„BESCHREIBUNG DREI NEUER ENDOKRINOLOGISCHER SYNDROME“

Habiltationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach

Kinderheilkunde

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charite - Universitätsmedizin Berlin

von
Dr. med. Heiko Krude

Geboren am 20.März 1964 in Essen

Dekane: Prof. Dr. Joachim Dudenhausen / Prof. Dr. Martin Paul

Eingereicht im September 2003
Datum der Habilitation: 17. 05. 2004

Gutachter: 1. Prof. Voigt

2. Prof. Mann

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 2

1.1 Molekulare pädiatrische Endokrinologie 2

1.2 Alte und neue Regelkreise 3

1.3 Neue Gene für alte Drüsen 5

2 BESCHREIBUNG DER SYNDROME 7

2.1 Der Proopiomelanocortin (POMC) – Defekt (OMIM176830) 7
(Frühmanifeste Adipositas, sekundärer Hypocortisolismus und rote Haare)

Eigene Arbeiten:

2.1.1 Erste Mutationen im POMC Gen 9

2.1.2 Einordnung der ersten POMC Gendefekte in die Physiologie des POMC Systems 10

2.1.3 Übersicht beschriebener POMC Mutationen 11

2.1.4 Weitere Fälle von POMC Genmutationen 12

2.2 Der LHX3 Defekt (OMIM 600577) 13
(Kombinierter Hypophysenausfall und eingeschränkte Halsrotation)

Eigene Arbeiten:

2.2.1 Mutationen im LHX3 Gen 16

2.3 Der NKX2 Defekt (OMIM 600635) 17
(Kongenitale Hypothyreose mit assoziierter Choreoathetose)

Eigene Arbeiten:

2.3.1 Konzeptionelle Gruppierung der Schilddrüsen-Dysgenesien 21

2.3.2 Mutationen des TSH-Rezeptorgens 22

2.3.3 Beschreibung der ersten PAX8 Genmutationen 23

2.3.4 Zwischenbilanz der ersten Mutationen bei Schilddrüsen-Dysgenesien 24

2.3.5 Beschreibung des NKX2.1 Gendefekts 25

2.3.6 Bestätigung des neurologischen Phenotyps bei NKX2.1 Genmutationen 26

3 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK 27

4 DANKSAGUNG 35

5 LITERATURVERZEICHNIS 36

1 EINLEITUNG

1.1 Molekulare pädiatrische Endokrinologie

Viele Patienten die im Bereich der Pädiatrischen Endokrinologie betreut werden weisen primäre, angeborene Störungen des Endokrinums auf. In den meisten Fällen spielen komplexe Riskofaktoren und sekundäre Komorbiditäten eine viel geringere Rolle als in der Gruppe erwachsener Patienten und ein Rückschluß auf die molekulare primäre Pathogenese gelingt eher. Ein Neugeborenes mit einer Hypothyreose hat am ehesten eine angeborene Reifungsstörung der Schilddrüse oder einen genetischen Defekt der Schilddrüsenhormonsynthese als zum Beispiel ein hypothyreoter Erwachsener, der häufig eine autoimmune sekundäre Störung der Drüse aufweist die. Daher kann häufig die Differentialdiagnose der meist angeborenen Störungen endokriner Krankheitsbilder im Kindesalter in eine direkte Beschreibung des zugrundeliegenden angeborenen Defekts weitergeführt werden. Die pädiatrische molekulare Endokrinologie kann somit aus der klinischen Differentialdiagnose angeborener Störungen zum Erkenntnisgewinn über die molekularen Grundlagen des Endokrinums beitragen.

Entsprechend dieser Nähe der pädiatrisch-endokrinologischen Differentialdiagnose zur Beschreibung der zugrunde liegenden genetischen Störung gelang uns in den letzten Jahren die Erstbeschreibung drei neuer, bisher nicht bekannter angeborener endokrinologischer Syndrome. Basierend auf der langjährigen klinischen Betreuung einer großen Zahl von Patienten mit angeborenen Störungen des endokrinen Systems in der pädiatrisch-endokrinologischen Poliklinik der Charite (vormals des Kaiserin-Auguste-Victoria-Hauses, KAVH), konnten einzelne Kinder mit ungewöhnlichem klinischen Erscheinungsbild (Phänotyp) identifiziert und deren genetischer Defekt im Bereich der Hormonsynthese bzw Organogenese aufgedeckt werden. Neben der Klärung der jeweiligen Genfunktion für die Physiologie des Hormonsystems des Menschen stellte die Aufklärung der Gendefekte eine neue diagnostische Sicherheit für die betroffenen Familien her, die zum Teil über viele Jahre im Ungewissen über die bis dahin nicht beschriebene Erkrankung ihrer Kinder lebten. Darüber hinaus eröffneten sich aus diesen Ergebnissen grundlagenwissenschaftliche Erkenntnisse, neue diagnostische Möglichkeiten (einschließlich der Pränataldiagnostik) und neue Therapieoptionen.

1.2 Alte und neue Regelkreise

Je nach physiologischer Relevanz der geschädigten endokrinen Funktion treten die entsprechenden Symptome angeborener endokriner Störungen zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten auf. So können angeborene Störungen der Wachstumshormonfunktion bei kompletten Verlust des Wachstumshormongens bereits in den ersten Lebenstagen durch eine Unterzuckerung und nachfolgende Krampfanfälle in Erscheinung treten. Bei nur partieller Regulationsstörung des Hormons können Wachstumsdefizite erst in der zweiten Lebensdekade auftreten. Dieser Vielfalt an klinischer Manifestation steht eine relative Einfachheit der Grundorganisation des Endokrinums gegenüber.
Die grundlegenden regulativen Achsen des endokrinen Steuerungssystems sind bereits seit vielen Jahrezehnten gut beschrieben. Hierbei findet sich wiederholt das Prinzip der übergeordneten zentralnervösen Steuerung (Hypothalamus) mit einem neuro-endokrinem Übergang (Hypophyse) und den peripheren endokrinen Funktionsorganen. Neben der Wirkung der peripheren Hormone auf verschiedenste Zielzellen in verschiedenen Zielorganen schließt sich eine achsenspezifische negative Rückkopplung auf die Hormonsynthese an. Dieses Grundprinzip des Regelkreises ist das zentrale Element jeder endokrinen Funktion und wiederholt sich in den verschiedenen endokrin-regulatorischen Achsen. Im Unterschied zu anderen Regelsystemen des Körpers, zum Beispiel dem Nervensystem, weist das Endokrinum somit eine eher einfache und redundante Grundstruktur auf, die eine direkte Zuordnung eines Symptoms zu einem molekularen Defekt erleichtert. Die Interpretation gemessener Hormonkonstellationen läßt einen raschen Rückschluß auf die Störung in der jeweiligen Ebene des Regelkreises zu.

Obwohl die Grundlagen der endokrinen Regulation schon lange bekannt sind und die Steroidhormone bereits in den 50er Jahren und nachfolgend die meisten Peptidhormone identifiziert wurden, gelingen auch heute noch unerwartete Entdeckungen von Hormonen.
So wurde beispielsweise erst 1994 ein Hormon identifiziert, das eine zentrale Rolle in der Körpergewichtregulation spielt, das Leptin (Zhang et al. 1994). Seit seiner Erstbeschreibung, basierend auf der Klonierung eines für die Adipositas eines Mausstamms (ob/ob-Maus) relevanten Gens, hat das Hormon Leptin auf Grund der zunehmenden Adipositasproblematik und dem daraus resultierenden Interesse an der molekularen Ursache des Übergewichts eine sehr große Beachtung erlangt. Zuvor war

schon konzeptionell ein neuro-endokrinologischer Regelkreis zur Aufrechterhaltung der Körpergewichtskonstanz lange postuliert worden. Aber erst die Klonierung des Leptingens und der Nachweis, daß Leptin von Adipozyten proportional zur Körperfettmasse gebildet wird, ermöglichte die molekulare Beschreibung eines neuro-endokrinen Regelkreises der Gewichtsregulation (Elmquist et al. 1999). Hierbei kam einem hypothalamischen Kerngebiet, dem Nukleus arcuatus, eine große Bedeutung zu, da durch Bindung von Leptin an Neurone des Nukleus arcuatus über Vermittlung des POMC Gens eine zentralnervöse Gegenregulation ausgelöst wird, die bei Zunahme von Körperfett die Nahrungsaufnahme mit dem Kalorienverbrauch wieder ins Gleichgewicht setzt (Cone 1999).

