert nahm von -2,91 SDS auf -0,77 SDS zu, ebenso veränderten sich gemessenes Minimum und Maximum (von -7,04 auf 2,35 SDS sowie von 0,66 auf 1,44 SDS).

Ähnliche Veränderungen finden sich auch bei IGFBP-3. Das Minimum änderte sich von -3,55 zu -2,39 SDS, das Maximum von 0,66 auf 2,64 SDS (Mittelwert -1,39 zu 0,47 SDS).

Zum Diagnosezeitpunkt erhielten bereits 15 der 43 Probanden eine Schilddrüsenhormon-Substitution. 19 weitere Probanden entwickelten eine Schilddrüseninsuffizienz innerhalb von 2,5 Jahren nach Beginn des Wachstumshormonersatzes. Neun Probanden wurden nach mehr als 2,5 Jahren mit Schilddrüsenhormonen substituiert.

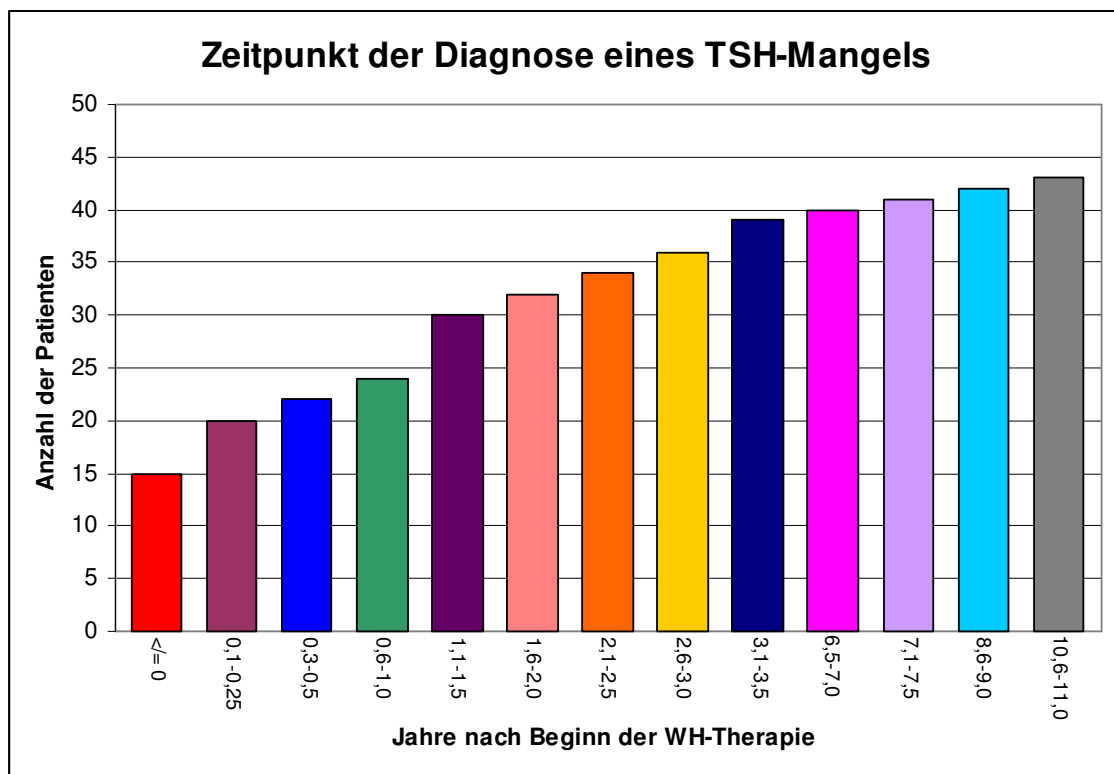


Abb. 4.1 Zeitpunkt der Diagnose eines TSH-Mangels

## 4. Ergebnisse

---

Ein TRH-Test wurde im durchschnittlichen Alter von 5,5 Jahren bei 21 der Probanden durchgeführt. Die TSH-Spitzenwerte beliefen sich im Schnitt auf 18,70 mU/l (Minimum 2,00, Maximum 36,00 mU/l). Die Substitution mit LT<sub>4</sub> wurde zum frühesten Zeitpunkt 102 Monate vor Beginn der WH-Therapie begonnen, spätestens 129 Monate nach Start der Behandlung mit Wachstumshormon. Über die Hälfte der Probanden erhielt innerhalb eines Jahres nach Beginn der Gabe von Wachstumshormon auch Schilddrüsenhormone.

Zur Bestimmung einer möglicherweise vorliegenden ACTH-Insuffizienz wurde zum einen das Morgen-Cortisol, zum anderen das freie Cortisol im Urin sowie der Spitzenwert im Insulin-Test bestimmt. Die Bestimmung von Cortisol am Morgen erfolgte bei 27 der Probanden vor Beginn der WH-Therapie, bei 14 dagegen erst danach. Der durchschnittliche Wert lag bei 10,8 µg/dl, es wurden mindestens 3,7 und höchstens 23,0 µg/dl gemessen.

Die Messung von freiem Cortisol im Urin wurde nur bei einem kleinen Teil der Probanden durchgeführt (bei einem vor Beginn, bei acht Probanden nach Beginn der WH-Therapie). Der Mittelwert der Messungen lag bei 23,6 µg/24h (Minimum 9,0 µg/24h, Maximum 60,8 µg/24h).

Der Cortisol-Spitzenwert im Insulin-Test wurde bei 12 Probanden vor WH-Gabe, bei vier Probanden erst danach bestimmt. Es ergab sich ein durchschnittlicher Spitzenwert von 19,5 µg/dl, außerdem ein Mindestwert von 7,1 µg/dl sowie ein Höchstwert von 40,0 µg/dl. Eine Substitution von Hydrocortison erfolgte bei zwei Probanden.

	<b>Mittelwert</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
<b>Morgen-Cortisol (µg/dl)</b>	10,8	3,7	23,0
<b>Freies Cortisol im Urin (µg/24h)</b>	23,6	9,0	60,8

## 4. Ergebnisse

---

	<b>Mittelwert</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
<b>Cortisol im Insulin-Test (µg/dl)</b>	19,5	7,1	40,0

Tab. 4.4 Morgen-Cortisol, freies Cortisol im Urin und Cortisol-Ausschüttung im Insulin-Test

Eine Untersuchung der Prolactin-Werte wurde bei 12 der Probanden vorgenommen (Bei sieben bereits vor, bei fünf Probanden nach Beginn der Gabe von Wachstumshormon). Die Werte rangierten zwischen 0,9 und 30,4 µg/l. Der Mittelwert belief sich auf 10,2 µg/l. Bei einem Probanden zeigte sich eine Ausschüttung oberhalb der dem Alter entsprechenden Normwertgrenze (30,4 µg/l), bei zwei Probanden eine Freisetzung unterhalb des zum jeweiligen Alter gehörigen Normbereichs (1,0 und 0,9 µg/l). Im TRH-Test lag die durchschnittliche Prolactin-Ausschüttung bei 378 µg/l (Minimum 15 µg/l, Maximum 1166 µg/l).

Eine Untersuchung der gonadotropen Achse erfolgte bei insgesamt zwölf Probanden (bei acht Probanden vor WH-Gabe, bei vier Probanden danach).

Für LH ergab sich eine mittlere Ausschüttung im LHRH-Test von 3,9 U/l. Die Werte reichten von 0,8 bis 8,4 U/l.

Die Ergebnisse für FSH im LHRH-Test lagen bei mindestens 1,4 U/l, der Höchstwert lag bei 14,0 U/l (Mittelwert 4,3 U/l).

Eine Substitution von Sexualhormonen wurde bei insgesamt drei Probanden durchgeführt.

### 4.3 Kernspintomographie des Schädels

Das Durchschnittsalter der Probanden bei der Bildgebung des Schädels lag bei 6,7 Jahren. Im kernspintomographischen Bild stellte sich die Adenohypophyse bei 16 Probanden unauffällig dar. In 19 Fällen zeigte sich ein hypoplastischer, in einem Fall ein hyperplastischer Hypophysenvorderlappen. Bei sieben Probanden war keine Bildgebung des Schädels mittels MRT veranlasst worden.

