

**Klinisches Erscheinungsbild und zugrundeliegende molekularbiologische
Mechanismen der heterozygoten V599E-IGF-I Rezeptormutation**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.
an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von:

Tillmann Wallborn

Geburtsdatum / Geburtsort:

30.08.1983 / Leisnig

angefertigt an:

Universität Leipzig / Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche

Betreuer:

Dr. rer. nat. Jürgen Klammt

Prof. Dr. med. Wieland Kiess

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom:

18.09.2012

*für Cornelia Voigt
der ich sehr dankbar bin*

INHALTSVERZEICHNIS

1. Abkürzungsverzeichnis	6
2. Bibliographische Beschreibung	7
3. Einleitung	8
3.1 Diagnose: Small for gestational age	8
3.2 Die Bedeutung des Aufholwachstums	10
3.3 Genetische Ursachen prä- und postnataler Wachstumsstörungen	13
4. Originalpublikation	17
5. Zusammenfassung der Arbeit	27
5.1 Screeningprojekt IGF1R Mutationen	27
5.2 Experimentelle Untersuchungen	29
5.3 Einordnung in den aktuellen wissenschaftlichen Diskurs	30
6. Referenzen	32
7. Anlagen	40
7. 1 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	40
7.2 Lebenslauf	41
7. 3 Danksagungen	43

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ECFP	enhanced cyan fluorescent protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fn-III	Fibronektin III
GH	Wachstumshormon
HC	Kopfumfang
IGF-I	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IGF1R	IGF-I Rezeptor
IGFBP3	IGF binding protein 3
IR	Insulinrezeptor
M1	IGF1R frühes Monomer
M2	IGF1R spätes Monomer
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
rhGH	rekombinantes humanes Wachstumshormon
SD	Standartabweichung
SDS	SD Score
SGA	small for gestational age
VO	vector-only Kontrolle
WT	Wildtyp
YFP	yellow fluorescent protein

2. BIBLIOGRAPHISCHE BESCHREIBUNG

Wallborn, Tillmann

Klinisches Erscheinungsbild und zugrundeliegende molekularbiologische Mechanismen der heterozygoten V599E-IGF-I Rezeptormutation

Universität Leipzig, Dissertation

43 Seiten, 95 Literaturverweise, 1 Originalpublikation (9 Seiten, 38 Literaturverweise, 7 Abbildungen)

Referat

Untersuchungen haben gezeigt, dass unterdurchschnittlich leichte Neugeborene für zahlreiche Erkrankungen ein erhöhtes Risiko tragen. Beschrieben ist unter anderem das vermehrte Auftreten psychosozialer Probleme sowie metabolischer und kardiovaskulärer Spätfolgen. Inzwischen sind zahlreiche mögliche Ursachen einer intrauterinen und postnatalen Wachstumsretardierung beschrieben worden. Unter diesen Ursachen finden sich auch genetische Veränderungen von Proteinen der endokrinologischen Wachstumsregulierung. So wurden Mutationen im GH1 Gen, in Entwicklungsgenen von GH produzierenden Zellen, im IGF-I Gen und schließlich auch im IGF-I Rezeptor Gen identifiziert. Mutationen im letztgenannten Gen stellen den neuesten Forschungszweig dar und wurden bisher weltweit bei lediglich 19 Patienten festgestellt.

Mit dieser Arbeit wird ein weiterer Patient mit einer heterozygoten IGF-I Rezeptormutation beschrieben. Neben einer ausführlichen klinischen Beschreibung war die Analyse der Kausalzusammenhänge von Mutation und klinischem Bild Hauptziel dieser Studie. Über eine ausgeprägte intrauterine und postnatale Wachstumsretardierung hinaus präsentierte die betroffene Patientin eine mentale Entwicklungsverzögerung. Durch verschiedene molekularbiologische Methoden konnte eine gestörte intrazelluläre Prozessierung des veränderten Rezeptorproteins nachgewiesen werden. Beobachtet wurde eine fehlende Zelloberflächenexpression aufgrund einer Retention von Rezeptorvorstufen im Endoplasmatischen Retikulum. Damit wurde ein neuer Mechanismus der IGF-I Resistenz beschrieben.

3. EINLEITUNG

3.1 Diagnose: Small for gestational age

Im Jahr 1989 veröffentlichte David Barker im Fachjournal *The Lancet* einen aufsehenerregenden Artikel (1). Er wies nach, dass niedriges Geburtsgewicht und das Risiko für ischämische Herzerkrankungen im Erwachsenenalter in signifikantem Zusammenhang stehen. Mit Hilfe seiner Daten postulierte er eine Theorie, die heute als „Barker Hypothese“ bezeichnet wird. Nach dieser Hypothese können typische Erkrankungen des Alters durch eine gestörte Fetalentwicklung verursacht werden. Inzwischen wurden zahlreiche weitere Arbeiten über die kurz- und langfristigen Folgen reduzierter Geburtslänge und/oder reduzierten Geburtsgewichts veröffentlicht. Unglücklicherweise ist die Vergleichbarkeit der Studien aufgrund unterschiedlicher Kriterien der Patientenselektion nur bedingt gegeben. Zum Teil werden Patienten unterhalb der zehnten, der fünften oder der dritten Perzentile für Geburtslänge und/oder Geburtsgewicht als *small for gestational age* (SGA) bezeichnet. In anderen Studien wird der SGA-Terminus etwas enger mit mindestens -2 SDS (Standard Deviation Score) für Geburtslänge und/oder Geburtsgewicht definiert. Die letztgenannte Verwendung scheint sich inzwischen allgemein durchzusetzen und wird auch offiziell, z.B. von den *International Societies of Pediatric Endocrinology* und der *Growth Hormone Research Society*, empfohlen (2). Kritisiert wird an dieser Definition jedoch die Verwendung eines Begriffs für zwei verschiedene Sachverhalte, nämlich für zu niedriges Gewicht und für zu geringe Körperlänge (3). Möglicherweise wird hier in Zukunft eine sprachliche Differenzierung erfolgen. Trotz der eingeschränkten Vergleichbarkeit der Studienliteratur lässt sich aus vielen Arbeiten ein genereller Trend herauslesen. Nicht nur für ischämische Herzerkrankungen, sondern auch für zahlreiche weitere Krankheiten tragen SGA-Patienten bzw. Patienten mit geringem Geburtsgewicht ein erhöhtes Risiko (4). Schon im Neugeborenenalter findet sich eine erhöhte perinatale Mortalität und Morbidität (5, 6). So ist niedriges Geburtsgewicht mit einem vermehrten Auftreten von plötzlichem Kindstod verbunden (7). Studien an unterdurchschnittlich leichten Frühgeborenen zeigen außerdem ein signifikant erhöhtes Risiko, ein Atemnotsyndrom oder eine nekrotisierende Enterokolitis zu entwickeln (6). Niedriges Geburtsgewicht erhöht zudem den Anteil glykierten Hämoglobins und führt häufiger zu Nierenentwicklungsstörungen (8, 9). Interessanterweise scheint nicht nur das absolute Geburtsgewicht, sondern insbesondere

sein Verhältnis zur Körpergröße eine wichtige Rolle zu spielen. Neugeborene mit niedrigem Ponderal-Index haben bei gleichem Gewicht ein höheres Morbiditätsrisiko (5).