Der molekularen pädiatrischen Endokrinologie gelang rasch nach der Klonierung des Maus-Leptingens der Nachweis, dass in der Physiologie der Gewichtsregulation des Menschen das Leptinhormon eine ähnlich zentrale Rolle zukommt wie zuvor bei Nagern beschrieben. Bei einigen wenigen Kindern mit massiver frühmanifester Adipositas konnte im Unterschied zu der großen Anzahl untersuchter adipöser Patienten, die ein erhöhtes der Fettmasse proportionales Leptin aufweisen, ein absoluter Leptinmangel ermittelt werden. Dieser Befund legte nahe, dass bei diesen wenigen Kindern eine angeborene Störung der Leptinsekretion vorliegt und dass somit der zuvor gefundene Regelkreis der Gewichtskonstanz unterbrochen zu sein scheint. Dementsprechend konnte bei diesen wenigen Kindern eine Funktionsverlust-Mutation des humanen Leptingens nachgewiesen werden (Montague et al. 1997). Durch die Gabe rekombinant hergestellten humanen Leptins konnte in einem mittlerweile drei Jahre laufenden Behandlungsversuch bei diesen wenigen extrem übergewichtigen Kindern mit Leptingendefekt das schwere Übergewicht normalisiert werden (Farooqi et al. 1999).
Somit gelang innerhalb weniger Jahre die Identifizierung eines neuen Hormons, die Beschreibung eines neuen Regelkreises der Körpergewichtsregulation, die klinische Beschreibung eines entsprechenden humanen Krankheitsbildes und die Etablierung einer Substitutionsbehandlung dieser seltenen Form der monogenen Adipositas.

Über die Beschreibung der ersten Patienten mit einem **POMC-Gendefekt,** die eine schwere frühmanifeste Adipositas aufweisen, gelang unserer Arbeitsgruppe der Nachweis, daß dieser Neurotransmitter/-Hormonvorläufer die gleiche zentrale Stellung im Leptin-Regelkreis der Gewichtsregulation des Menschen einnimmt, wie sie zuvor bei der Maus beschrieben worden war (**Kapitel 2.1**).

.

1.3 Neue Gene für alte Drüsen

Eines der ersten Gene, das aus dem menschlichen Genom kloniert wurde, war das Wachstumshormongen (Baxter et al. 1977). Mutationen des Wachstumshormongens waren dementsprechend die ersten genetischen Defekte die im Endokrinum identifiziert werden konnten (Philipps et al. 1981). Somit war der Beginn der molekularen pädiatrischen Endokrinologie eng mit den ersten Klonierungserfolgen der molekularen Humangenetik verknüpft.

In Folge dieses ersten Erfolgs der pädiatrischen molekularen Endokrinologie wurde die physiologische Bedeutung einer sehr großen Zahl von relevanten Genen des Endokrinums in seltenen aber informativen Patienten nachgewiesen. Neben den Genen, die direkt für Peptidhormone wie das Wachstumshormon oder Insulin kodieren, wurden bald auch Gene kloniert, deren Genprodukte enzymatische Funktionen in zum Teil sehr komplexen Synthesekaskaden, zum Beispiel der Steroidhormone übernehmen. Die größte klinische Bedeutung hatte in diesem Zusammenhang die Aufdeckung des genetischen Defekts der zur angeborenen Nebennierenhyperplasie (AGS) führt, dem 21-Hydroxylase-Gendefekt (White et al.1984). Die Kenntnis der häufigsten Mutationen des 21-Hydroxylasegens ermöglicht heute eine frühe und gezielte transplazentare Substitutionsbehandlung mit Glukokortikoiden im Sinne einer echten pränatalen Therapieform (New et al. 2001).

Ein neuer Schwerpunkt der molekularen pädiatrischen Endokrinologie wurde mit der Entdeckung von Genen, die die frühe embryonale Entwicklung von endokrinen Strukturen regulieren, geschaffen. Dank der vielfältigen Arbeiten in knock-out Mäusen und zunehmend auch in anderen Modellorganismen der Vertebratenembryologie, wie dem Zebrafisch, ist das Verständnis über die genetische Regulation der embryonalen Reifung der verschiedenen endokrinen Organe enorm erweitert worden. Demzufolge konnten erstmals auch Mutationen in Genen identifiziert werden, die zu einem Hormonmangel auf Grund eines genetischen Defekts der Organentwicklung führen.

Auch hier führte das frühe Interesse an der molekularen Regulation der Wachstumshormonsynthese zu der Erstbeschreibung eines Entwicklungsdefekts des Endokrinums am Beispiel der Hypophyse. Als Ursache eines kompletten Wachstumshormonmangels mit Hypophysenhypoplasie konnten Mutationen in einem PIT1 genannten Transkriptionsfaktor, der im Verlauf der embryonalen Reifung der

Hypophyse exprämiert wird, beschrieben werden (Pfäffle et al. 1992). Nachfolgend gelang der Nachweis von Mutationen in einem PROP1 genannten Transkriptionsfaktor, die ebenfalls einen Wachstumshormonmangel in Assoziation mit weiteren hypophysären Hormonausfällen verursachen (Wu et al. 1998).

Eine interessante Erkenntnis an Modellorganismen bezüglich der transkriptionalen Regulation der Organogenese ist die fehlende Organspezifität dieser frühen Entwicklungsgene. So konnte gezeigt werden, dass die gleichen Transkriptionsfaktoren während der Embryogenese in verschiedenen Organen expremiert werden und dass in diesen verschiedenen Organen bei gezielter Inaktivierung des Gens der Maus Entwicklungsdefekte auftraten. Hieraus konnte gefolgert werden, dass genetische Defekte in diesen Transkriptionsfaktorgenen zu Krankheitsbildern führen müßten, bei denen zum Beispiel der Wachstumshormonmangel nur eine Komponente eines komplexeren Syndroms darstellt. Ein Beispiel eines solchen neu beschriebenen syndromalen Mangels an Wachstumshormons als Folge einer Mutation im **Transkriptionsfaktor LHX3** wird in **Kapitel 2.2** dargestellt.

Analog zu den Befunden bei Patienten mit angeborenem Wachstumshormonmangel konnten auch bei Kindern mit angeborener Hypopthyreose molekulare Defekte auf den verschiedenen Stufen des Regelkreises beschrieben werden. So gelang der Nachweis von Mutationen im TRH-Rezeptor-Gen (Collu et al. 1997) und TSHbeta-Gen (Hayashizaki et al. 1989) mit der Folge einer zentralen, sekundären Hypothyreose . Mutationen im TSH-Rezeptorgen und den Genen die für die Synthese des Schilddrüsenhormons in der Schilddrüse kodieren, wie der Peroxidase, dem Thyreoglobulin und den Jod-Transporter NIS konnten bei Patienten mit primärer Hypothyreose und normaler Schilddrüsenstruktur beschrieben werden (Moreno et al. 2003). Defekte der Schilddrüsenreifung mit dem Ergebnis einer Schilddrüsendysgensie konnten in jüngster Zeit auf Mutationen in Transkriptionsfaktorgenen zurückgeführt werden. Dass hierbei ebenso, wie für die Hypophyse beschrieben, komplexere neue Krankheitsbilder mit Hypothyreose und assoziierten anderen Defekten resultieren können, wird in **Kapitel 2.3** am Beispiel der **NKX2.1 Genmutationen** dargelegt.

2 BESCHREIBUNG DER SYNDROME

2.1 Der Proopiomelanocortin (POMC) – Defekt (OMIM176830)

(Frühmanifeste Adipositas, sekundärer Hypocortisolismus und rote Haare)

Das Hormonvorläufer-Protein POMC war schon lange bekannt als die Ressource aus der in der Hypophyse durch post-translationale Modifikation das Adreno-Corticotrope-Hormon (ACTH) gebildet wird. Durch einen einmaligen proteolytischen Schritt mittels Prohormon-Convertase 1 (PC1) wird aus dem POMC Vorläufer Protein das ACTH-Peptid abgespalten. Darüber hinaus wird in der Haut und im Hypothalamus durch einen zweiten Proteolyseschritt (PC2) das ACTH weiter zu alpha-MSH gespalten. Gleichzeitig entsteht auf der Stufe der PC2 Spaltung aus N-terminalen Anteilen des POMC gamma-MSH und aus C-terminalen Anteilen beta-MSH (Seidah et al. 1999).

Sehr selten wurde bisher über einen angeborener Mangel des ACTH im Sinne eines sekundären Hypocortisolismus berichtet. In einem familiären Fall lag die Vermutung nahe, dass eine Mutation im Vorläufer des ACTH, dem POMC-Gen vorliegen könnte. Allerdings gelang ein Mutationsnachweis nicht (Nussey et al. 1993).