In 25 Fällen befand sich die Neurohypophyse in orthotoper Lage, ein ektopter Hypophysenhinterlappen stellte sich auf 11 Bildern dar.

Der Hypophysenstiel war bei 19 Probanden hypoplastisch, bei 16 Probanden normal angelegt. Ein durchtrennter Stiel war in keinem Fall nachzuweisen.

Darstellung des HVL	Anzahl der Probanden
Unauffällig	16
Hypoplastisch	19
Hyperplastisch	1
Keine Darstellung erfolgt	7

Tab. 4.5 Kernspintomographische Darstellung des Hypophysenvorderlappens

Lage des HHL	Anzahl der Probanden
Orthotop	25
Ektop	11
Keine Darstellung erfolgt	7

Tab. 4.6 Kernspintomographische Darstellung des Hypophysenhinterlappens

## 4. Ergebnisse

---

Zustand des Hypophysenstiels	Anzahl der Probanden
Unauffällig	16
Hypoplastisch	19
Durchtrennt	0
Keine Darstellung erfolgt	8

Tab. 4.7 Kernspintomographische Darstellung des Hypophysenstiels

### 4.4 Zerebrale Fehlbildungen

Lediglich bei vier Probanden zeigten sich Malformationen des Gehirns. Hierbei handelte es sich zum einen um eine Arnold Chiari Malformation<sup>o1</sup>, zum anderen um radiär orientierte Marklagersignalstörungen mit der Differentialdiagnose atypischer Virchow-Robinräume oder einer postentzündlichen Läsion. Darüber hinaus wurde bei einem Probanden eine hemiatrophische Hirnfehlbildung beschrieben. Bei einem weiteren Probanden zeigte sich eine leichte Asymmetrie der intrakraniellen Strukturen.

In den übrigen Fällen zeigten sich altersentsprechende Normalbefunde.

### 4.5 Begleiterkrankungen

Insgesamt war ein weites Spektrum an Begleiterkrankungen vorhanden.

In drei Fällen litten die Probanden unter einer atopischen Dermatitis. Neben einem ehemaligen Frühchen befand sich unter den Probanden ein ehemals hypotrophes, termingerecht geborenes Neugeborenes mit Zustand nach nekrotisierender Enterocolitis und Volvulus. In einem Fall lag ein familiärer Kleinwuchs vor. Ein Proband war bereits wegen einer Synostose der Frontalnaht behandelt worden. Ein Pseudohypoparathyreoidismus wurde in einem Fall beschrieben. Des Weiteren wurden bei einem Probanden mehrere Dysmorphiezeichen geschildert.

## 4.6 Genetische Analyse von PROP-1

Die meisten der bekannten Mutationen von PROP-1 befinden sich in Exon 2. Mutationen in Exon 1 sind derzeit nicht bekannt. Der Vererbungsmodus ist autosomal-rezessiv, wobei neben der klassischen homozygoten in einigen Fällen auch eine compound heterozygote Weitergabe möglich ist.

Die Sequenzierung der drei Exons von PROP-1 sowie die nachfolgende Auswertung der Ergebnisse mit Hilfe des Programms AlignIR ergab eine Mutation in Exon 2 bei Proband PR 38.

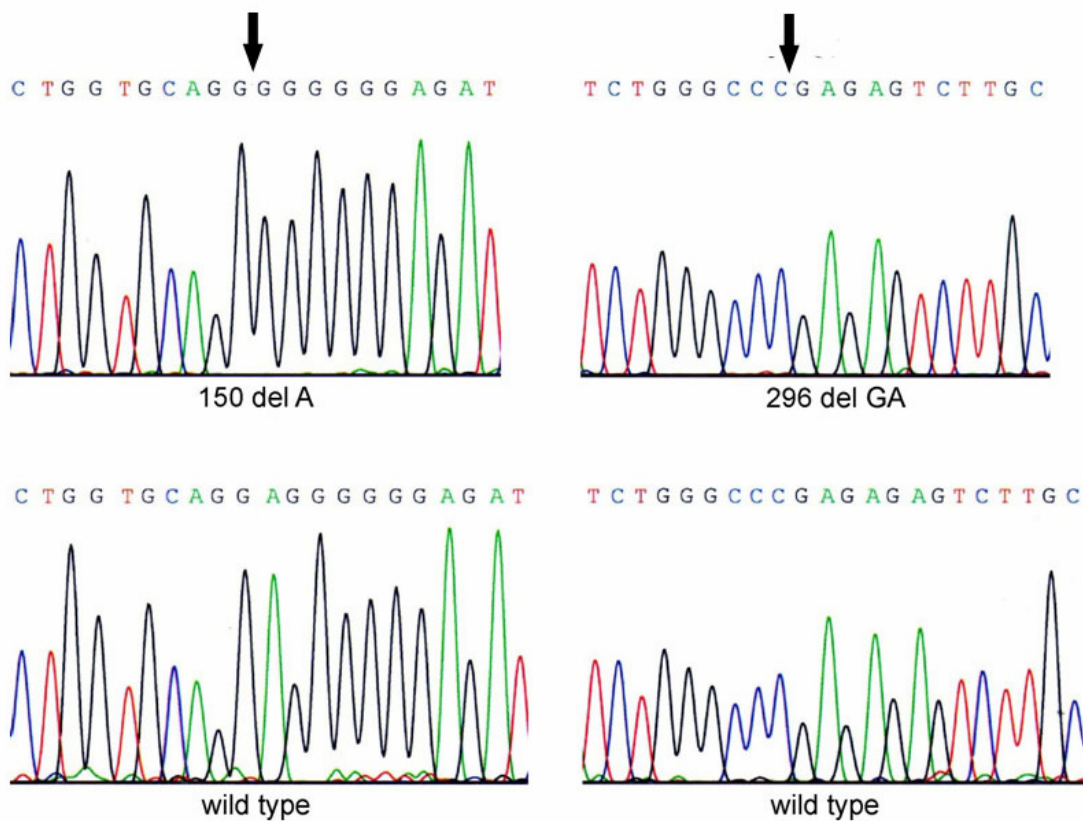


Abb. 4.2 Darstellung der compound heterozygoten Mutation bei Proband PR 38 im Vergleich mit dem Wildtyp

Hierbei handelt es sich um eine Deletion von GA an Position 296 in Kombination mit einer Deletion von A an Position 150.

## 4. Ergebnisse

Es zeigte sich darüber hinaus bei vier Probanden (PR 11, PR 22, PR 28 und PR 34) eine Substitution von Alanin durch Threonin an Position 142 des Genproduktes.