Auch in der Kindheit sind die negativen Folgen eines niedrigen Geburtsgewichts bzw. einer SGA-Geburt für die Betroffenen nachweisbar. Eine Studie mit 7.086 im *Helsinki University Central Hospital* geborenen Kindern zeigt eine inverse Korrelation zwischen Geburtslänge bzw. Geburtsgewicht und der Inzidenz für Diabetes Mellitus Typ II (10). Eine Untersuchung an 477 indischen Kindern zeigt eine positive Korrelation zwischen geringem Geburtsgewicht und erhöhtem systolischen Blutdruck bzw. Cholesterinspiegel (11). In anderen Studien zeigen Patienten mit intrauteriner Wachstumsverzögerung bereits im Kindesalter Anzeichen partieller Insulinresistenz (12, 13). Dieser allgemeine Zusammenhang von niedrigem Geburtsgewicht und erhöhter Morbidität im Kindesalter findet sich auch in Studien über SGA-Patienten. In vielen Altersgruppen werden erhöhte Insulin- und Glukosespiegel beschrieben (11, 14). In einer finnischen Studie zeigen etwa die Hälfte der SGA-Kinder im Alter von 12 Jahren einen Gesamt-Serumcholesterinspiegel wie das höchste Quartil der Kontrollkohorte (15). Neben metabolischen und kardiovaskulären Störungen scheinen auch psychosoziale Auffälligkeiten bei Kindern mit SGA-Geburt vermehrt aufzutreten. Beschrieben sind neurologische Beeinträchtigungen, kognitive Entwicklungsverzögerungen und geringerer akademischer Erfolg im Vergleich zur Normalpopulation (16-19).

Die Auswirkungen eines niedrigen Geburtsgewichts auf Erkrankungen im Jugend- und Erwachsenenalter wurden bereits sehr früh erkannt. Schon eine Studie aus dem Jahr 1976 zeigt bei Männern, die während des II. Weltkrieges einer Nahrungsrestriktion *in utero* ausgesetzt waren, eine erhöhte Adipositasprävalenz (20). Eine große Übersichtsarbeit mit insgesamt 66.000 Patienten zeigt, dass Geburtsgewicht und Blutdruck bei Kindern und Erwachsenen invers korrelieren (21). Obwohl die Stärke der Korrelation möglicherweise durch Studien- und Statistikfehler überschätzt wurde, wird dieser Zusammenhang heute allgemein anerkannt (22). Mehrere große Studien zeigen darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen sinkendem Geburtsgewicht und steigendem Risiko für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität (1, 23-26). Niedriges Geburtsgewicht ist außerdem mit schlechterer Lungenfunktion, gestörter Glukosetoleranz, Diabetes Mellitus Typ II und Nierenfunktionsstörungen bis hin zur Niereninsuffizienz assoziiert (1, 27-32). Jugendliche und erwachsene SGA-Patienten zeigen ein vermehrtes Vorkommen von Insulinresistenz, erhöhten LDL- und erniedrigten HDL-Cholesterinwerten, Hypertonie und Fertilitätsstörungen (33-36). Auch die kognitive und akademische Leistungsfähigkeit vieler SGA-Patienten ist reduziert (37, 38). Dies mag eine Ursache dafür sein, dass die Betroffenen

gehäuft gering qualifizierte Berufe mit niedrigen Einkommen ausüben (19). Interessanterweise zeigt die gleiche Studie, dass SGA-Patienten trotzdem eine der Normalpopulation vergleichbare Lebenszufriedenheit erreichen können.

Die kausalen Zusammenhänge zwischen SGA-Geburt und negativen Langzeitfolgen sind bis heute nicht befriedigend aufgeklärt. Die ursprüngliche „Barker Hypothese“ geht von einer Anpassung des Fetus an eine *in utero* herrschende Mangelsituation aus. Diese Anpassung stellt postnatal - in Kombination mit einem gesteigerten Energieangebot - eine Maladaptation dar und führt zu Folgeerkrankungen (39). Alternativ dazu ist in neuerer Zeit eine common-cause Hypothese für Kleinwuchs und erhöhte Morbidität postuliert worden. Nach dieser These sind beide Phänomene unabhängig voneinander auf bestimmte Genvarianten zurückzuführen (14, 40). Selbstverständlich gibt es inzwischen auch Versuche, beide Ansätze in Einklang zu bringen und ein Zusammenspiel von Umwelt und Genetik als Ursache zu identifizieren (41).

Die unklare Ätiologie der schwerwiegenden langfristigen Folgen des SGA-Phänotyps verweist auf einen enormen Forschungsbedarf auf diesem Gebiet. Epidemiologische Befunde verdeutlichen die Größenordnung des Problems. Etwa 5-8% aller Neugeborenen werden jedes Jahr mit der Diagnose SGA geboren (42, 43). Damit sind allein in der BRD im Jahr 2008 etwa 34.000 bis 54.500 Neugeborene zur Geburt zu klein und/oder zu leicht gewesen (44). Bei einem hohen Prozentsatz der Patienten kann keine eindeutige Ursache für den Kleinwuchs identifiziert werden (45). Im Allgemeinen scheinen genetische Faktoren einen Einfluss von bis zu 80% auf das Geburtsgewicht zu haben (46). Bekannt sind zudem eine große Anzahl fetaler, mütterlicher, plazentarer und demographischer Risikofaktoren (47). Dass im Einzelfall trotzdem oft keine Ursache gefunden werden kann zeigt, dass insbesondere im Sinne einer optimalen frühzeitigen Behandlung weitere Forschungsarbeit notwendig ist.

3.2 Die Bedeutung des Aufholwachstums

Die meisten sonst gesunden SGA-Patienten zeigen nach der Geburt ein rasches Aufholwachstum. Auch abhängig von der Begriffsdefinition erreichen bereits nach 6 Monaten 71%, nach einem Jahr 81-87%, nach zwei Jahren 85-87% und nach 18 Jahren sogar 92% den Normbereich (42, 43, 48). Patienten, die nach dem ersten Lebensjahr noch unterhalb der Norm liegen, haben also ein etwa 50-prozentiges Risiko, dauerhaft zu klein und/oder zu leicht zu bleiben. In absoluten Zahlen verbleiben damit in der BRD aus dem Jahr 2008, bei einer vorsichtig geschätzten SGA-Inzidenz von 5%, noch etwa 2.700 Patienten

ohne Aufholwachstum. Im Vergleich beispielsweise zu Patienten mit nachgewiesenem Wachstumshormonmangel, d.h. bei einer geschätzten Prävalenz von 1/5.600 etwa 129 Patienten aus demselben Jahr, ist dies ein gewaltiges Kollektiv (49).