Neben der Bedeutung des ACTH für die Cortisolbildung in der Nebenniere konnte bereits in den 50er Jahren die Wirkung des MSH auf die Pigmentierung der Haut und der Haare beschrieben werden. Erst vor wenigen Jahren gelang dann der Nachweis, dass MSH-Peptide eine zentrale Rolle in der hypothalamischen Gewichtsregulatioin spielen (Fan et al. 1997). Hierfür war ausschlaggebend, dass neben dem MSH-bindenden Rezeptor in der Haut (sogenannter MC1-Rezeptor) und dem ACTH-bindenden Rezeptor der Nebenniere (MC2-Rezeptor) weitere Rezeptoren dank Ihrer Homologie zum MC1- und MC2-Rezeptor kloniert werden konnten, die im ZNS exprämiert werden (Mountjoi et al. 1992). Bei der Suche nach der physiologischen Relevanz dieser MC3- und MC4-Rezeptoren zeigte die MC4R knock-out Maus eine schwere Adipositas, so dass eine Funktion der POMC-Derivate bei der Regulation des Körpergewichts nahe lag. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass nach Bindung des Leptins an Neurone des Nukleus arcuatus des Hypothalamus die Expression des POMC-Gens deutlich hoch reguliert wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die intraventrikuläre Gabe eines potenten MSH-Analogons bei Nagern zu einer drastischen Senkung der Nahrungsaufnahme führt. Diese Befunde in Nagern zeigten eindeutig eine neue Funktion der POMC Genprodukte in der Leptin vermittelten Gewichtsregulation.

Entsprechend dieser Befunde war anzunehmen, dass Patienten mit einem POMC Gendefekt ein komplexes Krankheitsbild mit einer Pigmentveränderung (fehlende Aktivierung des Haut-MC1-Rezeptors), einem sekundären Hypocortisolismus (fehlende Aktivierung des Nebennieren-MC2-Rezeptors) und einer Adipositas (fehlende Aktivierung des hypothalamischen MC4-Rezeptors) aufweisen müßten.

In der pädiatrisch-endokrinologischen Abteilung unserer Klinik waren zwei Kinder bekannt, bei denen die typischen Symptome des angeborenen sekundären Hypocortisolismus (Unterzuckerung mit nachfolgendem Krampfanfall und neonatale Cholestase) zu der sehr seltenen Diagnose eines isolierten hypophysären ACTH-Mangels geführt hatten. Gleichzeitig fiel auf, dass beide Kinder rote Haare und eine sehr helle sonnenlichtempfindliche Haut aufwiesen. Darüber hinaus entwickelten beide Kinder bereits in den ersten Lebensmonaten eine schweres Übergewicht, das auf ein nicht-stillbares Hungergefühl zurückzuführen war. Diese bisher klinisch noch nicht beschriebene Assoziation aus ACTH-Mangel, roten Haaren und frühmanifester schwerer Adipositas, war Anlaß im Lichte der zu dem damaligen Zeitpunkt gerade verfügbaren Informationen zur Wirkung der POMC Peptide in der Gewichtsregulation der Maus, in beiden Kindern einen POMC Gendefekt zu vermuten.
In beiden Fällen konnte dieser Verdacht bestätigt werden (**siehe 2.1.1**). Aus den klinischen Beobachtungen in diesen ersten und einzigen Patienten mit POMC Gendefekt ergaben sich verschiedenen wesentliche physiologische Aspekte des POMC Systems des Menschen (**siehe 2.1.2**). Auf Grund der schweren Adipositas der POMC defizienten Kinder erlangte das POMC Gen des Menschen eine hohe Priorität als Kandidatengen einer monogenen Komponente der Adipositas die allerdings nicht bestätigt werden konnte (**siehe 2.1.3**). Mittlerweile konnten wir bei weiteren drei Kindern einen POMC-Gendefekt identifizieren und das charakteristische klinische Erscheinungsbild bestätigen (**siehe 2.1.4**).

Eigene Arbeiten zum POMC Gendefekt:

2.1.1 Erste Mutationen im POMC Gen

Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Grüters A.
Nat Genet. 1998;19(2):155-7.

Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans.

2.1.2 Einordnung der ersten POMC Gendefekte in die Physiologie des POMC Systems

Krude H, Grüters A.
Trends Endocrinol Metab. 2000;11(1):15-22.

Implications of proopiomelanocortin (POMC) mutations in humans: the POMC deficiency syndrome.

2.1.3 Übersicht beschriebener POMC Mutationen

Krude H, Biebermann H, Grüters A.
Ann N Y Acad Sci. 2003;994:233-9.

Mutations in the human proopiomelanocortin gene.

2.1.4 Weitere Fälle von POMC Genmutationen

Krude H, Biebermann H, Schnabel D, Tansek MZ, Theunissen P, Mullis PE, Grüters JCEM in press

Obesity due to proopiomelanocortin (POMC) deficiency : Three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10.

2.2 Der LHX3 Defekt (OMIM 600577)

(Kombinierter Hypophysenausfall und eingeschränkte Halsrotation)

Die Hypophyse stellt ein sehr komplexes endokrines Organe dar, da in einem relativ kleinem Volumen eine große Zahl verschiedener Zellpopulationen insgesamt 8 verschiedene Hormone produzieren. Wie bereits erwähnt, hatte die frühe Klonierung des Wachstumshormongens das wissenschaftliche Interesse an den Regulations- und Reifungsprozessen der Hypophyse stark gefördert. Neben den bereits genannten Transkriptionsfaktoren PIT1 und PROP1 sind weitere Transkriptionsfaktoren bekannt geworden, die in einem kaskadenartigen Zusammenspiel die einzelnen Schritte der Hypophysen-Organogenese regulieren (Westphal et al. 2002).
Basierend auf der Klonierung des PIT1- und PROP1-Gens aus zwei rezessiven Mausmodellen mit Kleinwuchs und Wachstumshormonmangel (dwarf-Maus und snell-Maus) und der Identifizierung der homologen menschlichen Gene gelang bereits frühzeitig der Mutationsnachweis bei Patienten mit Kleinwuchs und angeborenem Wachstumshormonamangel (Pfäffle et al. 1992, Wu et al. 1998). Dabei konnte gezeigt werden, dass weitere Hormone der Hypophyse betroffen waren. So weisen Patienten mit einem PIT1-Gendefekt neben einem Wachstumshormonmangel auch einen Prolaktinmangel und teilweise einen TSH-Mangel auf. Patienten mit einem PROP1-Mangel können darüber hinaus einen ACTH-Mangel und LH und FSH Mangel entwickeln. Neben der kombinierten Hypophysenfunktionsstörung weisen Patienten mit PIT1 und PROP1 Gendefekt keine weiteren angeborenen Störungen auf.

In der pädiatrisch-endokrinologischen Abteilung unserer Klinik wird seit vielen Jahren eine Familie betreut, in der drei Kinder mit einem kombinierten Hypophysenausfall mit verschiedenen Hormonen substituiert werden. Bei allen drei betroffenen Kindern lag das gleiche Ausfallsmuster mit einem Wachstumshormon- und Prolaktinmangel, einem TSH-Mangel und einem LH und FSH-Mangel bei erhaltener ACTH Sekretion vor. Gleichzeitig fielen die betroffenen Kinder durch eine ungewöhnliche Haltung mit kurz erscheinendem und bewegungseingeschränktem Hals auf. Die familiäre Häufung und das gleiche Muster des kombinierten Hypophysenausfalls in der konsanguinen Familie legte einen genetischen, rezessiven Defekt der Hypophysenreifung nahe. Diese Annahme wurde durch MRT-Bilder der Hypophyse der betroffenen Kinder bestätigt, die eine Hypoplasie der Adeno-Hypophyse aufzeigten.

Die bis zum damaligen Zeitpunkt publizierten genetischen Defekte der Hypophysenreifung, der PIT1 und PROP1 Defekt, waren nicht kompatibel mit dem Hormonausfallsmuster dieses familiären Falls einer Hypophysenstörung. Entsprechend konnten zunächst Defekte im PIT1 und PROP1 Gen ausgeschlossen werden.