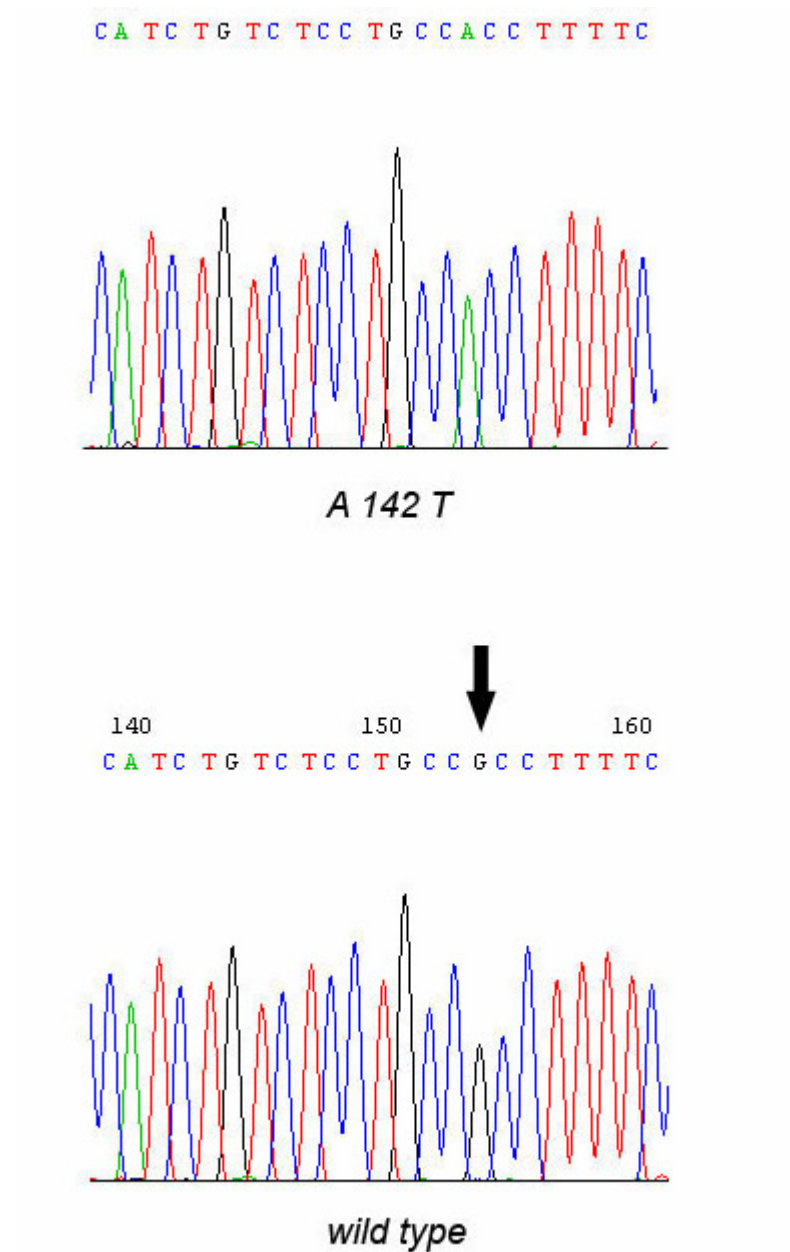


Abb. 4.3 Darstellung des Polymorphismus A 142 T bei Proband PR 11

## **5. Diskussion**

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, Mutationen in PROP-1 als Ursache des kindlichen Mangels an Wachstumshormon und TSH nachzuweisen.

Von besonderem Interesse waren Kinder, welche bei Diagnosestellung des Hypopituitarismus einen isolierten WH-Mangel hatten und erst zu einem späteren Zeitpunkt unter Substitution mit Wachstumshormon einen TSH-Mangel entwickelten.

Die Studie zeigte, dass diese klinische Sequenz nicht durch PROP-1-Defekte hervorgerufen zu sein scheint. Das einzige Kind mit compound heterozygoter PROP-1-Mutation präsentierte sich initial mit WH- und TSH-Mangel, also kombinierten Hypophysenausfällen.

Bei 15 der 43 Probanden (34,9 %) war die Diagnose einer zentralen Hypothyreose bereits vor oder zeitgleich mit der Diagnose eines Wachstumshormonmangels gestellt worden. Ein isolierter WH-Mangel als Erstmanifestation lag bei 28 der 43 Probanden (65,1 %) vor.

Dies entspricht den Ergebnissen weiterer Studien, welche Wachstums- und Gedeihstörungen infolge Wachstumshormonmangels als häufigste Manifestationsform (bis zu 80 %) einer kombinierten hypophysären Insuffizienz beschrieben (Deladoëy et al. 1999, Lee et al. 2004, Pavel et al. 2003).

Im Falle einer PROP-1-Mutation ist, im Rahmen der phänotypischen Variabilität, mindestens bei einigen Probanden ein Prolactin-Mangel zu erwarten.

Ein Mangel an Prolactin findet sich bei zwei Probanden dieser Studie, die jedoch nicht als Träger einer Mutation in PROP-1 identifiziert wurden.

Im Gegensatz zu Mutationen in PIT-1 ist bei PROP-1-Mutationen auch die gonadotrophe Linie hypophysärer Zellen betroffen (Aikawa et al. 2006, Valette et al. 1999). Dies äußert sich im Ausbleiben einer spontanen Pubertätsentwicklung, wie exemplarisch von Lazar et al. 2003 beschrieben.

Diese Konstellation ist bei einem Probanden gegeben. Fünf weitere Probanden zeigten einen spontanen Eintritt in die Pubertät.



Es bleibt abzuwarten, ob sich im Rahmen der Pubertätsentwicklung ein Mangel an Gonadotropinen aufgrund eines Defektes der LH- und FSH-Achse trotz niedriger Prävalenz von Mutationen in PROP-1 bei den übrigen 37 Probanden manifestieren wird.

Die Diagnose eines ACTH-Mangels im Rahmen der Substitution mit Wachstumshormon wurde ebenfalls bei zwei Probanden, im Alter von 1,5 und 7,6 Jahren, gestellt. Eine Insuffizienz der ACTH-Achse ist möglich, wird insgesamt aber selten im Rahmen einer PROP-1-Mutation beobachtet. Ein Mangel an ACTH kann mit einer Verzögerung von mehreren Jahrzehnten auftreten (Crone et al. 2002). Eine Hypothese besagt, PROP-1 sei zwar nicht für die Differenzierung der corticotrophen Zellen notwendig. Der Untergang corticotropher Zellen sei jedoch möglicherweise begründet durch einen Mangel an Signalen, welche von weiteren pituitären Zelllinien ausgehen (Lee et al. 2004).

Bei 16 Probanden der vorliegenden Studie war der Stiel der Hypophyse normal angelegt, in 19 Fällen zeigte sich ein hypoplastischer Hypophysenstiel. Eine Durchtrennung des Stiels der Hypophyse stellte sich in keinem Fall dar. Bei acht Probanden war keine zerebrale Bildgebung erfolgt.

In 11 von 36 Fällen (30,6 %) zeigte sich bei den Probanden dieser Studie eine Ektopie des Hypophysenhinterlappens. Eine orthotope Neurohypophyse fand sich bei 25 Probanden. In 19 Fällen der vorliegenden Studie zeigte sich ein hypoplastischer Hypophysenvorderlappen.

Eine hyperplastische Adenohypophyse war dagegen in nur einem Fall zu erkennen. Es handelt sich hier um das Kind, bei dem im Rahmen der Sequenzierung von PROP-1 eine compound-heterozygote Mutation auffiel.

In jeweils sieben Fällen waren Lage der Neurohypophyse sowie Größe des Hypophysenvorderlappens nicht beurteilt worden.

Es existieren zahlreiche Artikel zu MRT-Befunden beim Vorliegen einer kombinierten hypophysären Insuffizienz.

Fujisawa et al. 1987 und Kikuchi et al. 1988 beschreiben eine Durchtrennung des Hypophysenstiels sowie eine ektopie Neurohypophyse bei Kindern mit peri-

natalen Ereignissen. Die Autoren sehen in der traumatisch-ischämischen Schädigung die primäre Ursache für eine Insuffizienz der Produktion hypophysärer Hormone.

Es muss allerdings erwähnt werden, dass es durchaus Autoren gibt, welche die vorangehenden Beobachtungen nicht teilen. So konnten Argyropoulou et al. 1992 keinen Zusammenhang zwischen einem durchtrennten Hypophysenstiel und perinatalen Ereignissen bei Patienten mit kombinierter hypophysärer Insuffizienz erkennen.

Osorio et al. stellten 2002 fest, dass sämtliche Fälle genetisch bedingter CPHD in einer Studie mit 76 Probanden mit intaktem Hypophysenstiel und orthotoper Hypophyse einhergehen. Im Rahmen der vorliegenden Studie waren zahlreiche Veränderungen der Ausprägung von Hypophyse und Hypophysenstiel auffallend. Außerdem wies eine nicht zu vernachlässigende Anzahl an Probanden eine Ektopie der Neurohypophyse vor. Derartige Veränderungen lassen sich mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Osorio nicht in Einklang bringen.