Nachdem die Bedeutung der Geburtslänge und insbesondere des Geburtsgewichts für Morbidität und Mortalität erkannt wurde, rückte verstärkt die Rolle der postnatalen Größen- und Gewichtsentwicklung in den wissenschaftlichen Fokus. Hintergrund war unter anderem die Fragestellung, ob durch ausreichendes Aufholwachstum die Folgerisiken einer SGA-Geburt positiv beeinflusst werden können. Wie der SGA-Begriff wird allerdings auch der Terminus Aufholwachstum (catch-up growth) in der Studienliteratur nicht einheitlich verwendet. Zumeist wird mit Aufholwachstum jede signifikante Perzentilenverschiebung der auxologischen Parameter eines Patienten bezeichnet. Die Betroffenen haben damit eine höhere Größen- bzw. Gewichts-Zunahmegeschwindigkeit als der Median der Vergleichsgruppe. Dementgegen wird in einigen Studien mit SGA-Patienten das Erreichen des Größen- und/oder Gewichtsnormbereichs als Aufholwachstum bezeichnet (42, 48). Ein Patient zeigt nach dieser Definition Aufholwachstum, wenn er die 3. Größen- oder Gewichtsperzentile bzw. -2 Größen- oder Gewichts-SDS überschritten hat. In allen Studien bleibt die elternbezogene, individuell errechnete Zielgröße meist unberücksichtigt (47).

Trotz der unterschiedlichen Kriterien lässt sich aus den Studien ein vorsichtiger Trend herauslesen. Starkes Wachstum von kleinen und leichten Neugeborenen hat negative metabolische Konsequenzen, aber positive Auswirkungen auf die psychosoziale Entwicklung. Eine ganze Reihe von Studien zeigt, dass Aufholwachstum mit erhöhter Inzidenz des metabolischen Syndroms, Insulinresistenz, Diabetes Mellitus Typ II und Fettstoffwechselstörungen assoziiert ist (50). Untersucht wird in diesen Studien stets der Effekt des natürlichen Aufholwachstums, d.h. ohne medikamentöse Intervention. Damit ist ausgeschlossen, dass es sich um metabolische Therapienebenwirkungen handelt, wie sie beispielsweise bei der Gabe von Wachstumshormon (GH) beschrieben werden (51). Die bereits erwähnte finnische Studie an 7.086 Patienten zeigt ein steigendes Risiko für Diabetes Mellitus Typ II, je stärker die Größen-, Gewichts-, oder BMI-Zunahme zwischen dem 7. und 15. Lebensjahr ausfällt (10). In dieser Kohorte tragen zudem Patienten mit dem niedrigsten Ponderal-Index zur Geburt und dem größten BMI zum Messzeitpunkt von 11 Jahren das höchste Risiko, eine koronare Herzerkrankung zu entwickeln (26). Eine andere Studie errechnet das höchste kardiovaskuläre Todesrisiko für Frauen mit dem niedrigsten Geburtsgewicht und höchsten Gewicht im 1. Lebensjahr (23). Männern hingegen tragen in derselben Studie das höchste Risiko bei niedrigem Geburtsgewicht und ebenfalls niedrigem Gewicht im 1. Lebensjahr. Bei einer Kohorte von 477 indischen Kindern zeigen die Kinder

mit dem niedrigsten Geburtsgewicht und dem höchsten Gewicht zum Messzeitpunkt von 8 Jahren die stärksten Zeichen für Insulinresistenz, den höchsten systolischen Blutdruck und das höchste Serum-Cholesterin (11). Eine Studie aus Bristol an 842 zufällig aus allen Neugeborenen ausgewählten Probanden zeigt, dass Kinder mit Aufholwachstum zur Geburt besonders klein, leicht und dünn sind (52). Im Alter von zwei und fünf Jahren hingegen sind diese Kinder nicht nur signifikant größer, sondern auch signifikant schwerer als der Altersdurchschnitt und weisen einen höheren BMI auf. Hinweise auf mögliche negative metabolische Folgen des Aufholwachstums finden sich auch in Studien über SGA-Patienten. Bereits bei Einjährigen ist eine Korrelation zwischen Gewichts-Aufholwachstum und Zeichen der Insulinresistenz nachweisbar, ohne dass die Patienten übergewichtig sein müssen. Außerdem findet sich ein Zusammenhang zwischen Größen-Aufholwachstum und Insulinsekretion, der allerdings statistisch nicht signifikant ist (13, 53). Im Gegensatz dazu zeigt die eingangs erwähnte Studie von Barker einen positiven Effekt des Aufholwachstums (1). Nach seinen Daten reduziert Gewichts-Aufholwachstum im ersten Lebensjahr das Risiko für ischämische Herzerkrankungen. Eine andere Studie zeigt bei 12-jährigen SGA-Patienten einen Vorteil des Aufholwachstums für die Gesamt-Cholesterinspiegel (15). Eine große Studie weist zudem einen positiven Effekt auf den systolischen Blutdruck und den BMI nach (35).

Obwohl die Datenlage nicht eindeutig ist, zeigt sich zusammengenommen, dass Aufholwachstum potentiell metabolische und kardiovaskuläre Spätfolgen nach sich ziehen kann. Von einigen Autoren wird daher ein vorsichtigen Umgang mit hochkalorischer Säuglingsnahrung bzw. relative Nahrungsrestriktion bei SGA-Neugeborenen empfohlen (54, 55). Neben diesen negativen Auswirkungen gibt es auf der anderen Seite Hinweise auf mögliche Vorteile des Aufholwachstums für die psychosoziale Entwicklung der Betroffenen. Eine schwedische Studie an über 9.000 männlichen SGA-Patienten stellte einen positiven Effekt des Längenaufholwachstums auf die Leistungsfähigkeit in Intelligenztests fest (56). Eine andere Studie zeigt eine solche Leistungssteigerung bei überdurchschnittlicher Zunahme des Kopfumfanges (57). Insgesamt gilt Kleinwuchs als ein Risikofaktor für psychosoziale Probleme (58, 59). Die enorme soziale Bedeutung der Körpergröße lässt sich inzwischen auch durch soziologische Studien belegen. In Großbritannien und den USA beispielsweise steigt das monatliche Einkommen mit steigender Körpergröße pro Zoll um etwa 1,4-2,9% (60). Dieser Trend lässt sich bereits anhand der Körpergröße von einjährigen Kindern feststellen. Pro 2 cm Größenzuwachs im ersten Lebensjahr steigt das Einkommen 50 Jahre später um ca. 3,5% (61). Eine Berechnung im *Journal of Political Economy* kommt sogar zu dem Schluss, dass sich eine Wachstumshormontherapie für Kleinwüchsige schon

aus diesen ökonomischen Gesichtspunkten auszahlt (62). Im Durchschnitt sind die Therapiekosten für die Behandlung geringer, als der Zuwachs an Einkommen durch die höhere Körpergröße.