Bei der Durchsicht der publizierten Befunde der Mausmodelle, in denen die verschiedenen Transkriptionsfaktorgene inaktiviert worden waren, fiel auf, dass der homozygote Verlust der LHX3 Genfunktion in Mäusen ein ähnliches Muster eines Hypophysenausfalls erzeugt, wie in der beschriebenen Familie (Sheng et al. 1996). Obwohl die LHX3 knock-out Mäuse im Verlauf der Embryogenese bzw. kurz nach der Geburt versterben, konnte nachgewiesen werden, dass in frühen Stadien der Hypophysenreifung einige korticotrope, POMC exprämierende Zellvorläufer angelegt werden. Alle übrigen Zellpopulationen der Hypophyse waren nicht nachweisbar. Dieser Befund der LHX3 knock-out Maus ließ einen Defekt des homologen Gens bei der Familie mit kombiniertem Hypophysenausfall mit ebenfalls erhaltener ACTH-Sekretion möglich erscheinen. Daher wurde eine Kooperation mit einer französischen Arbeitsgruppe aufgebaut, die zum damaligen Zeitpunkt das menschliche LHX3 Gen kloniert hatte und eine Mutationssuche in Patienten mit kombiniertem Hypophysenausfall durchführte (Dr. I. Netchine und Prof. S. Anselem, Paris). In dieser Kooperation zeigte sich, dass die betroffenen Familienmitglieder der Berliner Familie eine homozygote Missensmutation einer hochkonservierten Aminosäure in der sogenannten LIM-Domäne aufweisen, während die Eltern heterozygot für diese Mutation sind. Diese Befunde paßten mit dem vermuteten rezessiven Erbgang in der Familie mit konsanguinen klinisch nicht betroffenen Eltern und drei betroffenen Kindern überein.

Mit Wissen über diese ersten Ergebnisse fiel bei der klinischen Betreuung in Berlin ein weiterer Patient mit kombiniertem Hypophysenausfall auf, der zunächst eine erhaltene ACTH Sekretion hatte und ebenfalls eine ungewöhnliche Haltung mit kurzem gedrungenem und bewegungs-eingeschränktem Hals aufwies. Die Assoziation des besonderen Hormonausfallsmusters mit zunächst erhaltener ACTH Sekretion und kurzem Hals war dann Anlaß, auch in diesem Patienten nach einer LHX3 Mutation zu suchen. Auch in diesem Patient konnte eine homozygote Mutation, diesmal eine Deletion mit Splicealteration und nachfolgendem Leserasterverschub, identifiziert werden. Dieser zweite Berliner Patient bestätigte die ersten Befunde des komplexen Phänotyps einer LHX3 Genmutation mit besonderem Hormonausfallsmuster und

auffälliger cervikaler Haltungs- bzw. Rotationsanomalie, so dass dieses neue Krankheitsbild publiziert werden konnte (**siehe 2.2.1**). Die in den Berliner Familien identifizierenten Mutationen stellten die einzigen bisher nachgewiesenen und publizierten LHX3 Gendefekte dar. In parallel durchgeführten Mutationsuntersuchungen in den USA und der Schweiz gelang zum damaligen Zeitpunkt kein weiterer Mutationsnachweis (Sloope et al. Und Schmitt et al. 2000).

Eigene Arbeiten zum LHX3 gendefekt

2.2.1 Mutationen im LHX3 Gen

Netchine I, Sobrier ML, **Krude** H, Schnabel D, Maghnie M, Marcos E, Duriez B, Cacheux V, Moers A, Goossens M, Grüters A, Amselem S.
Nat Genet. 2000 ;25(2):182-6.

Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency.

2.3 Der NKX2 Defekt (OMIM 600635)

(Kongenitale Hypothyreose mit assoziierter Choreoathetose)

Die konnatale Hypothyreose tritt mit einer Inzidenz von 1 in 3500 Neugeborenen auf und repräsentiert somit die häufigste angeborene Störung des Endokrinums. Neugeborene mit einer primären Hypothyreose profitieren seit 25 Jahren von der Einführung des TSH-Neugeborenenscreenings mit dem eine frühzeitige Diagnose und Substitutionsbehandlung gewährleistet wird. In einer großen Zahl von Studien konnte nach Einführung des TSH-Neugeborenenscreenings gezeigt werden, dass die frühe Diagnose und Behandlung mit L-Thyroxin den meisten Kindern mit konnataler Hypothyreose eine normale mental-motorische Entwicklung ermöglichen (Grüters et al. 2002). Dies stellt einen der größten Erfolge der präventiven Pädiatrie dar.

Einige Kinder mit angeborener Hypothyreose erreichen trotz adäquater Diagnose und Substitutionsbehandlung nicht ein normales Entwicklungsergebnis. Neben dieser besonderen Gruppe von Patienten mit nicht optimaler Entwicklung fallen in den großen Zusammenstellungen überproportional häufig assoziierte Fehlbildungen anderer Organe auf, insbesondere des Herzens, aber auch der Nieren oder zum Beispiel ventrale Dysraphien wie eine Lippen-Kiefer-Gaumenspalte. Entsprechend einer kürzlich erschienen populationsbezogenen Arbeit aus Italien ist diese assoziierte Fehlbildungsrate mit 9% anzugeben (Olivieri et al. 2002). Aus diesen klinischen Beobachtungen ergibt sich die Frage nach der molekularen Ursache der eingeschränkten Entwicklungschance und der assoziierten Fehlbildungsrate in Subgruppen von Patienten mit konnataler Hypothyreose. Erst mit einer molekularen Diagnose ließen sich Kinder mit eingeschränkter Entwicklungschance frühzeitig erkennen, mit dem Ziel, zu Beginn der Betreuung der Eltern von Neugeborenen eine adäquate Beratung über die zu erwartenden Entwicklungschancen des Kindes anbieten zu können.

Bei etwa 15% der Patienten mit angeborener Hypothyreose findet sich eine normal angelegte Schilddrüse. Die Mehrzahl der Patienten weist dagegen eine Dysgenesie auf, die von einer leichten Hypoplasie bis zum völligen Fehlen der Drüse reichen kann. Während in der Gruppe von Patienten mit normal angelegter Schilddrüse ein Synthesedefekt des Schilddrüsenhormons nahe liegt –und entsprechend bereits vor 10 Jahren die ersten Mutationen in Genen der Schilddrüsensyntheseschritte nachgewiesen werden konnten (Moreno et al. 2003)- scheint die große Gruppe der

Patienten mit Schilddrüsen-Dysgenesie durch eine defekte embryonale Reifung der Drüse betroffen zu sein (Grüters et al. 2002). Patienten mit einem solchen Defekt der Organogenese sind in der Gruppe mit schlechtem Entwicklungsergebnis und assoziierten Fehlbildungen hauptsächlich vertreten, so dass eine gemeinsame Ursache für die Schilddrüsen-Dysgenesie, die assoziierten Fehlbildungen und die Entwicklungsdefizite vorliegen könnte.

Das erste Kandidatengen der Schilddrüsen-Dysgensie stellte der TSH-Rezeptor dar, da lange bekannt war, dass das Wachstum der Schilddrüse mittels TSH stimuliert wird und TSH bereits ab dem 4. Schwangerschaftsmonat in der fetalen Zirkulation nachweisbar ist. Ebenfalls existiert ein rezessives Mausmodell der angeborenen Hypothyreose (hyt/hyt-Maus) bei der eine Mutation des TSH-Rezeptorgens nachgewiesen werden konnte (Stein et al. 1994). Es konnte daher postuliert werden, dass eine eingeschränkte TSH-Wirkung durch eine TSH-Rezeptor-Mutation im Verlauf der Fetalperiode zu einer gestörten Ausreifung mit der Folge einer Hypoplasie der Schilddrüse führen könnte (**siehe 2.3.1**). Entsprechend dieser Annahme konnten die ersten rezessiv vererbten TSH-Rezeptor-Mutationen mit der Folge einer leichten Schilddrüsenhypoplasie von unserer Arbeitsgruppe identifiziert werden (**siehe 2.3.2**).

Da Mutationen des TSH-Rezeptorgens nur sehr selten nachweisbar waren wurden weitere Gene als Kandidaten der Pathogenese der konnatalen Hypothyreose mit Dysgenesie der Schilddrüse in Betracht gezogen. Hierbei waren insbesondere Transkriptionsfaktor-Gene, die in der Schilddrüse im Verlauf der Embryogenese exprämiert werden, von zunehmenden Interesse. In mehreren knock-out Studien dieser Transkriptionsfaktoren –PAX8, NKX2.1(synonym TTF1,Titf1), TTF2 und HEX- resultierte eine Schilddrüsendysgenesie (Kimura et al. 1996, De-Felice et al. 1998, Mansouri et al. 1998, Martinez-Barbera et al. 2000). Darüber hinaus stellten diese Gene gute Kandidaten für die Ursache der einleitend beschriebenen klinischen Phänomene einer nicht optimalen Entwicklung und assoziierter Fehlbildungen einiger Patienten mit konnataler Hypothyreose dar. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass diese Gene nicht nur in der Schilddrüsenreifung, sondern auch in der Embryogenese anderer Organe und insbesondere des ZNS eine Rolle spielen.