Auch Maghnie et al. postulierten 2004, eine Ektopie der Neurohypophyse trete nicht bei Patienten mit Mutationen in PROP-1 oder PIT-1 auf. Eine unauffällige, zu kleine oder auch zu große Adenohypophyse sei dagegen durchaus mit PROP-1- oder PIT-1-Mutationen vereinbar. Derartige Veränderungen sollten eine molekulare Analyse von PROP-1, PIT-1 und weiteren pituitären Transkriptionsfaktoren nach sich ziehen.

Aus einer Gruppe von 43 Probanden, die anhand ihres klinischen Gesamtbildes geeignet für diese Studie schienen, konnte eine genetische Untersuchung bei 31 Probanden durchgeführt werden.

Lediglich bei einem der untersuchten Kinder gelang der Nachweis einer Mutation in PROP-1. Somit liegt der Anteil der Mutationsträger im ausgewählten Kollektiv bei 2,3 %.

Bei vier Kindern zeigte sich eine Substitution von Alanin durch Threonin an Position 142 des PROP-1-Proteins. Dies ist ein bereits beschriebener Polymorphismus.

Da es sich bei den Probanden in den meisten Fällen um die einzigen Betroffenen innerhalb einer Familie handelte, mit Ausnahme des bereits unter 2.2.1 erwähnten Geschwisterpaares, kann bei den übrigen Probanden von sporadischen Formen von CPHD ausgegangen werden.

Nach einer Studie von Turton et al. aus dem Jahr 2005 sind Mutationen in PROP-1 nur selten als Ursache einer sporadischen Form kombinierter hypophysärer Ausfälle zu finden.

Die Mutation, welche bei PR 38 gefunden wurde (1-BP Del 150 + 2-BP Del 301AG), war bereits 2001 von Riepe et al. beschrieben worden. Zwei Brüder, compound heterozygot für die Mutation 1-BP Del 150 + 2-BP Del 301AG, wiesen eine kombinierte Insuffizienz hypophysärer Hormone auf. Es lag ein Mangel an WH, TSH und Prolactin sowie der gonadotropen Hormone vor. Darüber hinaus war eine zunehmende Insuffizienz der Ausschüttung von ACTH zu beobachten.

Das Vorhandensein einer compound heterozygoten Mutation bei Proband PR 38 ergibt die Notwendigkeit, in regelmäßigen Abständen eine Überprüfung der gonadotropen sowie corticotropen hypophysären Achse vorzunehmen. Der spontane Beginn der Pubertät könnte ausbleiben, eine Substitution mit Sexualhormonen notwendig werden. Ebenso könnte sich, unter Umständen erst im dritten oder vierten Lebensjahrzehnt, die Notwendigkeit einer Substitution mit Cortison ergeben.

Bereits 1998 wurden die bei vier Probanden dieser Studie gefundenen Veränderungen von Duquesnoy et al. bei einer Kontrollgruppe ohne jegliche Form von Wachstumsstörung beobachtet und als Polymorphismus ohne Krankheitswert gedeutet. Es handelt sich zum einen um den Austausch eines Nukleotides in Codon 9 von Exon 1. Anstelle GCT (Wildtyp) findet sich die Abfolge GCC (Polymorphismus). Das Genprodukt bleibt in diesem Fall Alanin. Des Weiteren beschrieben wird ein Austausch von G durch A an Position 424 in Exon 3 (GCC wird zu ACC), woraus der Ersatz von Alanin durch Threonin an Position 142 des Genproduktes resultiert.

Die dritte Veränderung im Sinne eines Polymorphismus findet sich in Intron 1. Im ersten Codon kann das dritte Nukleotid A oder G lauten.

Auch Deladoëy et al. beschrieben 1999 diesen Polymorphismus.

Maßgeblich motiviert wurde diese Arbeit durch eine Studie aus dem Jahr 2004. Es handelt sich hierbei um eine retrospektive Studie der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Leipzig.

Die Probanden besagter Studie umfassen eine Gruppe von 46 Patienten mit CPHD. Diese wurden im durchschnittlichen Alter von 4,9 Jahren aufgrund einer schweren Wachstumsstörung in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin vorgestellt. Zum Zeitpunkt der erstmaligen Vorstellung lag die durchschnittliche Größe bei -3,7 SDS.

Neun dieser 46 Patienten wiesen eine Mutation in PROP-1 auf. Diese neun Patienten wurden über einen Zeitraum von drei bis 33 Jahren von einer konstanten Gruppe von Ärzten betreut.

Die Diagnose eines TSH-Mangels wurde bereits früh im klinischen Verlauf basierend auf einer insuffizienten Antwort im TRH-Test gestellt. Bemerkenswert ist an dieser Stelle, dass die basalen TSH-Werte zeitgleich noch im Normbereich lagen. Die TSH-Antwort im TRH-Test nahm im Laufe der Zeit zunehmend ab. Dies traf auch auf die im Rahmen des TRH-Tests bestimmten Prolactin-Spiegel zu.

Diejenigen sieben Patienten, welche innerhalb des Beobachtungszeitraumes das Pubertätsalter erreichten, benötigten allesamt eine Substitution mit Sexualhormonen.

Alle neun Patienten mit PROP-1-Mutation entwickelten letztlich eine behandlungsbedürftige Insuffizienz an ACTH. Sieben der neun Patienten erhielten eine regelmäßige Substitution in niedriger Dosierung, die beiden übrigen hingegen wurden nur im Rahmen des Auftretens klinischer Symptome substituiert.

Die in der Leipziger Klinik routinemäßig durchgeführte pharmakologische Testung der Funktion der hormonellen Achsen des Hypophysenvorderlappens

ergab eine progrediente Abnahme der Spitzenwerte von WH, TSH, Prolactin sowie LH und FSH.

Bei sechs der neun Patienten mit nachgewiesenem Defekt in PROP-1 fand sich im kerspintomographischen Bild des Schädels ein hypo- oder aplastischer Hypophysenvorderlappen. Der Hypophysenstiel und der Hinterlappen der Hypophyse stellten sich dagegen unauffällig dar. Bei einigen Patienten zeigte sich eine Veränderung der Morphologie im Sinne des Überganges von einer normalen zu einer hypo- oder gar hyperplastischen Hypophyse.

Die meisten der Patienten waren homozygot für die Mutation 2-BP Del 301AG (n=5) oder compound heterozygot für 2-BP Del 301AG und 1-BP Del 150 (n=3). Ein Patient war compound heterozygot für die Mutation 1-BP Del 150 in Kombination mit einer bis dato nicht beschriebenen Veränderung in Intron 1, welche den korrekten Splicing-Vorgang der mRNA beeinflusst.

Führt man nun einen Vergleich zwischen der Leipziger und der vorliegenden Studie durch, so muss sich die Frage stellen, aus welchem Grund in der Tübinger Studie eine Mutation in PROP-1 bei lediglich einem der Probanden gefunden wurde?

Im Folgenden sollen vor allem Überlegungen zu den nachfolgenden zwei Bereichen angestellt werden:

Möglichkeit einer ungünstig gewählten Methode

Möglichkeit eines ungünstig gewählten Kollektivs

### **Möglichkeit der Wahl einer ungünstigen Methode**

In Anlehnung an die bereits genannte Referenzstudie der Arbeitsgruppe der Universität Leipzig wurden Arbeitsmaterialien desselben Herstellers verwendet. Ein Screening auf die gesuchte Mutation mittels HPLC (high pressure liquid chromatography) wurde nicht durchgeführt. Das in dieser Arbeit angewandte PCR-Schema weicht ebenfalls an einigen Stellen vom PCR-Schema der Leip-

ziger Arbeitsgruppe ab, jedoch hat sich das hier eingesetzte Schema in zahlreichen Probeläufen als für diese Studie am effektivsten etabliert.

Im Rahmen der Bearbeitung der letzten Probe (PR 38) konnte kein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden. Da es nicht möglich war, die beiden Sequenzen zu lesen, kam daher die Methode des TA-Cloning zum Einsatz.