All diese Beobachtungen machen die Komplexität und Bedeutsamkeit des intrauterinen und frühkindlichen Wachstums deutlich. Die Diagnose SGA hat für die Betroffenen bis ins hohe Alter nachweisbare Auswirkungen. Nach aktueller Studienlage empfiehlt es sich trotzdem nicht, ein Aufholwachstum der Patienten um jeden Preis zu erzwingen. Hier sind optimale Konzepte der postnatalen Ernährung dringend geboten (63). Zudem ist ein tiefgreifenderes Verständnis der menschlichen Wachstumsprozesse und möglicher Störungen unbedingt erforderlich. Nur so können zukünftig Folgeerkrankungen verhindert und therapeutische Interventionsstrategien erarbeitet werden.

3.3 Genetische Ursachen prä- und postnataler Wachstumsstörungen

Auch wenn die konkreten Ursachen intrauteriner Wachstumsretardierungen im Einzelfall oft unklar sind, konnten in der Vergangenheit doch zahlreiche vermeidbare bzw. therapeutisch beeinflussbare Risikofaktoren identifiziert werden (47). Zusätzlich sind in den letzten Jahren vermehrt mögliche genetische Ursachen des Kleinwuchses entdeckt worden. Die Behandlung dieser Patienten, die im Moment noch keiner kausalen Therapie zugeführt werden können, stellt für die Medizin eine besondere Herausforderung dar. Betroffene erhalten unter Umständen über lange Zeiträume hoch komplex wirkende Hormonpräparate. Dies erfordert eine intensive Prüfung der Wirksamkeit sowie der kurz- und langfristige Nebenwirkungen der entsprechenden Medikamente.

Aus endokrinologischer Sicht spielt die GH/IGF-I Achse für die Regulation des menschlichen Wachstums eine herausragende Rolle. Mögliche genetische Defekte sind inzwischen auf allen Ebenen dieser Achse beschrieben worden. Schon seit vielen Jahrzehnten ist bekannt, dass Mangel an funktionalem hypophysärem GH eine mögliche Kleinwuchsursache sein kann. Bereits 1958 wurde eine erste erfolgreiche Substitutionstherapie mit menschlichem GH von Maurice Raben durchgeführt (64). In neuerer Zeit konnten als mögliche genetische Ursachen eines GH Mangels Mutationen im GH Releasing Hormone Rezeptor Gen, im GH1 Gen und in Entwicklungsgenen von GH produzierenden Zellen identifiziert werden (65-69). Neugeborene mit GH Mangel werden klinisch vor allem durch Hypoglykämien, Icterus prolongatus, Mikrophallus und craniofaziale Mittellinienveränderungen auffällig (70). Eine ausgeprägte

Wachstumsverzögerung wird bei den meisten allerdings erst gegen Ende des ersten Lebensjahres bemerkt (71). Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens ist der bedeutende Anteil des IGF-I am pränatalen Wachstum und seine GH unabhängige Sekretion *in utero* (72, 73). GH Mangel führt so im Wesentlichen erst postnatal zu einem sekundären IGF-I Mangel und zu Wachstumsverzögerungen. Später können Patienten mit GH Mangel auch durch phänotypische Besonderheiten auffällig werden. Beschrieben sind eine hervortretende Stirn und ein abgeflachter Nasenrücken bei insgesamt kindlicher Gesichtsform (Puppengesicht) (74).

Nur acht Jahre nach der ersten erfolgreiche GH Substitutionstherapie entdeckte Zvi Laron 1966 einen GH Rezeptordefekt bei drei kleinwüchsigen Patienten mit Anzeichen von GH Defizienz und hohen GH Spiegel (75). In den darauffolgenden 40 Jahren kamen über 250 weitere Patientenbeschreibungen hinzu. Der klinische Phänotyp eines inaktiven GH Rezeptors wird heute nach seinem Entdecker als Laron-Syndrom bezeichnet (76). Patienten mit dieser Erkrankung sind zur Geburt klein und erreichen im Erwachsenenalter Endgrößen von ca. 95-140 cm. Die Betroffenen neigen zu einem adipösen Körperbau mit dünnen Knochen und unterentwickelter Muskulatur. Typisch ist die Form des Kopfes mit eher geringem Umfang, hervorspringender Stirn, Sattelnase, Sonnenuntergangsphänomen der Augen, schmalem Kinn und spärlichem Haarwuchs. Bei beiden Geschlechtern findet sich außerdem Hypogonadismus und Hypogenitalismus. Die Gesichtsknochen sind darüber hinaus in der Regel unterentwickelt, es kommt zu Zahnfehlbildungen und verzögerter motorischer Entwicklung.

Zur Abschätzung der Auswirkungen genetischer Mutationen auf der IGF-I Ebene erfolgten 1993 zuerst Studien an Knockout-Mäusen. Homozygote Tiere zeigten ein um etwa 40% reduziertes Geburtsgewicht gegenüber dem Wildtyp und eine erhöhte perinatale Mortalität. Heterozygote Mäuse hingegen zeigten keine oder nur geringfügige Wachstumsretardierungen (77, 78). Im Jahr 1996 schließlich wurde erstmals ein 15-jähriger Patient mit absolutem IGF-I Mangel aufgrund einer homozygoten Partialdeletion des IGF-I Gens beschrieben (79). Neun Jahre später folgte eine weitere Publikation über einen extrem kleinwüchsigen Patienten mit einem veränderten IGF-I Gen. Bei diesem hatte eine durch Blutsverwandtschaft der Eltern homozygot übertragene Punktmutationen des Gens zu einem inaktiven Hormon geführt (80). In beiden Fällen verursachte der totale Aktivitätsverlust des IGF-I hohe GH-Spiegel, schwere intrauterine und postnatale Wachstumsretardierungen, Mikrozephalie, mentale Retardierung und Taubheit. Im Jahr 2009 folgte die Beschreibung einer weiteren homozygoten Mutation, die eine reduzierte Affinität des Hormons an seinen Rezeptor zur Folge hatte (81). Der entsprechende Patient

zeigte allerdings neben starker Wachstumsretardierung aufgrund vermuteter hormoneller Restaktivität nur eine milde mentale Retardierung und eine normaler Hörfähigkeit. Als bisher unklar muss die Bedeutung einer 2003 entdeckten homozygoten Mutation im Poly(A) Schwanz des IGF-I Gens eingeschätzt werden (82). Da die Mutation bei 100 Kontrollprobanden nicht gefunden werden konnte, wurde sie zunächst als Ursache des Kleinwuchses angesehen. Später wurde dieselbe Mutation in einer anderen Studie, sowohl heterozygot als auch homozygot, bei etwa 3% der Probanden identifiziert (83). In dieser zweiten Studie zeigten jedoch selbst homozygote Träger keine Auffälligkeiten gegenüber dem Wildtyp. Über den Kleinwuchs, die mentale Retardierung und die verminderte Hörfähigkeit hinaus ist das klinische Bild eines ausgeprägten IGF-I Mangels inkonsistent. Als teilweise gemeinsame Merkmale werden lediglich Klinodaktylie und Mikrognathie beschrieben. Insbesondere bei heterozygoten Patienten sind die Erscheinungsformen variabel. Obwohl einige Patienten eine normale Größe aufweisen, finden sich bei anderen, entgegen den Studien an Knockout-Mäusen, zum Teil erhebliche Wachstumsretardierungen bis zu -4,6 Größen-SDS (79, 80, 84). Im Jahr 2003 wurde rekombinantes GH in der Europäischen Union für Patienten ohne Aufholwachstum zugelassen. Da primärer IGF-I Mangel jedoch nur sehr begrenzt durch GH behandelbar ist, wird die Gabe von IGF-I als therapeutische Option diskutiert (85). Im Jahr 2007 wurde in der EU erstmals ein Präparat mit rekombinatem IGF-I für Patienten mit schwerem primärem IGF-I Mangel zugelassen.