Basierend auf diesen Arbeiten wurden verschiedene Versuche unternommen, in den homologen Transkriptionsfaktorgenen des Menschen nach Mutationen bei Patienten mit Schilddrüsendysgenesien zu suchen. Unserer Arbeitsgruppe gelang es zusammen

mit der Gruppe von Prof. DiLauro in Neapel die ersten PAX8 Genmutationen zu diagnostizieren. In einem Berliner Fall mit dominanter Vererbung einer Schilddrüsen-Dysgensie und zwei sporadischen Italienischen Fällen konnten heterozygote Mutationen mit kompletten Funktionsverlust der betroffenen Proteine im Sinne einer Haploinsuffiziens nachgewiesen werden (**siehe 2.3.3.**). Alle betroffenen Patienten zeigten eine normale Entwicklung ohne mentale Retardierung. Mittlerweile haben wir weitere Patienten mit PAX8 Genmutationen identifiziert und bei einem Patienten fiel eine Nierenfehlbildung mit Hydronephrose auf. Dies war Anlaß zur Nachuntersuchung der initial diagnostizierten PAX8 Mutationsträger, wobei sich bei dem Sohn des Berliner familiären Falls eine einseitige Nierenagenesie fand. Diese neuen Befunde einer assoziierten Nierenfehlbildung bei PAX8 Genmutation stehen im Einklang mit den Expressiondaten des PAX8 Gens im Verlauf der Nierenentwicklung (unpublizierte Daten).

Bisher sind zwei Fälle einer TTF2 Genmutation bekannt geworden die durch ein komplexen Phänotyp mit Schilddrüsenagenesie, Lippen-Kiefer-Gaumenspalte und schwerster mentaler Retardierung charakterisiert sind (Clifton-Bligh 1998, Castanet et al. 2002). Auch hier stehen die klinischen Symptome im Einklang mit der multiplen Funktion des TTF2-Transkriptionsfaktors in der embryonalen Reifung verschiedener Gewebe wie der Schilddrüse, des Gaumens und des ZNS.

Neben diesen ersten Arbeiten zum PAX8 und TTF2-Mutationsnachweis wurden von anderen Arbeitsgruppen mehrere Versuche unternommen, Mutationen im NKX2.1 Gen nachzuweisen, die aber zunächst scheiterten (**siehe 2.3.4**). Nach Durchsicht der verschiedenen Arbeiten, die über die Defekte der NKX2.1 knock-out Maus in zunehmenden Detail publiziert wurden, ergab sich ein komplexeres Bild des NKX2.1 Gendefekts der Maus, der neben einer Schilddrüsen-Dysgenesie eine Schädigung der Lungenanlage ohne Ausbildung funktionsfähiger Alveolen (Mendelson 2000) und einen auffälligen Defekt der Frontalhirnanlage mit einer Dysgensie des Globus pallidum (Sussel et al. 1999)einschloss.

In der Gruppe von mittlerweile über 150 Kindern, die von unserer pädiatrisch endokrinologischen Arbeitsgruppe mit konnataler Hypothyreose betreut werden, fielen seit vielen Jahren zwei Jungen auf, die an einer Bewegungssstörung im Sinne einer nicht-progredienten Choreoathetose und häufigen schweren pulmonalen Infekten in Assoziation mit einer Schilddrüsen-Dysgensie erkrankt waren. Diese besondere und

bis dahin nicht publizierte Assoziation von klinischen Auffälligkeiten, die dem Phänotyp der NKX2.1 knock-out Maus ähnelte, war für uns Anlaß, gezielt nach einer Mutation im NKX2.1 Gen bei diesen beiden Patienten zu suchen. Es konnte in einem Fall eine heterozygote Deletion sowie in dem anderen Fall eine heterozygote Missensmutation mit komplettem Funktionsverlust nachgewiesen werden. Anschließend gelang der Mutatonsnachweis in zwei weiteren Kindern mit konnataler Hypothyreose und choreoathetotischer Bewegungsstörung und einem Kind mit Chorea und latenter Hypothyreose die uns aus verschiedenen Zentren zur Diagnostik zugewiesen worden waren. Anhand dieser fünf Patienten mit heterozygoten inaktivierenden Mutationen des NKX2.1 Gens konnten wir das neue genetische Krankheitsbild einer Schilddrüsenfunktionsstörung mit assoziierter Choreoathetose erstmals beschreiben (**siehe 2.3.5**).

In Zusammenarbeit mit einer Niederländischen Arbeitsgruppe konnten rasch anschließend bei familiären Fällen einer dominant vererbten nicht-progredienten Chorea, die keine Hypothyreose aufweisen, ebenfalls heterozygote NKX2.1 Genmutationen nachgewiesen werden (**siehe 2.3.6**) Diese Arbeitsgruppe hatte zunächst in einem Genomscreen den Genort der familiären nicht-progredienter Chorea auf die Region des NKX2.1 Gens auf Chromosom 14 eingrenzen können. Diese Arbeit bestätigte, dass bei einer NKX2.1 Genmutation das vorherrschende klinische Krankheitsbild die Bewegungsstörung im Sinne einer Choreoathetose darstellt.

Eigene Arbeiten zur Schilddrüsen-Dysgenesie und NKX2.1 Gendefekt

2.3.1 Konzeptionelle Gruppierung der Schilddrüsen-Dysgenesien

Krude H, Biebermann H, Gopel W, Grüters A.
Exp Clin Endocrinol Diabetes. 1996;104 Suppl 4:117-20.

The gene for the thyrotropin receptor (TSHR) as a candidate gene for congenital hypothyroidism with thyroid dysgenesis.

2.3.2 Mutationen des TSH-Rezeptorgens

Biebermann H, Schoneberg T, **Krude** H, Schultz G, Gudermann T, Grüters A.
J Clin Endocrinol Metab. 1997;82(10):3471-80.

Mutations of the human thyrotropin receptor gene causing thyroid hypoplasia and persistent congenital hypothyroidism.

2.3.3 Beschreibung der ersten PAX8 Genmutationen

Macchia PE, Lapi P, **Krude** H, Pirro MT, Missero C, Chiovato L, Souabni A, Baserga M, Tassi V, Pinchera A, Fenzi G, Grüters A, Busslinger M, Di Lauro R.
Nat Genet. 1998;19(1):83-6.

PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis.

2.3.4 Zwischenbilanz der ersten Mutationen bei Schilddrüsen-Dysgenesien

Krude H, Biebermann H, Schnabel D, Ambrugger P, Grüters A.
Horm Res. 2000;53 Suppl 1:12-8.

Molecular pathogenesis of neonatal hypothyroidism.

2.3.5 Beschreibung des NKX2.1 Gendefekts

Krude H, Schutz B, Biebermann H, von Moers A, Schnabel D, Neitzel H, Tonnies H, Weise D, Lafferty A, Schwarz S, DeFelice M, von Deimling A, van Landeghem F, DiLauro R, Grüters A.
J Clin Invest. 2002;109(4):475-80.

Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1
haploinsufficiency.

2.3.6 Bestätigung des neurologischen Phenotyps bei NKX2.1 Genmutationen

Breedveld GJ, van Dongen JW, Danesino C, Guala A, Percy AK, Dure LS, Harper P, Lazarou LP, van der Linde H, Joosse M, Gruters A, MacDonald ME, de Vries BB, Arts WF, Oostra BA, **Krude** H, Heutink P.
Hum Mol Genet. 2002 Apr 15;11(8):971-9.

Mutations in TITF-1 are associated with benign hereditary chorea.

3 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In den letzten fünf Jahren ist es uns gelungen, drei neue genetische Krankheitsbilder aus dem Kreis der pädiatrischen Endokrinologie klinisch zu beschreiben und deren genetische Grundlage aufzuklären. Hierbei waren vor allem die klinischen Erscheinungsbilder ungewöhnlicher Patienten, die neben bekannten hormonellen Ausfällen durch assoziierte Defekte auffielen, für die gezielte Suche nach genetischen Defekten ausschlaggebend. In allen drei Fällen konnten die assoziierten Symptome durch den primären genetischen Defekt molekular geklärt werden. Mittlerweile ist bei weiteren Patienten ein Mutationsnachweis gelungen und der zuerst von uns beschriebene Phänotyp konnte jeweils bestätigt werden.
Neben der Bedeutung für die Grundlagenwissenschaft, stellte die Aufklärung der drei Gendefekte einen echten Nutzen für die betroffenen Familien dar, da sie bis dahin über viele Jahre im Ungewissen über das nicht beschriebene Krankheitsbild ihrer Kinder gelebt hatten und sich aus der Beschreibung der molekularen Pathophysiologie erste neue Therapieoptionen ergeben könnten.

