

Franziska Simm

Dr. med.

Expanding the Molecular Spectrum of Combined Pituitary Hormone Deficiency

Fach/Einrichtung: Humangenetik

Doktormutter: Prof. Dr. rer. nat. Gudrun Rappold

Der angeborene Panhypopituitarismus ist eine Erkrankung, bei der sämtliche Hormone des Hypophysenvorderlappens entweder nur zu einem geringeren Maß produziert werden oder komplett ausfallen. Die bisher am häufigsten angewandte Methode zur Erforschung ursächlicher, monogenetischer Gene war das Heranziehen von knock-out Mausmodellen. Hiermit konnten einige „starke“ Kandidatengene identifiziert werden; doch auch inkomplette Penetranzen wurden mit der Zeit in diesen Genen beschrieben, was den monogenetischen Ansatz in dieser Erkrankung als nicht mehr ausreichend erklärt.

Um nun mit einem breiteren, primär „Mausmodell unabhängigen“ Ansatz neue Kandidatengene zu identifizieren, wurden Exom-Sequenzierungen an 10 nicht syndromalen Panhypopituitarismus-Patienten und ihren gesunden Eltern durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden die Sequenzierdaten auf seltene, monogenetische Varianten untersucht, was demnach die heterozygot vererbten Varianten ausschloss. Dies ergab voraussichtlich schädliche Varianten in 38 Genen, von welchen 12 davon de novo Ereignisse waren. Varianten in bisher bekannten Genen dieser Erkrankung wurden auf diesem Weg nicht nachgewiesen. Um nun diese 38 Gene näher eingrenzen zu können, wurden sie mit embryonalen Transkriptomen der sich entwickelnden Hypophyse der Maus verglichen. Demzufolge wurden 11 dieser Gene während wichtiger Entwicklungsstadien der Hypophyse in der Maus exprimiert. Im Anschluss daran wurden die drei vielversprechendsten Gene herangezogen, nämlich SLC15A4, SLC20A1 und IRS4, um Resequenzierungen an einer Kohorte von 200 Patienten mit ähnlichem Krankheitsbild durchzuführen. Der Grund für diese Selektion war einmal die Tatsache, dass SLC15A4 und SLC20A1 aus derselben Genfamilie stammen, die Varianten de novo entstanden sind und in zwei nicht verwandten Patienten gefunden wurden. Zusätzlich waren die Varianten selten und bioinformatischen Berechnungen nach schwer schädlich für die Proteinfunktion. Das IRS4 Gen war deswegen vielversprechend, denn es existierte bereits ein knock-out Mausmodell, welches CPHD Symptome zeigte und zusätzlich wird das Irs4 Gen fast ausschließlich in der sich entwickelnden Hypophyse der Maus exprimiert, was die Bedeutung dieses Gens in gerade dem Gewebe unterstreicht. Die Resequenzierungen führten zur Identifikation von jeweils einem weiteren Patientenfall pro untersuchtem Gen. Doch um die Kausalität der primär entdeckten IRS4 Variante weiter zu ermitteln, wurden Überexpressionsexperimente an HEK293 Zellen durchgeführt. Diese Experimente ergaben, dass die S439C IRS4 Variante eine signifikante Einschränkung in der Aktivierung des PI3K Signalweges und damit der Proliferation gegenüber dem Wildtyp hat, womit sich die Unterentwicklung der Hypophyse unseres Patienten gut erklären ließe. Um nun auch den möglichen polygenetischen Ansatz zu heranzuziehen, wurden die 10 Patienten auf vererbte Varianten in bereits bekannten Genen untersucht. Eine nicht komplette Penetranz in dieser Erkrankung ist bekannt und so kam auch in dieser Studie heraus, dass drei der Patienten Varianten im GLI2 Gen und/oder im LHX3 Gen trugen. Bei dem einen der Patienten kam es zu einer Vererbung der GLI2 Variante vom gesunden Vater und die LHX3 Variante wurde von

der gesunden Mutter vererbt. Hier konnte man davon ausgehen, dass die Kombination dieser beiden vererbten Varianten schließlich zum CPHD-Phänotyp führte. Die beiden anderen Patienten hatten neben dieser vererbten Variante in den bekannten GLI2/LHX3 Genen die oben beschriebenen de novo Varianten im SLC15A4 oder SLC20A1 Gen. Bei diesen Trios scheint es demnach die Kombination aus der Variante im vererbten, bekannten Gen plus der de novo Variante in den SLC Genen der Auslöser für das Neuaufreten der Erkrankung zu sein.

Mit dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass die Exomsequenzierung ein geeignetes diagnostisches aber auch wissenschaftliches Mittel ist, vor allem bei einer Erkrankung, bei der die inkomplette Penetranz bekannt ist und monogenetische Ursachen als selten zu betrachten sind. Demnach konnte hiermit zwar das Repertoire an Genen für die Diagnostik bei CPHD Patienten erweitert werden, Funktionsanalysen müssen zur weiteren Abklärung der neu identifizierten Varianten aber dennoch erbracht werden. Dies wiederum wird sich als schwierig erweisen, denn nur die Kombination aus jeweils beiden Genen wird neue Erkenntnisse liefern können.