Nachdem der Mangel an funktionalem IGF-I als eine mögliche Kleinwuchsursache erkannt wurde, folgten Studien über die Auswirkungen eines Defekts des IGF-I Rezeptors (IGF1R). Homozygote Knockout-Mäuse starben zur Geburt an Atemversagen und zeigten gegenüber dem Wildtyp ein um 55% reduziertes Geburtsgewicht (77). Ein vollständiger Funktionsverlust des IGF1R erscheint daher wesentlich schwerwiegender als ein vollständiger Funktionsverlust des IGF-I. Heterozygote Mäuse hingegen zeigten zur Geburt einen wildtypähnlichen Phänotyp und entwickelten teilweise postnatal eine milde Wachstumsretardierung (86). Die ersten Patienten mit funktional relevanten IGF1R Mutationen wurden 2003 in den USA und in einer Kohorte des Leipziger CrescNet Registers gefunden (87). Dieser Arbeit folgten bisher sechs weitere Veröffentlichungen mit insgesamt 19 identifizierten Personen (87-92). Damit konnte bewiesen werden, dass Mutationen auf allen Ebenen der GH/IGF-I Achse für Kleinwuchs verantwortlich sein können. Bei der Mehrheit der IGF1R Mutationsträger fanden sich hohe IGF-I Spiegel zwischen -0,8 SD bis +2,9 SDS im Vergleich zur Altersnorm. Die IGFBP3 Spiegel waren sowohl normal, als auch erhöht oder erniedrigt. Die Geburtslänge variierte zwischen -5,8 und 0,3 SDS, das Geburtsgewicht zwischen -3,5 und -1,5 SDS. Alle Patienten zeigten höchstens

unvollständiges Aufholwachstum mit Endgrößen zwischen -5,0 und -1,6 SDS. Phänotypisch wurden nur bei einigen Patienten leichte Auffälligkeiten beschrieben. Interessanterweise lagen die Ergebnisse von verschiedenen Intelligenztests zwar meist unter 100, in einem Fall aber über dem Durchschnitt bei 134.

Das menschliche Wachstum ist ein hochkomplexer Prozess, dessen Bedeutung weit über die bloße soziale Relevanz der Körpergröße hinausgeht. Zahlreiche Risikofaktoren und mögliche Ursachen einer Störung dieses Prozesses konnten bisher entdeckt werden. Die hier durchgeführte Studie schließt sich der neuesten Forschungsentwicklung an und beschreibt eine neue IGF1R Mutation. Damit wird ein weiterer Fall eines bisher nur bei sehr wenigen Patienten beschriebenen Krankheitsbildes vorgelegt. Von besonderer Bedeutung ist zusätzlich die erstmalig als Krankheitsursache identifizierte intrazelluläre Prozessierungsstörung des Rezeptorproteins. Dadurch konnte ein bisher unbekannter Mechanismus der IGF-I Resistenz entdeckt werden.

4. ORIGINALPUBLIKATION

A Heterozygous Mutation of the Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Causes Retention of the Nascent Protein in the Endoplasmic Reticulum and Results in Intrauterine and Postnatal Growth Retardation

Tillmann Wallborn, Dr. Stefan Wüller, Dr. Jürgen Klammt, Tassilo Kruis, Prof. Dr. Jürgen Kratzsch, Gabriele Schmidt, Marina Schlicke, Eva Müller, Hildegard Schmitz van de Leur, Prof. Dr. Wieland Kiess und Prof. Dr. Roland Pfäffle

Erschienen in: The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism
Mai 2010, Heft 95(5), Seite 2316–2324

A Heterozygous Mutation of the Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Causes Retention of the Nascent Protein in the Endoplasmic Reticulum and Results in Intrauterine and Postnatal Growth Retardation

Tillmann Wallborn, Stefan Wüller, Jürgen Klammt, Tassilo Kruis, Jürgen Kratzsch, Gabriele Schmidt, Marina Schlicke, Eva Müller, Hildegard Schmitz van de Leur, Wieland Kiess, and Roland Pfäffle

University Hospital for Children and Adolescents (T.W., J.Kl., T.K., M.S., E.M., W.K., R.P.), University of Leipzig, 04103 Leipzig, Germany; University Hospital Aachen (S.W.), Department for Paediatric and Adolescent Medicine, 52074 Aachen, Germany; Institute of Laboratory Medicine, Clinical Chemistry, and Molecular Diagnostics (J.Kr.), University of Leipzig, 04103 Leipzig, Germany; Sozialpädiatrisches Zentrum Garmisch-Partenkirchen (G.S.), 82467 Garmisch-Partenkirchen, Germany; and Institute for Biochemistry, University Hospital Aachen (H.S.v.d.L.), 52074 Aachen, Germany

Background: Mutations in the IGF-I receptor (*IGF1R*) gene can be responsible for intrauterine and postnatal growth disorders.

Objective: Here we report on a novel mutation in the *IGF1R* gene in a female patient. The aim of our study was to analyze the functional impact of this mutation.

Patient: At birth, the girl's length was 47 cm [−1.82 SD score (SDS)], and her weight was 2250 g (−2.26 SDS). Clinical examination revealed microcephaly and retarded cognitive development. She showed no postnatal catch-up growth but had relatively high IGF-I levels (+1.83 to +2.17 SDS).

Results: Denaturing HPLC screening and direct DNA sequencing disclosed a heterozygous missense mutation resulting in an amino acid exchange from valine to glutamic acid at position 599 (V599E-IGF1R). Using various cell systems, we found that the V599E-IGF1R mutant was not tyrosine phosphorylated and had an impaired downstream signaling in the presence of IGF-I. Flow cytometry and live cell confocal laser scanning microscopy revealed a lack of cell surface expression due to an extensive retention of V599E-IGF1R proteins within the endoplasmic reticulum.