POMC Gendefekt

Die klinische Trias einer schweren frühmanifesten Adipositas, eines sekundären Hypocortisolismus und roter Haare war Anlaß zur Identifikation der ersten Mutationen im POMC Gen. Diese besondere Symptom-Trias spiegelt die drei Hauptfunktionen der POMC Genprodukte in der hypothalamischen Gewichtsregulation, der hypophysären Regulation der Cortisolsekretion und der Beeinflussung der Pigmentierung der Haare und der Haut wieder. Nachdem die Funktion des POMC Spaltprodukts ACTH für die Corisolsekretion aus der Nebennierenrinde und des POMC Spaltprodukts MSH für die Pigmentbildung in der Haut seit Jahrzehnten bekannt war, gelang erst 1996 der Nachweis, dass MSH-Peptide eine zentrale Rolle in der hypothalamischen Körpergewichtsregulation der Nager spielen. Entsprechend dieser neuen Befunde gelang uns 1997 der Mutationsnachweis im POMC Gen von zwei Kindern die bereits mehrere Jahre in der pädiatrischen endokrinologischen Sprechstunde mit einem ACTH Mangel betreut worden waren und bei denen eine schwere Adipositas vorlag. Darüber hinaus fiel auf, daß beide Kinder rothaarig waren. Mit dem Nachweis, daß bei POMC Gendefekt eine schwere frühmanifeste Adipositas resultiert, konnte die Bedeutung der hypothalamischen Funktion des POMC Gens in der gewichtsregulierenden

Leptinantwort, die kurz zuvor bei Nagern entdeckt worden war, für den Menschen bestätigt werden. Mittlerweile konnten wir in einer europäischen Kooperation drei weitere Kinder mit der gleichen klinischen Trias diagnostizieren und bei allen dreien fanden sich Mutationen des POMC Gens. Kürzlich gelang uns ein weiterer Mutationsnachweis bei einer konsanguinen türkischen Familie (unpublizierte Daten, Zusammenarbeit mit Dr. Akkurt, Kinderklinik Eppendorf, Hamburg). Hier zeigte sich, daß die rote Haarpigmentierung nur transient auftreten kann und sich im Verlauf der ersten Lebensjahre die Haarfarbe ins Braune änderte.

Nachfolgend wurden von anderen Arbeitsgruppen Mutationen im Rezeptor der hypothalamischen POMC Peptide, dem MC4-Rezeptor, bei Patienten mit schwerer frühmanifester Adipositas beschrieben (Yeo et al.1998, Vaisse et al. 1998). Diese Arbeiten konnten die zentrale Rolle des POMCs in der neuro-endokrinen Regulation des Körpergewichts bestätigen. Obwohl monogene Defekte nur bei sehr wenigen Kindern mit Adipositas gefunden werden –maximal 3-5% der stark übergewichtigen Kinder weisen einen MC4R Gendefekt auf (Farouqui et al. 2003)- konnte dennoch anhand der genetischen Defekte eine wesentliche Aussage zur Physiologie der Gewichtsregulation des Menschen geleistet werden. Einen besonders interessanten Aspekt stellt hierbei die Tatsache dar, daß sich insbesondere für den MC4-Rezeptor eine sehr deutliche Dosiswirkung zeigen ließ, da die meisten der bisher identifizierten Mutationsträger heterozygot sind und somit wahrscheinlich schon die Reduktion der verfügbaren MC4-Rezeptormoleküle auf die Hälfte des normalen Niveaus zu einer erheblichen Gewichtszunahme führen kann. Diese Dosisabhängigkeit konnten wir in unserer neuesten Arbeit auch für die heterozygoten POMC Mutationsträger, wenn auch in geringerem Ausmaß, nachweisen. Somit scheint ein sehr genaues Austarieren der Regulation der Genexpression dieser hypothalamischen „Schalter“ der Gewichtsregulation des Menschen einen zentralen Steuerungsmechanismus der individuellen Festlegung des Gewichtsollwertes („Set-points“) darzustellen.

Ob diese Erkenntnisse bei der Suche nach pharmakologischen Strategien zur Behandlung der normalen-endemischen Adipositas hilfreich sein werden, ist noch offen. Nach der Entdeckung des Leptins bestand für kurze Zeit die Hoffnung, daß mit der Gabe von rekombinantem Leptin ein großer Teil der übergewichtigen Patienten behandelt werden könnte. Es zeigte sich aber rasch, daß die meisten adipösen Menschen bereits sehr hohe endogene Leptinspiegel aufweisen und daß somit eine Leptinresistenz bei schwerer Adipositas vorzuliegen scheint. Entsprechend verliefen

Behandlungsversuche mit Leptin auch sehr enttäuschend (Lee et al. 2002). Daher werden nun große Hoffnungen in eine mögliche Therapieform mit POMC-MSH ähnlichen Substanzen gesetzt, die über die Aktivierung des MC4-Rezeptors zu einer Gewichtsabnahme schwer übergewichtiger Patienten führen könnten. Leider läßt sich die hypothalamische Konzentration der POMC Peptide nicht messen, so dass die entscheidende Frage, ob die nachgewiesene Leptinresistenz auf einen hypothalamischen Mangel an POMC oder auf eine Resistenz des MC4-Rezeptors zurückgeführt werden kann, nicht zu beantworten ist. Ein relativer Mangel der POMC Bildung bei schwer übergewichtigen Patienten würde eine pharmakologische Therapie mittels MC4-Rezepor Agonisten rechtfertigen. Darüber hinaus hat sich leider gezeigt, daß die kurzfristige Gabe der bisher bekannten stark MC4-Rezeptor aktivierenden Substanzen eine sexuelle Stimulation im Sinne rasch auftretender Erektionen bewirkt (Wessels et al. 2000). Diese „Nebenwirkung“, die mittlerweile als neue Indikation der POMC Peptide erprobt wird, läßt eine langfristige Gabe von diesen Substanzen als Behandlungsoption bei Adipositas als sehr unpraktikable erscheinen. Leider erschwert diese neue Entdeckung der sexuellen Stimulation den Einsatz der bisher verfügbaren hochpotenten MC4-Rezeptoragonisten für die Behandlung der schwersten Adipositas bei den von uns beschriebenen POMC defizienten Patienten.

Für unsere Arbeitsgruppe haben sich aus diesen ersten molekularen Arbeiten zur Genetik der Gewichtsregulation weitere Projekte ergeben. Studien zur Regulation der hypothalamischen POMC Genexpression führen wir zur Zeit in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Malcolm Low, Vollum Institut Portland, Oregon durch. Detaillierte Struktur-Funktions-Untersuchungen von neu beschriebenen MC4-Rezeptor Mutationen, sowie die Charakterisierung der ersten Funktionsverlustmutation des beta-MSH Peptids des POMC sind Gegenstand eines DFG-SFB Teilprojekts (577-B3) und werden in Kollaboration mit Prof. Gudermann, Universität Marburg und Dr. Tschoep, Universität Cincinnati, USA durchgeführt.

Letztlich ist es das gemeinsame Ziel dieser Arbeiten, die molekulare Grundlage des Verlusts an adäquater Körpergewichtsregulation im Verlauf der zur Zeit stattfindenden Adipositasendemie zu verstehen, und gegebenenfalls eine gezielte pharmakologische Therapie entwickeln zu können.

LHX3 Gendefekt

Die Klonierung des Wachstumshormongens vor 25 Jahren und dessen kommerzielle Verwertung in Form der Herstellung und Vertreibung von rekombinantem menschlichen Wachstumshormon stellt den Beginn der pädiatrisch-molekularen Endokrinologie dar. Dementsprechend gelangen die ersten Nachweise von Gendefekten des Endokrinums im Bereich der Wachstumshormonsynthese und Wirkung. Auch auf dem jüngsten Gebiet der molekularen pädiatrischen Endokrinologie, der genetischen Entwicklungsdefekte endokriner Organe, war das Wachstumshormon ausschlaggebend, da erstmals 1992 der Nachweis einer Mutation in einem Transkriptionsfaktorgen -dem PIT1 Gen- bei Patienten mit Wachstumshormonmangel und Hypoplasie der Hypophyse gelang.

Mittlerweile sind eine große Zahl von Transkriptionsfaktor-Genen bekannt, die in der frühen Embryogenese der Hypophyse eine zentrale Rolle spielen. Neben PIT-1 Genmutationen wurden bisher Mutationen vor allem im sogenannten PROP1 Gen gefunden. Bei diesen Patienten finden sich neben dem Wachstumshormonmangel weitere, zum Teil variable Hypophysenhormonausfälle, die ausschließlich die Adenohypophyse betreffen.