Hierdurch konnte im Rahmen der Sequenzierung die vorhandene Mutation dargestellt werden.

### **Möglichkeit der Wahl eines ungünstigen Kollektivs**

Bei den Probanden dieser Studie handelt es sich um Kinder nicht blutsverwandter Eltern. Die Veränderungen in PROP-1 werden in autosomal-rezessivem Erbgang weitergegeben, daher kommt es bei Kindern, welche aus Beziehungen zwischen Blutsverwandten hervorgehen, besonders häufig zur Manifestation genetisch bedingter, kombinierter hypophysärer Ausfälle (Asteria et al. 2000, Lazar et al. 2003, Salemi et al. 2003, Vieira et al. 2003). Sind innerhalb einer Familie, unabhängig von Blutsverwandtschaft, mehrere Mitglieder von CPHD betroffen, steigt ebenfalls die Nachweiswahrscheinlichkeit monogenetischer Ursachen, so auch von Mutationen in PROP-1. Im Kollektiv dieser Studie gab es lediglich einen familiären Fall (PR 5 und 6).

Alternative Ursachen einer kombinierten Insuffizienz hypophysärer Hormone, wie beispielsweise Trauma oder Infektion, führen zu einem Beginn der Symptomatik bereits kurz nach Geburt (Pfäffle et al. 1999). Drei der 43 Probanden erfüllten die Kriterien eines hypotrophen Neugeborenen (bei insgesamt acht Probanden war eine Überprüfung auf Hypotrophie bei Geburt aufgrund mangelnder Daten nicht möglich).

Dies könnte bereits als Hinweis auf den Beginn einer zunehmenden Wachstumsstörung verstanden werden. Im Rahmen einer Mutation in PROP-1 hingegen finden sich zum Zeitpunkt der Geburt keine Zeichen des sich entwickelnden Hypopituitarismus (Mody et al. 2002). Die Wachstumsstörung zeigt sich erst deutlich später in der Kindheit, die Diagnose wird meist um Alter von sechs oder

sieben Jahren gestellt (Parks et al. 1999, Deladoey et al. 1999, Nogueira et al. 1999).

Probanden der Leipziger Arbeitsgruppe zeigten im kernspintomographischen Bild des Schädels stets einen unauffälligen Hypophysenstiel sowie in keinem Fall eine Ektopie der Neurohypophyse.

Bei den Probanden der aktuellen Studie hingegen fand sich ein hypoplastischer Stiel der Hypophyse bei 19 Probanden, eine Ektopie der Neurohypophyse stellte sich bei 11 Probanden dar (es muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass sieben Probanden eine ektope Neurohypophyse sowie einen hypoplastischen Hypophysenstiel aufwiesen). Somit fanden sich Auffälligkeiten im MRT des Schädels bei rund 56 % der Probanden. Wie bereits zur Darstellung gekommen, ist der Befund einer hypo- oder hyperplastischen Hypophyse durchaus mit einer genetischen bedingten CPHD vereinbar. Eine Ektopie des Hypophysenhinterlappens sowie Fehlbildungen im Bereich des Stiels der Hypophyse gehen dagegen häufig mit idiopathischen Ursachen kombinierter hypophysärer Ausfälle einher.

Die Arbeitsgruppe der pädiatrischen Endokrinologie in Leipzig konnte bis heute zahlreiche Proben von Patienten mit Hypopituitarismus untersuchen. Darunter befinden sich auch einige Patienten mit einer Mutation in PROP-1. Der größte Anteil entfällt bei diesen Patienten auf die Deletion von zwei Basenpaaren in Exon 2 (2-BP Del 301AG) sowie die Deletion eines Basenpaares, ebenfalls in Exon 2 (1-BP Del 150, compound heterozygot mit 2-BP Del 301AG). Eine besonders hohe Frequenz dieser Mutationen verzeichneten die Forscher in Ländern Osteuropas wie beispielsweise Polen, Tschechien oder Litauen. In diesem Zusammenhang entstand der Eindruck eines deutlichen "Ost-West-Gefälles".

Da die Probanden der vorliegenden Studie und deren Familien meist aus der Region und damit dem Westen Europas stammen, macht dies das Vorhandensein von Mutationen in PROP-1 eher unwahrscheinlich.

## 6. Zusammenfassung

Störungen von Wachstum und Entwicklung stellen einen der häufigsten Gründe für eine Vorstellung beim Arzt im Kindesalter dar.

Die Ursachen für derartige Störungen sind vielfältig. In zahlreichen Fällen liegt keine isolierte Störung der somatotrophen hypophysären Achse und somit kein reiner Mangel an Wachstumshormon vor. Häufig sind weitere hypophysäre Achsen betroffen. Ein derartiges Krankheitsbild wird als kombinierte hypophysäre Insuffizienz (CPHD) bezeichnet. Mögliche Ursachen kombinierter hypophysärer Ausfälle sind unter anderem in Störungen hypophysärer Transkriptionsfaktoren zu suchen. Die hierdurch bedingte Klinik ist geprägt von einer ausgesprochenen Variabilität in Bezug auf Zeitpunkt des Auftretens sowie Schwere der möglichen Ausfälle.

Die vorliegende retrospektive Untersuchung von Kindern, welche im Rahmen einer Therapie mit Wachstumshormon eine zentrale Hypothyreose entwickelten, diente zum einen der Darstellung des klinischen Verlaufs dieser Kinder und Jugendlichen. Zum anderen sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine Mutation im „paired-like homeodomain“ Transkriptionsfaktor-Gen PROP-1 der Hypophyse als Ursache der hypophysären Ausfälle in Frage kommt.

Um dieses Ziel zu erreichen, erfolgte eine ausführliche klinische Evaluation sowie Beschreibung der endokrinologischen Testverfahren. Bildgebende Verfahren zur Darstellung atypischer Morphologien der Hypophyse und eventuell vorhandener zerebraler Fehlbildungen sowie eine Auflistung vorhandener Begleiterkrankungen dienen der Vervollständigung der klinischen Charakterisierung. Darüber hinaus wurde eine Sequenzierung der drei Exons von PROP-1 bei 31 Probanden durchgeführt.

Bei einem Kind wurde eine compound heterozygote PROP-1-Mutation nachgewiesen (2,3 % aller Probanden).



## 6. Zusammenfassung

---

Der unter WH-Therapie sekundär auftretende zentrale Mangel an Schilddrüsenhormon wird folglich nicht durch PROP-1-Defekte verursacht. In Zukunft müssen daher neue „Kandidatengene“ benannt und untersucht werden, deren Mutationen diese Sequenz verursachen können.

## **7. Literaturverzeichnis**

### **Artikel :**

1. Aikawa S, Sato T, Ono T, Kato T, Kato Y. High level expression of Prop-1 gene in gonadotropic cell lines. *J Reprod Dev.* 2006 Apr; 52(2): 195-201
2. Argyropoulou MI, Kiortsis DN. MRI of the hypothalamic-pituitary axis in children. *Pediatr Radiol.* 2005 Nov; 35(11): 1045-55
3. Arroyo A, Pernasetti F, Vasilyev VV, Amato P, Yen SS, Mellon PL. A unique case of combined pituitary hormone deficiency caused by a PROP1 gene mutation (R120C) associated with normal height and absent puberty. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2002 Aug; 57(2): 283-91
4. Asteria C, Oliveira JH, Abucham J, Beck-Peccoz P. Central hypocortisolism as part of combined pituitary hormone deficiency due to mutations of PROP - 1 gene. *Eur J Endocrinol.* 2000 Sep; 143(3): 347-52
5. Barlier A, Vallette-Kasic S, Manavela M, Perez M, Diaz A, Pellegrini-Bouiller I, Enjalbert A, Brue T. Pituitary development and pathology of transcription factors. *Ann Endocrinol (Paris).* 2000 Sep; 61(3): 201-7
6. Besson A, Salemi S, Gallati S, Jenal A, Horn R, Mullis PS, Mullis PE. Reduced longevity in untreated patients with isolated growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Aug; 88(8): 3664-7
7. Böttner A, Keller E, Kratzsch J, Stobbe H, Weigel JF, Keller A, Hirsch W, Kiess W, Blum WF, Pfaffle RW. PROP-1 mutations cause progressive deterioration of anterior pituitary function including adrenal insufficiency: a longitudinal analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Oct; 89(10): 5256-65
8. Brown MR, Parks JS, Adess ME, Rich BH, Rosenthal IM, Voss TC, VanderHeyden TC, Hurley DL. Central hypothyroidism reveals compound heterozygous mutations in the Pit-1 gene. *Horm Res.* 1998; 49(2): 98-102