Conclusion: The V599E-IGF1R mutation interferes with the receptor's trafficking path, thereby abrogating proreceptor processing and plasma membrane localization. Diminished cell surface receptor density solely expressed from the patient's wild-type allele is supposed to lead to insufficient IGF-I signaling. We hypothesize that this mechanism results in intrauterine and postnatal growth retardation of the affected patient. The reported retention of the nascent IGF1R in the endoplasmic reticulum presents a novel mechanism of IGF-I resistance. (*J Clin Endocrinol Metab* 95: 2316–2324, 2010)

The IGF-I receptor (IGF1R) is a tetrameric ($\alpha 2/\beta 2$) transmembrane tyrosine kinase. It is a member of the insulin receptor (IR) family consisting of the IGF1R, the IR, and the IR-related receptor. The IGF1R and the IR

show the same domain structure with a sequence homology of approximately 60% (1). Both receptors can bind IGF-I, IGF-II, and insulin (2, 3). The affinity for IGF-II depends on IR isoform and receptor composition, but the

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2010 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2009-2404 Received November 11, 2009. Accepted February 12, 2010.

First Published Online March 31, 2010

Abbreviations: ECFP, Enhanced cyan fluorescent protein; ER, endoplasmic reticulum; Fn, fibronectin; HC, head circumference; IGFBP3, IGF binding protein 3; IGF1R, IGF-I receptor; IR, insulin receptor; M1, early monomer; M2, late monomer; MFI, mean fluorescence intensity; rhGH, recombinant human GH; SDS, SD score; SGA, small for gestational age; VO, vector-only control; WT, wild type; YFP, yellow fluorescent protein.

IGF1R exerts higher affinity for IGF-I and the IR for insulin. The human IGF1R is transcribed as a single mRNA from its chromosomal location on 15q26.3 and becomes translated as a monomeric preproreceptor with a 30-amino acid signal sequence. Due to limited information on IGF1R biosynthesis, the IR is often used as a model (1, 4). Two IGF1R precursors are assembled by disulfide bonds to a precursor dimer. This step of dimerization is described for the IR to occur in the endoplasmic reticulum (ER) (5, 6). After dimerization and core glycosylation, the IGF1R is transported to the Golgi complex where it is cleaved into α - and β -subunits by the protease furin. This transmembrane subtilisin-like protease is mainly located in the trans-Golgi network and is critical for IGF1R processing (7, 8). In cells that express a mutated IGF1R with a disrupted furin cleavage site or in cells with a furin deficiency, only the IGF1R precursor is detectable (7–10). After cleavage, the IGF1R is expressed as a tetramer (α - β / β - α) at the cell surface. Ligand binding induces transautophosphorylation and phosphorylation of a wide variety of downstream signaling molecules (11, 12). The physiological role of the IGF-I/IGF1R system is accordingly manifold. It plays an important role in regulation of cell growth and metabolism and has been shown to have an impact on cancer development and life span (1, 13–15). IGF1R null mutant mice die at birth due to respiratory failure and have a reduction of size and weight by about 55% compared with wild-type (WT) newborn mice. Heterozygous knock-out mice are born with a similar birth weight as their WT littermates but develop significant growth retardation (16). Newborn patients with IGF1R mutations have been described as small for gestational age (SGA) to a variable degree (13, 17). The birth length varies between -5.8 and -0.3 SD score (SDS), and the birth weight varies between -3.5 and -1.5 SDS. All patients reported so far did not show postnatal catch-up growth, and their height ranged between -5.0 and -1.6 SDS. Some of these patients present slight dysmorphic features (like triangular shape of face or small hands and feet), but others are phenotypically normal. Information about the impact of the mutations on mental development is inconsistent. In different developmental tests, their scores varied between 60 and 134 (10, 18).

Patient and Methods

Genetic analysis and endocrine evaluation

Molecular genetic analysis was performed as described previously (19). Briefly, all coding exons of the *IGF1R* gene were amplified by PCR and prescreened with HPLC (WAVE; Transgenomic, Omaha, NE). PCR products displaying aberrant chromatograms were further analyzed by direct sequencing (ABI 310;

Applied Biosystems, Foster City, CA). IGF-I and IGF binding protein 3 (IGFBP3) levels were measured with either IGF-I and IGFBP3 chemiluminescence assay for Immulite 2000 (Siemens, München, Germany) or IGF-I and IGFBP3 ELISA (Mediagnost, Reutlingen, Germany). IGF-II levels were measured with IGF-II ELISA Non Extraction (Beckmann Coulter, Fullerton, CA). All other hormones were analyzed by standard techniques. Written informed consent for molecular analysis was obtained from the patient's parents.

Plasmid construction

The amino acid numbering refers to the mature IGF1R without the 30-amino acid signal peptide. IGF1R WT cDNA was kindly provided by Dr. R. Furlanetto (previously of the Medical University of South Carolina, Charleston, SC). At open reading frame position 1886, the mutation adenine for thymine was introduced into the WT plasmid using QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene Co., La Jolla, CA). IGF1R cDNA constructs were cloned into pcDNA3.1+ plasmids resulting in WT and mutant IGF1R (WT-IGF1R and V599E-IGF1R). These plasmids were used for immunoblotting and flow cytometry with the original pcDNA3.1+ plasmid as vector-only control (VO). For confocal laser scanning microscopy, WT-IGF1R and V599E-IGF1R were fused to the NH₂ terminus of the enhanced form of yellow fluorescent protein (YFP), and the tagged constructs were inserted into pcDNA5/FRT/TO expression vectors (Invitrogen, Carlsbad, CA). Sequence integrity of all plasmids was verified by restriction digestion and direct sequencing. Details concerning the cloning strategy are available on request.

Cell culture and transfection

All cells were cultured in DMEM (Invitrogen) or DMEM F12 with 10% fetal calf serum (PAA Laboratories, Pasching, Austria) at 37 C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. For R⁻ (IGF1R-deficient mouse fibroblasts) and COS-7 cells, 1% glutamine (PAA Laboratories) was added, and for HEK293 and HepG2 cells, 100 IU/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin were added to the medium. R⁻ and COS-7 cells were seeded on six-well plates and transiently transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. For IGF-I stimulation experiments, the amount of DNA was carefully titrated to prevent constitutive autophosphorylation of the receptor. Transient transfection of HEK293 cells was carried out with TransIT-LT1 (Mirus Bio Corporation, Madison, WI) essentially as recommended by the distributor. For cotransfections of plasmids encoding the IGF1R with plasmids encoding ER or Golgi markers, the ratio of DNA was 0.6/0.4. Stably expressing cell lines were created using the pcDNA5/FRT/TO system in Flp-In. T-REx. -293 cells (Invitrogen).