In internationalen Kooperationen werden zur Zeit Mutationen in weiteren Transkriptionsfaktorgenen bei Patienten mit kombiniertem Hypophysenausfall und Dysgenesie der Hypophyse gesucht.

Die ersten Mutationen im sogenannten LHX3 Transkriptionsfaktor-Gen, das in den sehr frühen Stadien der embryonalen Hypophysenreifung exprämiert wird, konnten bei Kindern beschrieben werden, die in der pädiatrischen Endokrinologie der Charite mit einem kombinierten Hypophysenausfall seit vielen Jahren betreut werden. Wegweisend für die Identifikation der ersten LHX3 Gendefekte war das besondere Hormonausfallsmuster mit erhaltener ACTH-Sekretion bei sonst komplettem Adenohypophysenausfall. Diese Konstellation mit noch erhaltener ACTH Sekretion entsprach den Befunden des LHX3-knockout Mausmodells bei dem als einzige hypophysäre Zellinie kortikotrope Zellen gefunden wurden. Dieses Muster lag bei drei betroffenen Kindern einer konsanguinen Familie sowie bei einem Jungen konsanguiner Eltern zusammen mit einer Hypoplasie der Hypophyse vor. Darüber hinaus zeigten die betroffenen Kinder eine besondere Auffälligkeit der Halsregion mit einer gedrungen wirkenden Haltung bei hochgezogener Schulterpartie und einer eingeschränkten Halsrotation (90° statt der normalerweise möglichen 180°). Dieses klinische Bild war zunächst in der ersten Familie mit den drei betroffenen Kindern aufgefallen und nach

Erhalt des ersten Mutationsnachweis in dieser Familie konnte in der weiteren klinischen Betreuung von Kindern mit kombiniertem Hypophysenausfall der zweite Patient auf Grund der gleichen charakteristischen zervikalen Auffälligkeit identifiziert werden.

Eine genauere Darstellung der Halsregion mittels Röntgen und MRT ergab keine auffälligen morphologischen Befunde der Halswirbelsäule oder der autochtonen Nackenmuskulatur. Demnach scheint es sich bei der sehr auffälligen Halsbewegungsstörung um eine rein funktionelle und nicht morphologische Veränderung zu handeln. In neueren Arbeiten zur Funktion des LHX3 Gens der Maus zeigte sich vor kurzem, dass der LHX3 Transkriptionsfaktor neben der Entwicklung der Hypophyse ebenfalls die Entwicklung der Motorneurone des frühen Spinalmarks zu regulieren scheint (Thaler et al. 2002). Auf Grund dieser neuesten Arbeiten könnte man folgern, daß die eingeschränkte zervikale Beweglichkeit der LHX3 defizienten Patienten in einer gestörten Reifung der zervikalen Motorneurone begründet sein könnte. Unsere Beobachtung, daß unter intensiver physiotherapeutischer Behandlung eine deutliche Besserung der cervikalen Beweglichkeit zu erzielen ist, spricht ebenfalls gegen eine primär morphologische Störung und für einen funktionelle, neurologischen Defekt.

In einer sehr breit angelegten weltweiten Mutationssuche, in die bereits mehr als 300 Patienten mit kombiniertem, angeborenem Hypophysenausfall eingeschlossen wurden, konnte bei ca. 15% der Patienten eine PIT1 oder PROP1 Genmutation nachgewiesen werden. Kürzlich wurde berichtet, daß in dieser Untersuchung erstmals auch drei Patienten mit LHX3 Genmutation identifiziert werden konnten, die alle den gleichen Hormonausfall und die gleiche zervikale Auffälligkeit aufweisen (42. Annual meeting, ESPE, 2003, Poster 1-137 Pfäffle et al).

Somit kann man zusammenfassen, daß mit der klinischen Beschreibung und dem positiven Mutationsnachweis im LHX3 Gen ein neues syndromales Krankheitsbild mit kombiniertem Hypophysenausfall und eingeschränkter zervikaler Beweglichkeit erstmals beschrieben werden konnte und daß dieser besondere Phänotyp kürzlich anhand drei neuer Fälle durch eine andere Arbeitsgruppe bestätigt wurde.

NKX2.1 Gendefekt

Die angeborene Hypothyreose stellt die häufigste und am besten behandelbare angeborene Störung des Hormonsystems des Menschen dar, ist aber gleichzeitig auch die molekular am wenigsten Verstandene.

Bei mehr als 80% der Fälle liegt eine Fehlbildung der Schilddrüse vor, so daß man bei diesen Schilddrüsendysgenesien von einer embryonalen Reifungsstörung der Schilddrüse ausgehen kann. Auf Grund von verschiedenen Mausmodellen sind fünf mögliche Kandidatengene der Schilddrüsendysgenesie ins Zentrum der Pathogeneseforschung der Schilddrüsendysgenesien gerückt. Hierzu zählt der TSH-Rezeptor über den das fetale und postnatale Wachstum der Schilddrüse reguliert wird und vier Transkriptionsfaktorgene die in der frühen Organogenese der Schilddrüse expremiert werden (PAX8, TTF2, NKX2.1 und Hex) und bei deren gezielter Inaktivierung bei den betroffenen Mäusen eine schwere Schilddrüsendysgenesie resultierte.

Entsprechend dieser Vorgaben wurden in den homologen menschlichen Genen Mutationen bei Patienten mit Schilddrüsendysgensien gesucht. Zunächst gelang dies für das TSH-Rezeptorgen. Unsere Arbeitsgruppe konnte den ersten Patienten mit kombiniert-heterozygoter Funktionsverlustmutation des TSH-Rezeptorgens bei leichter Hypoplasie der Schilddrüse beschreiben. Seither sind Mutationen des TSH-Rezeptors nur in ganz wenigen Fällen gefunden worden.

Zusammen mit der Italienischen Arbeitsgruppe von Prof. DiLauro, Neapel konnten wir die ersten Mutationen im PAX8 Gen beschreiben, die heterozygot vorliegen und bei Funktionsverlust des Genprodukts im Sinne einer Haploinsuffiziens zu verschieden ausgeprägter Schilddrüsendysgenesie bei Patienten mit angeborener Hypothyreose führen können. Kürzlich konnten wir bei zwei der mittlerweile acht identifizierten Berliner Patienten mit PAX8 Mutation eine assoziierte Nierenfehlbildung nachweisen, was im Einklang mit der Expression des PAX8 Gens in der Nierenanlage steht (unpublizierte Daten). Wie weitere Arbeiten anderer Arbeitsgruppen zeigen, liegt auch der PAX8 Gendefekt nur bei sehr wenigen Patienten vor (Lilain et al. 2001).

Dieses Grundthema der Schilddrüsendysgenesie mit assoziierter Fehlbildung, das bei den bisher identifizierten Transkriptionsfaktordefekten der Schilddrüse auffiel, liegt auch bei dem von uns kürzlich beschriebenen Krankheitsbild des NKX2.1 Gendefekts vor. Das NKX2.1 Gen wird in der sich entwickelnden Schilddrüse, aber auch in der Lungenknospe und in Kernen des embryonalen und fetalen Vorderhirns expremiert.

Bei gezielter Inaktivierung resultiert in der knock-out-Maus eine Schilddrüsen-dysgensie, eine Lungenagenesie und eine Fehlbildung der Basalganglien. Entsprechend dieses Mausphänotyps konnten wir Patienten mit einer Schilddrüsendysgenesie mit assoziierter Basalganglienstörung im Sinne einer Choreoathetose und zum Teil mit pulmonaler Symptomatik wie eine neonatale Anpassungsstörung oder gehäufte starke pulmonale Infektionen identifizieren. Bei zwei Eltern dieser Patienten die keine offensichtliche Bewegungsstörung aufwiesen und nicht hypothyreot waren, konnte die gleiche NKX2.1-Mutation nachgewiesen werden die zuvor bei ihren Kindern diagnostiziert worden war. Eine gezielte neurologische Untersuchung bzw. eine gezielte Anamnese ergaben bei diesen Patienten den Hinweis, daß in der Kindheit choreoathetotische Bewegungsstörungen vorgelegen hatten, von denen leichte Residuen noch zu diagnostizieren waren. Diese neuesten Erkenntnisse unserer Arbeitsgruppe stehen im Einklang mit den Ergebnissen einer holländischen Arbeitsgruppe, die mit unserer Unterstützung bei vier familiären Fällen von dominant vererbter nicht-progredienter Chorea ohne Hypothyreose heterozygote Funktionsverlustmutationen nachweisen konnten. Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so ergibt sich das Bild einer zuvor noch nicht beschriebenen Erkrankung, die bei allen Betroffenen mit einer Bewegungsstörung einhergeht und in unterschiedlicher Ausprägung mit einer Schilddrüsenfunktionsstörung assoziiert sein kann; nur in den wenigsten Fällen traten auch pulmonale Probleme auf. Hierbei ist hervorzuheben, daß die Bewegungsstörung nicht progredient verläuft, sondern im Gegenteil nach der Pubertät eine Besserungstendenz aufweist.