## 7. Literaturverzeichnis

---

9. Cogan JD, Phillips JA 3<sup>rd</sup>. Growth disorders caused by genetic defects in the growth hormone pathway. *Adv Pediatr.* 1998; 45: 337-61
10. Cohen LE. Genetic regulation of the embryology of the pituitary gland and somatotrophs. *Endocrine.* 2000 Apr; 12(2): 99-106
11. Crone J, Pfaffle R, Stobbe H, Prayer D, Gomez I, Frisch H. Familial combined hormone deficiency caused by PROP-1 gene mutation. Growth patterns and MRI studies in untreated subjects. *Horm Res.* 2002; 57(3-4): 120-6
12. Dasen JS, Barbera JP, Herman TS, Connell SO, Olson L, Ju B, Tollkuhn J, Baek SH, Rose DW, Rosenfeld MG. Temporal regulation of paired-like homeodomain repressor/TLE corepressor complex and related activator is required for pituitary organogenesis. *Genes Dev.* 2001 Dec; 15(23): 3193- 207
13. Deladoey J, Fluck C, Buyukgebiz A, Kuhlmann BV, Eble A, Hindmarsh PC, Wu W, Mullis PE. "Hot spot" in the PROP1 gene responsible for combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 May; 84(5): 1645-50
14. Duquesnoy P, Roy A, Dastot F, Ghali I, Teinturier C, Netchine I, Cacheux V, Hafez M, Salah N, Chaussain JL, Goossens M, Bougneres P, Amselem S. Human Prop-1: cloning, mapping, genomic structure. Mutations in familial combined pituitary hormone deficiency. *FEBS Lett.* 1998 Oct 23; 437(3): 216-20
15. Dutour A. A new step understood in the cascade of tissue-specific regulators orchestrating pituitary lineage determination: the Prophet of Pit-1 (Prop-1). *Eur J Endocrinol.* 1997 Dec; 137(6): 616-7
16. Fofanova OV, Takamura N, Kinoshita E, Parks JS, Brown MR, Peterkova VA, Evgrafov OV, Goncharov NP, Bulatov AA, Dedov II, Yamashita S. A mutational hot spot in the Prop-1 gene in Russian children with combined pituitary hormone deficiency. *Pituitary.* 1998 Apr; 1(1): 45-9

## 7. Literaturverzeichnis

---

17. Fofanova O, Takamura N, Kinoshita E, Parks JS, Brown MR, Peterkova VA, Evgrafov OV, Goncharov NP, Bulatov AA, Dedov II, Yamashita S. Compound heterozygous deletion of the PROP-1 gene in children with combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Jul; 83(7): 2601-4
18. Kinney BA, Meliska CJ, Steger RW, Bartke A. Evidence that Ames dwarf mice age differently from their normal siblings in behavioral and learning and memory parameters. *Horm Behav.* 2001 Jun; 39(4): 277-84
19. Laml T, Preyer O, Umek W, Huber J, Hengstschlager M. Chromosomal translocation t(10;11)(q26;q13) in a woman with combined pituitary hormone deficiency. *Gynecol Obstet Invest.* 2004; 58(2): 114-6
20. Laron Z. Do deficiencies in growth hormone and insulin like growth factor-1 (IGF-1) shorten or prolong longevity? *Mech Ageing Dev.* 2005 Feb; 126(2): 305-7
21. Lazar L, Gat-Yablonski G, Kornreich L, Pertzalan A, Phillip M. PROP-1 gene mutation (R120C) causing combined pituitary hormone deficiencies with variable clinical course in eight siblings of one Jewish Moroccan family. *Horm Res.* 2003; 60(5): 227-31
22. Lee JK, Zhu YS, Cordero JJ, Cai LQ, Labour I, Herrera C, Imperato-McGinley J. Long-term growth hormone therapy in adulthood results in significant linear growth in siblings with a PROP-1 gene mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Oct; 89(10): 4850-6
23. Maghnie M, Ghirardello S, Genovese E. Magnetic resonance imaging of the hypothalamus-pituitary unit in children suspected of hypopituitarism: who, how and when to investigate. *J Endocrinol Invest.* 2004 May; 27(5): 496-509
24. Mehta A, Hindmarsh PC, Stanhope RG, Brain CE, Preece MA, Dattani MT. Is the thyrotropin-releasing hormone test necessary in the diagnosis of central hypothyroidism in children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Dec; 88(12): 5696-703
25. Mullis PE. Genetics of growth hormone deficiency. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2007 Mar; 36(1): 17-36

## 7. Literaturverzeichnis

---

26. Nakamura S, Ohtsuru A, Takamura N, Kitange G, Tokunaga Y, Yasunaga A, Shibata S, Yamashita S. Prop-1 gene expression in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Jul; 84(7): 2581-4
27. Nakamura Y, Usui T, Mizuta H, Murabe H, Muro S, Suda M, Tanaka K, Tanaka I, Shimatsu A, Nakao K. Characterization of Prophet of Pit-1 gene expression in normal pituitary adenomas in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Apr; 84(4): 1414-9
28. Nascif SO, Vieira TC, Ramos-Dias JC, Lengyel AM, Abucham J. Waxing and waning of a pituitary mass in a young woman with combined pituitary hormone deficiency (CPHD) due to a PROP-1 mutation. *Pituitary.* 2006; 9(1): 47-52
29. 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. *Mol Genet Metab.* 1999 May; 67(1): 58-61
30. Nose O, Tatsumi K, Nakano Y, Amino N. Congenital combined pituitary hormone deficiency attributable to a novel PROP-1 mutation (467inst). *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2006 Apr; 19(4): 491-98
31. Olson LE, Dasen JS, Ju BG, Tollkuhn J, Rosenfeld MG. Paired-like repression/activation in pituitary development. *Recent Prog Horm Res.* 2003; 58: 249-61
32. Osorio MG, Marui S, Jorge AA, Latronico AC, Lo LS, Leite CC, Estefan V, Mendonca BB, Arnhold IJ. Pituitary magnetic resonance imaging and function in patients with growth hormone deficiency with and without mutations in GHRH-R, GH-1, or PROP-1 genes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Nov; 87(11): 5076-84
33. Osorio MG, Kopp P, Marui S, Latronico AC, Mendonca BB, Arnhold IJ. Combined pituitary hormone deficiency caused by a novel mutation of a highly conserved residue (F88S) in the homeodomain of PROP-1. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Aug; 85(8): 2779-85
34. Parks JS, Adess ME, Brown MR. Genes regulating hypothalamic and pituitary development. *Acta Paediatr Suppl.* 1997 Nov; 423: 28-32