Immunoblotting

After transfection, cells were washed and scraped into ice-cold PBS and lysed for 30 min at 4 C using either modified RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% Nonidet P-40, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, protease inhibitors] or furin assay buffer [100 mM HEPES (pH 7.5), 0.5% Triton X-100, 1 mM CaCl₂, 1 mM 2-mercaptoethanol]. Samples were centrifuged (12,000 \times g, 20 min, 4 C), and the protein concentration of the supernatants was determined with BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL). Equal amounts of protein solution were mixed with concentrated Laemmli sample buffer

[200 mM Tris-HCl, 40% glycerol, 8% sodium dodecyl sulfate, 8% 2-mercaptoethanol, 0.3% bromophenol blue (pH 6.8)] and resolved by SDS-PAGE. 2-Mercaptoethanol was omitted when analyses were performed under nonreducing conditions. Proteins were thereafter blotted onto nitrocellulose membranes, and the membranes were blocked, washed, and incubated with specific primary antibodies overnight. Anti-phospho-IGF1R β (Tyr1135/1136), anti-phospho-Akt (Ser473), anti-Akt (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA), anti-IGF1R α (H-78), anti-IGF1R β (C-20) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) or anti- β Actin antibodies (Sigma, St. Louis, MO) were used as primary antibodies. The next day, membranes were washed and incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated secondary goat-antirabbit (Thermo Fisher Scientific Inc.) or goat-antimouse (Dako, Glostrup, Denmark) antibodies. The secondary antibodies were visualized with SuperSignal West Pico (Thermo Fisher Scientific Inc.). If necessary, antibody complexes were washed off the membranes using stripping buffer [2% sodium dodecyl sulfate, 60 mM Tris-base (pH 6.8), 0.8% 2-mercaptoethanol] at 50 C and treated in a second round of detection as described.

IGF-I-induced IGF1R signaling

Recombinant IGF-I was donated by Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). R⁻ cells were seeded and transfected as described above. Twenty-four hours after transfection, cells were washed with PBS and cultured in serum free medium containing 0.2% BSA (Invitrogen) overnight. Thereafter, cells were incubated with increasing amounts of IGF-I for 15 min at 37 C in serum free media. Cell lysis was accomplished with modified RIPA lysis buffer containing 20 mM sodium fluoride and 2 mM sodium vanadate. Samples were immunoblotted as described above. Then 50 mM sodium fluoride was added to washing, blocking, and antibody solution.

Flow cytometry

COS-7 cells were seeded and transfected as described above. The next day, cells were washed and harvested with PBS containing 0.5 mM EDTA and 0.2% BSA. After a second washing step, equal numbers of cells were incubated for 45 min at 4 C with phycoerythrin-labeled anti-IGF1R antibodies or phycoerythrin labeled IgG1 isotype control antibodies (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN). Samples were washed again and resuspended in ice-cold PBS, and 10,000 cells were analyzed using a Coulter Epics XL flow cytometer (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA).

Furin cleavage assay

R⁻ cells were seeded and transfected as described above. Thirty-six hours after transfection, cell lysis was accomplished with furin assay buffer and 5 U recombinant furin (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) per 50- μ l sample. After centrifugation, the supernatants were incubated for one additional hour at 30 C. Reaction was stopped by addition of concentrated Laemmli buffer and denaturation by boiling. Samples were analyzed by immunoblotting as described above.

Confocal live cell laser scanning microscopy

Confocal laser scanning microscopy was performed as live cell imaging. HEK293 cells were seeded on poly-L-lysine-coated coverslips, transiently transfected the next day, and analyzed

another 16–30 h later. Flp-In. T-REx. –293 cells were seeded on coated coverslips, induced with tetracycline the next day, and analyzed 12 h later. Therefore, cells were transferred into a live cell chamber providing cell culture conditions (37 C and 5% CO₂) and phenol red free medium. Microscopy was carried out using a Zeiss LSM 510 Meta confocal laser-scanning microscope and a \times 63 water-corrected immersion objective with a numerical aperture of 1.2 (C-Apochromat 63x/1.2w) (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany). Trypan blue (Seromed, Berlin, Germany) at a concentration of 0.015% was used to stain the membrane. Colocalization analysis was performed using enhanced cyan fluorescent protein (ECFP)-tagged markers for ER and Golgi (pECFP-ER, pECFP-Golgi) (Clontech, Mountain View, CA). Excitation and detection of fluorescence was optimized for each fluorophore. The thickness of optical slices was kept at less than 0.8 μ m.

Results

Patient

The girl from Southern Germany was born with intrauterine growth retardation [height 47 cm, –1.82 height-SDS; weight 2250 g, –2.26 weight-SDS; head circumference (HC) 30 cm, < 3rd percentile] after a normal pregnancy (40th gestational week) as the first child of non-consanguineous parents. She presented with missing catch-up growth and a reduced HC [age 9.02 yr, height 122.9 cm (–2.10 height-SDS), weight 26.2 kg (+0.38 weight-SDS), HC 48 cm (<3rd percentile)] (Fig. 1, A and B). Growth velocity was in the lower normal range before recombinant human GH (rhGH) therapy (average, –1.81 SDS) (20). Her father is of normal height (178 cm), but her mother was also born SGA (height 46 cm, –2.27 height-SDS; weight 2250 g, –2.26 weight-SDS; HC 32 cm, <3rd percentile) and has a final height of 147 cm (–3.30 height-SDS). According to Greulich-Pyle, the girl's bone age was retarded by 1.83 yr at the age of 7.83 yr. TSH, free T₃, free T₄, transglutaminase IgA, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, γ GTP, estradiol, LH, FSH, prolactin, leptin, and adiponectin were within the normal range. HbA_{1c} levels were 5.7, 5.9, and 6.0% on three occasions (normal, 4.3–5.8%); however, an oral glucose tolerance test was normal. Electroencephalogram, electrocardiogram, audiometry, and brain imaging (magnetic resonance imaging) were unsuspecting. The patient suffers from an attention deficit hyperactivity disorder and presents a developmental retardation compared with a peer group (–2.0 SDS in Kaufman Assessment Battery for Children). IGF-I levels were high (+1.83 to +2.17 SDS), and IGFBP3 levels were in the upper normal range (Fig. 1, A and C). At the age of 7.42 yr, GH therapy was initiated with doses between 0.031 and 0.036 mg/kg·d leading to a marginal improvement in growth velocity (Fig. 1A). IGF-II was measured (1281 ng/ml), but validated pediatric ref-

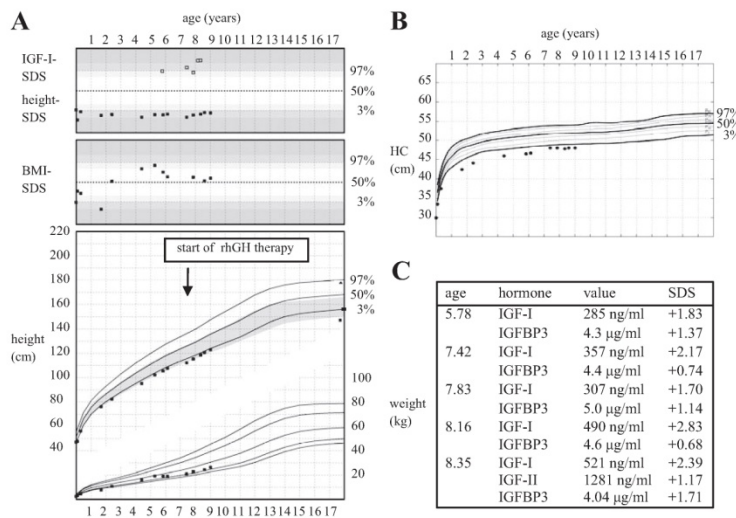


FIG. 1. Clinical and endocrinological data of the affected patient. A, IGF-I-SDS, height-SDS, BMI-SDS, growth chart, and weight chart of the patient. On the growth chart, 97th, 50th, and 3rd percentiles (Krohmeier-Hauschild) are indicated. The shaded area depicts target height calculated from parent's height. Black arrow indicates start of rhGH therapy. B, HC chart of the patient. C, Table with endocrinological data of the patient.