Auf Grund dieser neuen Erkenntnisse kann unter anderem erklärt werden, warum sich trotz einer adequaten und früh einsetzenden Behandlung einer angeborenenen Hypothyreose dennoch neurologische Defizite ergeben. Dies ist im Sinne der Beratung der betroffenen Eltern mit der Möglichkeit einer Pathogenesegestützten Einschätzung der Entwicklungsmöglichkeit ihrer Kinder ein wesentlicher klinischer Fortschritt. Auch ist das Wissen über die Möglichkeit der Hypothyreose-unabhängigen Störung des ZNS bei Patienten mit angeborener Hypothyreose mit Transkriptionsfaktordefekten ein wesentlicher Aspekt bei der Bewertung von Qualitätsssicherungsmaßnahmen der angeborenen Hypothyreosebehandlung.

Neben diesen klinischen Aspekten ergeben sich durch die Beschreibung der besonderen Form der monogenen Choreoathetose der NKX2.1 Mutationsträger vielfältige weitere Fragestellungen bezüglich der Regulation und Funktion des NKX2.1 Gens die über die Pathogeneseforschung der Hypothyreose hinausreichen. Um diesen Fragen unter anderem weiter nachzugehen, haben wir eine enge Kooperation mit der

Arbeitsgruppe von Dr. Rohr (Institut für Entwicklungsbiologie, Universität Köln) aufgebaut, die sich mit der NKX2.1 Genfunktion in der Embryogenese des Zebrafisches beschäftigt. Aus dem Speziesvergleich und Dank der Möglichkeit verschiedene Varianten des menschlichen Gens in einem transgenen Zebrafischansatz testen zu können, hoffen wir in Zukunft mehr über die Rolle des NKX2.1 Gens zu erfahren.

4 DANKSAGUNG

Klinische Forschung eines pädiatrischen Endokrinologen, der darüber hinaus noch Vater von drei Kindern ist, ist nur möglich durch eine intensive interdisziplinäre, internationale und infrafamiliäre Kooperation.

Für die Unterstützung bei diesem Unterfangen danke ich unter anderen meinen klinisch tätigen Kollegen der Pädiatrischen Endokrinologie Dirk Schnabel, Susanna Wiegand, Oliver Blankenstein, Julia von Heppe und Theda Wessel, meinem neurologischen Kollegen Arpad von Moers, meiner Kollegin im Pädiatrisch Molekularendokrinologischen Labor Heike Biebermann, meinen Kooperationspartnern Roberto DiLauro, Irene Netchine und Siegfried Schwarz (der mich auch im Rahmen meiner Doktorarbeit erstmals für die molekulare Endokrinologie begeistert hat), meiner Frau Regine Schefels und vor allen meiner Mentorin Annette Grüters.

5 LITERATURVERZEICHNIS

Baxter, J. D.; Seeburg, P. H.; Shine, J.; Martial, J. A.; Goodman, H. M. :
Clin. Res. 25: 461A, **1977**
The gene for growth hormone (GH): DNA sequence, expression, regulation. (Abstract)

Collu, R.; Tang, J.; Castagne, J.; Lagace, G.; Masson, N.; Huot, C.; Deal, C.; Delvin, E.; Faccenda, E.; Eidne, K. A.; Van Vliet, G. :
J. Clin. Endocr. Metab. **1997**, 82: 1361-1365,
A novel mechanism for isolated central hypothyroidism: inactivating mutations in the thyrotropin-releasing hormone receptor gene.

Cone RD
Trends Endocrinol Metab. **1999**;10(6):211-216.
The Central Melanocortin System and Energy Homeostasis.

Elmquist JK, Elias CF, Saper CB.
Neuron. **1999** ;22(2):221-32.
From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight.

Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD.
Nature. **1997**;385(6612):165-8.
Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome.

Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S.
N Engl J Med. **1999**;341(12):879-84.
Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency.

Grüters A, Jenner A, Krude H.
Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. **2002;**16(2):369-82.
Long-term consequences of congenital hypothyroidism in the era of screening programmes.

Hayashizaki, Y.; Hiraoka, Y.; Endo, Y.; Matsubara, K. :
EMBO J. **1989**, 8: 2291-2296,.
Thyroid-stimulating hormone (TSH) deficiency caused by a single base substitution in the CAGYC region of the beta-subunit.

Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S
Nature. **1997**;387(6636):903-8.
Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans.

Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD.
Science **1992**, 257:1248-1251
The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors.

Moreno JC, de Vijlder JJ, Vulsma T, Ris-Stalpers C
Endocrinol Metab. **2003**;14(7):318-26.
Genetic basis of hypothyroidism: recent advances, gaps and strategies for future research.

New MI, Carlson A, Obeid J, Marshall I, Cabrera MS, Goseco A, Lin-Su K, Putnam AS, Wei JQ, Wilson RC.
J Clin Endocrinol Metab. **2001**;86(12):5651-7.
Prenatal diagnosis for congenital adrenal hyperplasia in 532 pregnancies.

Nussey SS, Soo SC, Gibson S, Gout I, White A, Bain M, Johnstone AP
Clin Endocrinol (Oxf). **1993**;39(3):381-5.
Isolated congenital ACTH deficiency: a cleavage enzyme defect?

Olivieri A, Stazi MA, Mastroiacovo P, Fazzini C, Medda E, Spagnolo A, De Angelis S, Grandolfo ME, Taruscio D, Cordeddu V, Sorcini M;
J Clin Endocrinol Metab. **2002**;87(2):557-62.
A population-based study on the frequency of additional congenital malformations in infants with congenital hypothyroidism: data from the Italian Registry for Congenital Hypothyroidism (1991-1998).

Pfäffle RW, DiMattia GE, Parks JS, Brown MR, Wit JM, Jansen M, Van der Nat H, Van den Brande JL, Rosenfeld MG, Ingraham HA
Science. **1992**;257(5073):1118-21.
Mutation of the POU-specific domain of Pit-1 and hypopituitarism without pituitary hypoplasia.

Phillips JA 3rd, Hjelle BL, Seeburg PH, Zachmann M.
Proc Natl Acad Sci U S A. **1981**;78(10):6372-5.
Molecular basis for familial isolated growth hormone deficiency.

Schmitt S, Biason-Lauber A, Betts D, Schoenle EJ
Biochem Biophys Res Commun. **2000** ;274(1):49-56.
Genomic structure, chromosomal localization, and expression pattern of the human LIM-homeobox3 (LHX 3) gene.

Seidah NG, Benjannet S, Hamelin J, Mamarbachi AM, Basak A, Marcinkiewicz J, Mbikay M, Chretien M, Marcinkiewicz M.
1999 Ann N Y Acad Sci. 885:57-74
The subtilisin/kexin family of precursor convertases. Emphasis on PC1, PC2/7B2, POMC and the novel enzyme SKI-1.

Sheng HZ, Zhadanov AB, Mosinger B Jr, Fujii T, Bertuzzi S, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Mahon KA, Westphal H.
Science. **1996** ;272(5264):1004-7.
Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene Lhx3.

Sloop KW, Walvoord EC, Showalter AD, Pescovitz OH, Rhodes SJ.J
Clin Endocrinol Metab. **2000**;85(8):2701-8.
Molecular analysis of LHX3 and PROP-1 in pituitary hormone deficiency patients with posterior pituitary ectopia.

Westphal H.
Mol Cell Endocrinol. **2002**;197(1-2):45-6.
Genes that fashion the pituitary gland.

White, P. C.; Chaplin, D. D.; Weis, J. H.; Dupont, B.; New, M. I.; Seidman, J. G. :
Nature **1984** 312: 465-467,
Two steroid 21-hydroxylase genes are located in the murine S region.

Wu W, Cogan JD, Pfaffle RW, Dasen JS, Frisch H, O'Connell SM, Flynn SE, Brown MR, Mullis PE, Parks JS, Phillips JA 3rd, Rosenfeld MG.
Nat Genet. **1998**;18(2):147-9.
Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM.
Nature. **1994**;372(6505):425-32.
Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.