## 7. Literaturverzeichnis

---

35. Pavel ME, Hensen J, Pfaffle R, Hahn EG, Dorr HG. Long-term follow-up of childhood-onset hypopituitarism in patients with the PROP-1 gene mutation. *Horm Res.* 2003; 60(4): 168-73
36. Pfaffle R, Blankenstein O, Wuller S, Heimann K, Heimann G. Idiopathic growth hormone deficiency: a vanishing diagnosis? *Horm Res.* 2000; 53 Suppl 3: 1-8
37. Pfaffle RW, Blankenstein O, Wuller S, Kentrup H. Combined pituitary hormone deficiency: role of Pit-1 and Prop-1. *Acta Paediatr Suppl.* 1999 Dec; 88(433): 33-41
38. Pfaffe RW, Kim C, Blankenstein O, Kentrup H. GH transcription factors. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 1999 Apr; 12 Suppl 1: 311-7
39. Pfaffle RW, Martinez R, Kim C, Frisch H, Lebl J, Otten B, Heimann G. GH and TSH deficiency. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1997; 105 Suppl 4: 1-5
40. Radetti G, Zavallone A, Gentili L, Beck-Peccoz P, Bona G. Foetal and neonatal thyroid disorders. *Minerva Pediatr.* 2002 Oct; 54(5): 383-400
41. Rainbow LA, Rees SA, Shaikh MG, Shaw NJ, Cole T, Barrett TG, Kirk JM. Mutation analysis of POUF-1, PROP-1 and HESX-1 show low frequency of mutations in children with sporadic forms of combined pituitary hormone deficiency and septo-optic dysplasia. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005 Feb; 62(2): 163-8
42. Riepe FG, Partsch CJ, Blankenstein O, Monig H, Pfaffle RW, Sippell WG. Longitudinal imaging reveals pituitary enlargement preceding hypoplasia in two brothers with combined pituitary hormone deficiency attributable to PROP1 mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Sept; 86(9): 4353-7
43. Rodriguez R, Andersen B. Cellular determination in the anterior pituitary gland: PIT-1 and PROP-1 mutations as causes of human combined pituitary hormone deficiency. *Minerva Endocrinol.* 2003 Jun; 28(2): 123-33

44. Salemi S, Besson A, Eble A; Gallati S, Pfaffle RW, Mullis PE. New N-terminal located mutation (Q4ter) within the POU1F1-gene (PIT-1) causes recessive combined pituitary hormone deficiency and variable phenotype. *Growth Horm IGF Res.* 2003 Oct; 13(5): 264-8
45. Skelly RH, Korbonits M, Grossman A, Besser GM, Monson JP, Geddes JF, Burrin JM. Expression of the pituitary transcription factor Ptx-1, but not that of the trans-activating factor Prop-1, is reduced in human corticotroph adenomas and is associated with decreased alpha-subunit secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Jul; 85(7): 2537-42
46. Sloop KW, McCutchan Schiller A, Smith TP, Blanton JR Jr, Rohrer GA, Meier BC, Rhodes SJ. Biochemical and genetic characterization of the porcine Prophet of Pit-1 pituitary transcription factor. *Mol Cell Endocrinol.* 2000 Oct 25; 168(1-2): 77-87
47. Sornson MW, Wu W, Dasen JS, Flynn SE, Norman DJ, O'Connell SM, 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.* 1996 Nov 28; 384(6607): 327-33
48. Teinturier C, Valette S, Adamsbaum C, Bendaoud M, Brue T, Bougneres PF. Pseudotumor of the pituitary due to PROP-1 deletion. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2002 Jan; 15(1): 95-101
49. Turton JP, Mehta A, Raza J, Woods KS, Tiulpakov A, Cassar J, Chong K, Thomas PQ, Eunice M, Ammini AC, Bouloux PM, Starzyk J, Hindmarsh PC, Dattani MT. Mutations within the transcription factor PROP1 are rare in a cohort of patients with sporadic combined pituitary hormone deficiency (CPHD). *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005 Jul; 63(1): 10-8
50. Usui T, Nakamura Y, Mizuta H, Murabe H, Muro S, Suda M, Tanaka K, Tanaka I, Shimatsu A, Nakao K. Functional significance of Prop-1 gene expression in pituitary adenomas. *Endocr J.* 2000 Mar; 47 Suppl; S85-9
51. Vallette S, Pellegrini-Bouiller I, Jaquet P, Enjalbert A, Brue T. Transcription factors of the anterior pituitary and combined hypopituitarism. *Ann Endocrinol (Paris).* 1999 Sep; 60(3): 216-23

52. Vieira TC, Dias da Silva MR, Cerutti JM, Brunner E, Borges M, Arnaldi LT, Kopp P, Abucham J. Familial combined pituitary hormone deficiency due to a novel mutation R99Q in the hot spot region of Prophet of Pit-1 presenting as constitutional growth delay. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jan; 88(1): 38-44
53. Wu W, Cogan JD, Pfaffle RW, Dasen JS, Frisch H, O'Connell SM, Flynn SE, Brown MR, Mullis PE, Parks JS, Phillips JA 3<sup>rd</sup>, Rosenfeld MG. Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet.* 1998 Feb; 18(2): 147-9

### **Bücher:**

1. Gruber, Basics Pädiatrie, 1. Auflage 2006, Urban und Fischer
2. Horn, Lindenmeier, Moc, Grillhösl, Berghold, Schneider, Münster, Biochemie des Menschen, 2. Auflage 2003, Thieme
3. Kruse, Pädiatrische Endokrinologie, 2. Auflage 1999, Thieme
4. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 259. Auflage 2002, de Gruyter



## 8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Beispiel für Perzentilenkurven der Körpergröße von Jungen (blau) und Mädchen (rosa)	3
Abb. 1.2: Einflussfaktoren von Wachstum und Entwicklung	8
Abb. 1.3: Histologisches Bild von Zellen des Hypophysenvorderlappens	11
Abb. 1.4: Rekombinant durch E. coli hergestelltes Wachstumshormon	13
Abb. 1.5: Wachstumshormon-Regelkreis	14
Abb. 2.1: Mangelprofil zum Diagnosezeitpunkt	29
Abb. 3.1: Kit zur DNA-Extraktion	33
Abb. 3.2: Beispiel einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
Abb. 3.3: Gelelektrophoresekammer	38
Abb. 3.4: Foto des Agarosegels nach Färben mit Ethidiumbromid	40
Abb. 3.5: Kit zur DNA-Reinigung	41
Abb. 4.1: Zeitpunkt der Diagnose eines TSH-Mangels	52
Abb. 4.2: Darstellung der compound heterozygoten Mutation bei Proband PR 38 im Vergleich mit dem Wildtyp	57
Abb. 4.3: Darstellung des Polymorphismus A 142 T bei Proband PR 11	58

## 9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Beispiele für hypothalamische Neuropeptide	9/10
Tab. 1.2: Ursachen primären Minderwuchses	16
Tab. 1.3: Ursachen sekundären Minderwuchses	17/18
Tab. 1.4: Genetische Ursachen für Wachstumshormonmangel (nach Cogan et al., 1998)	19
Tab. 1.5: Ursachen primären Hochwuchses	20
Tab. 1.6: Ursachen sekundären Hochwuchses	21
Tab. 1.7: PROP-1 Mutationen (nach Wu et al.)	24
Tab. 1.8: PROP-1 Mutationen und deren Erstbeschreiber	24/25
Tab. 4.1: Gestationsalter und Geburtsmaße	49
Tab. 4.2: SDS der Körpergröße zum Diagnosezeitpunkt und nach einem Jahr	49
Tab. 4.3: Wachstumshormon-Ausschüttung bei Arginin und Insulin-Test sowie Tagesprofil	51
Tab. 4.4: Morgen-Cortisol, freies Cortisol im Urin und Cortisol-Ausschüttung im Insulin-Test	53/54
Tab. 4.5: Kernspintomographische Darstellung des Hypophysen- Vorderlappens	55
Tab. 4.6: Kernspintomographische Darstellung des Hypophysen- Hinterlappens	55
Tab. 4.7: Kernspintomographische Darstellung des Hypophysen- Stiels	56

## 10. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
AGS	Adrenogenitales Syndrom
AS	Aminosäure
BMI	engl. Body mass index
BP	engl. Base pair
C	Cytidin
CPHD	engl. Combined pituitary hormone deficiency
Chr.	Chromosom
CRH	engl. Corticotropin releasing hormone
cDNA	complementary DNA
DA	Dopamin
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat
DM	Diabetes mellitus
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
EDTA	engl. Ethylene diamine tetra acetic acid
EPH	engl. Edema proteinuria hypertension
FS	Fettsäure
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
fT <sub>4</sub>	freies Tetrajodthyronin
G	Guanosin
genet.	genetisch
GH	engl. Growth hormone
GHR	engl. Growth hormone receptor
GHRH	engl. Growth hormone releasing hormone
GHRHR	engl. Growth hormone releasing hormone receptor
GI	gastrointestinal

## 10. Abkürzungsverzeichnis

---

GnRH	engl. Gonadotropin releasing hormone
HESX1	engl. Homeobox gene expressed in ES cells
HPL	Humanes Plazentalaktogen
HSV	Herpes simplex Virus
IGF-I	engl. Insulin-like growth factor I
IGF-II	engl. Insulin-like growth factor II
IUGR	engl. Intrauterine growth retardation
KEV	Konstitutionelle Entwicklungsverzögerung
LH	Luteinisierendes Hormon
LHRH	Luteinisierendes Hormon Releasing Hormon
MSH	Melanozyten stimulierendes Hormon
mRNA	messenger RNA
OD	Optische Dichte
P	Perzentile
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIT-1	engl. Pituitary-specific transcription factor 1
POU1F1	engl. POU domain, class 1, transcription factor 1
PRL	Prolactin
PROP-1	engl. Prophet of PIT-1
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SDS	engl. Standard deviation score
SIH	Somatostatin
T	Thymidin
T <sub>4</sub>	Tetraiodthyronin, Thyroxin
TRH	engl. Thyrotropin releasing hormone
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
U	Unit
VNS	Vegetatives Nervensystem
WH	Wachstumshormon
ZNS	Zentrales Nervensystem

---

# 11. Anhang

## 1. DNA-Sequenz von PROP-1

1        gcatcccggg ggggagaagg gccaggcaga gaaaagtagt cagaaacaga  
          gcaacagggtg

61        aggctgaggc aggagattga gctgacactc aagccaagga agggggaatt  
          aggaacaat

121      tagaaaaaaa gtaaagacag tgaaaaagtc agagacagct gcctgcacct  
          acacacacat

181      tcagagacag agtcccagag ggtggcatac acagagggag aaggggaggg  
          aacagggtg

241      gagaggagct gcggaagcag agaaatctca agtcagagat tcagggacac  
          ttgtccccg

301      tggcgagcca tggaagcaga aaggaggcgc caggctgaga agccaaagaa  
          ggggcgagtc

361      ggcagcagcc tgttgctga gagacacccg gccactggga ccccgaccac  
          cacggtggac

421      tcgagtgtc caccctgcag aaggctcct ggtgcaggag gggggagatc  
          aaggttctc

481      ccgaaggag gacagagggg ccgcccgcac tcccggcgcc gccaccgcac  
          cacctcagc

541      ccagtgcagt tggaacagct ggagtcagcc ttgggagga accagtacc  
          cgacatctgg

601      gcccagagaga gtcttgcccg ggacactggc ctcagtgagg cccgaatcca  
          ggtctggtc

661      cagaaccgca gagctaagca acggaagcaa gagcgtcac tgcttcagcc  
          tctggccat

721      ctgtctcctg ccgcctttc cagcttctg ccagagtcca ctgcttgccc  
          ctattctac

781      gcagcaccac caccaccagt gacctgctc cctcaccct acagccatgc  
          cctcccttc

---

841 cagccctcca caggaggcgc ctttgcttg tcacaccagt ctgaggactg  
gtaccctacc

901 ttgcaccag cccctgccgg ccatctgcc tgccccccac cccctccat  
gctccccctc

961 agccttgagc catccaagtc ctggaactga ggtcaaaca gtaccacca  
ggtgatcccc

1021 agcctgcggc cctcgtgaaa agacaagaaa atgggggtggc ttccttcca  
tctatgggtg

1081 aagcagatgc atggtgaggg tcagctcacc gattagaaat ttaaaaatgg  
gagatcatgg

1141 tgaattctca ctggggtgat tagtggagga agtctgggga ggtgagctac  
tggaagagac

1201 agggcaagat gcctcgggtg agctgcctgc tgaagggtga tattgatgaa  
gacagttgct

1261 ggtgagtgga gatgattgaa gggctaggag gtgagggcct tcattaattg  
agatcacgat

1321 tgaagaagat cccagctctt tctggctgat ttcagtaagg cttctgactt  
aagagtctac

1381 ctatacatcc ctccccatt gccacccccg ccatctcaat cagtcactga  
ctttgttta

1441 ttctgtccta gaataccttt ttt

## 2. AS-Sequenz des PROP-1-Proteins

MEAEERRRQAEKPKKGRVGSLLPERHPATGTPTTTTVDSSAPPCRRLPGAGG  
GRSRFSPQGGQRGRPHSRRRHRTTFSPVQLEQLESAFGRNQYPDIWARESL  
ARDTGLSEARIQVWFQNRRAKQRKQERSLLQPLAHLSPAAFSSFLPESTACP  
YSYAAPPPPVTCTFPHYSHALPSQPSTGGAFALSHQSEDWYPTLHPAPAGHL  
PCPPPPMLPLSLEPSKSWN

### **3. Danksagung**

Beim Leiter der Sektion für pädiatrische Endokrinologie, Herrn Prof. Dr. med. M. B. Ranke möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in seine Abteilung und das mir entgegengebrachte Vertrauen beim Überlassen eines überaus spannenden Themas bedanken.

Dem Betreuer meiner Arbeit, Herrn PD Dr. med. G. Binder, danke ich für sein Verständnis, die große Geduld, mit der er mich an das Thema herangeführt hat, und die vielen Stunden, in denen er mir Rede und Antwort gestanden hat. Seine Ideen und seine Kritik haben diese Arbeit maßgeblich mitgestaltet.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern des Hormonlabors und den Schwestern der endokrinologischen Ambulanz für ihre Hilfe und ihr Verständnis.

Mein besonderer Dank gilt Frau Christina Urban, MTA, die mir durch ihre tatkräftige Unterstützung immer wieder dazu verholfen hat, ein großes Stück voranzukommen.

Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. R. Pfäffle, Universitätskinderklinik Leipzig, für die ausführliche Beantwortung meiner Fragen zur Häufigkeit von Mutationen in PROP-1 in verschiedenen Regionen und Ländern.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich dafür, dass sie mich in meinem gesamten Studium und besonders auch bei dieser Arbeit immer und ohne jeden Vorbehalt unterstützt haben.

## 4. Lebenslauf

Julia Maria Erhardt

geboren am 1. März 1983 in Tübingen

Ausbildung:           1989-93 Hohenberg-Grundschule in Rottenburg a.N.  
                          1993-2002 Eugen-Bolz-Gymnasium in Rottenburg a.N.  
                          Abitur 2002  
                          Seit Oktober 2002 Medizinstudium an der Eberhard-  
                          Karls-Universität in Tübingen, Physikum Sommer 2004,  
                          Staatsexamen 11.11.2008  
                          Krankenpflegepraktikum auf der kinderchirurgischen Stati-  
                          on der Kinderklinik Tübingen  
                          Famulaturen in der Inneren Medizin im Spital zum hl.  
                          Geist in Rottenburg a.N.,  
                          in der klinischen Genetik sowie der Pädiatrie der Universi-  
                          tätsklinik Tübingen,  
                          in der pädiatrischen Intensivmedizin des KH Split,  
                          Kroatien,  
                          in der Pädiatrie im Kreiskrankenhaus Heidenheim  
                          Praktisches Jahr im Klinikum am Steinenberg, Reutlingen

Besonderes:           Seit Oktober 2002 Mitglied des AK Teddybärenklinik der  
                          Fachschaft Medizin der Eberhard-Karls-Universität Tübin-  
                          gen  
                          Ehrenamtliche Mitarbeit als Tutor im Anatomie-Seminar,  
                          im Rahmen des Mentorenprogramms für Erstsemester der  
                          Medizin in Tübingen, als studentischer Ansprechpartner  
                          am Studientag sowie im Wochenpraktikum Pädiatrie