erence values were not available (21). Compared with a cohort of healthy blood donors from Leipzig that showed an age-independent scatter of IGF-II values, the patient's level was normal (+1.17 SDS; donors older than 20 yr, $n = 153$). The karyotype of the patient was normal (46, XX). Because the patient meets the criteria of an IGF1R mutation screening project at our hospital (−2.00 height-SDS or −2.00 weight-SDS at birth, no catch-up growth, and normal/elevated IGF-I levels), molecular genetic analysis of all coding exons of the *IGF1R* gene was performed.

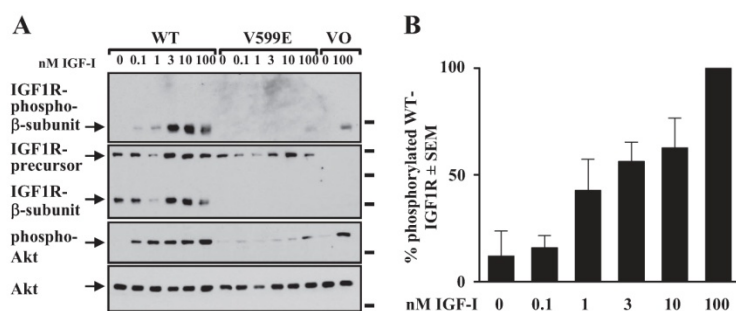


FIG. 2. IGF-I-induced phosphorylation of IGF1R and downstream signal proteins (Akt). A, Immunoblotting of WT-IGF1R (WT), V599E-IGF1R (V599E), and vector-only transfected cells after stimulation with indicated amounts of IGF-I for 15 min. Immunoblotting was performed with primary antibodies against phospho-IGF1R (top), IGF1R β -subunit (second from top), phospho-Akt (third from top), and Akt (bottom). Arrows on the left indicate phosphorylated IGF1R β -subunit (97 kDa), IGF1R precursor (200 kDa), IGF1R β -subunit (97 kDa), phosphorylated Akt (60 kDa), and Akt (60 kDa). Bars on the right indicate molecular mass standard downward from top: 100, 250, 150, 100, 37, and 37 kDa. B, Densitometric quantification of phosphorylated WT-IGF1R after stimulation. Results are calculated from three independent experiments as percentage of total activation (100 nM) with SEM.

Direct sequencing revealed a heterozygous mutation in position 1886 of the open reading frame with a transversion from thymine to adenine resulting in an amino acid exchange from valine 599 to glutamic acid (V599E). The patient's mother was identified as carrier of the mutation.

IGF-I-induced IGF1R signaling

IGF-I-induced phosphorylation was investigated to analyze the signal transduction ability of the V599E-IGF1R. WT-IGF1R transfected R⁻ cells revealed a dose-dependent increase in the phosphorylation of the β -subunit of IGF1R and Pkb/Akt as downstream effector in the presence of IGF-I. In contrast, in V599E-IGF1R transfected cells, no phosphorylation of IGF1R β -subunit or Akt above background was detectable (Fig. 2, A and B). At high IGF-I concentrations (100 nM), weak bands are visible in the V599E-IGF1R and vector-only samples, most probably due to activation of the endogenous IR at supraphysiological IGF-I doses and cross-reactivity of the antibody used in this assay. In control experiments, which were performed to ensure equal expression of WT and mutant plasmids, the β -subunit of the V599E-IGF1R was not detectable.

Expression of IGF1R subunits

Protein expression of the V599E-IGF1R was analyzed by immunoblotting. As expected, the IGF1R α -subunit (130 kDa) (data not shown), the IGF1R β -subunit (97 kDa), and the IGF1R precursor (200 kDa) were detectable in WT-IGF1R transfected cells under reducing conditions. In contrast, V599E-IGF1R transfected R⁻ cells presented only the IGF1R precursor. V599E-IGF1R transfected COS-7 cells presented no IGF1R β -subunit above background (Fig. 3). These findings were independent from the amount of transfected DNA and time of cell lysis after transfection (12, 24, and 36 h; data not shown).

IGF1R cell surface expression

Cell surface expression of the IGF1R was determined by means of flow cytometry using COS-7 cells. The mean

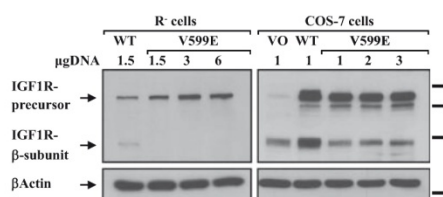


FIG. 3. Immunoblotting of R⁻ and COS-7 cells against IGF1R β -subunit (upper blots) or β Actin (lower blots). Cells are transfected with WT-IGF1R (WT), V599E-IGF1R (V599E), or VO with indicated amounts of DNA per 2 ml medium. Arrows on the left indicate IGF1R precursor (200 kDa), IGF1R β -subunit (97 kDa), and β Actin (42 kDa). Bars on the right indicate molecular mass standard downward from top: 250, 150, 100, and 37 kDa.

fluorescence intensity (MFI) was measured to assess the IGF1R expressed at the cell surface (Fig. 4). MFI of V599E-IGF1R transfected cells ($42.60 \text{ MFI} \pm 5.96 \text{ SEM}$) was significantly reduced compared with the WT-IGF1R transfected cells ($117.03 \text{ MFI} \pm 11.02 \text{ SEM}$) ($P < 0.01$). Comparing the MFI of V599E-IGF1R with vector-only transfected cells ($28.03 \text{ MFI} \pm 3.32 \text{ SEM}$) revealed no significant difference ($P > 0.05$).

Cleavage of IGF1R precursors

Furin cleavage assay was performed to investigate the cleavage ability of mutated IGF1R. Addition of recombinant furin to whole cell lysates of WT-IGF1R- and V599E-IGF1R transfected cells led to an almost complete digestion of the IGF1R precursor resulting in a strong β -subunit band and a diminished precursor band on immunoblotting. Therefore, we conclude that the V599E-IGF1R is not resistant to furin. The incubation of whole cell lysates of V599E-IGF1R transfected cells for 1 h at 37 C without addition of furin and protease inhibitors presented a faint IGF1R β -subunit band. This is possibly due to endogenous furin activity because the receptor mutant precursor becomes accessible for the furin enzymes due to artificial

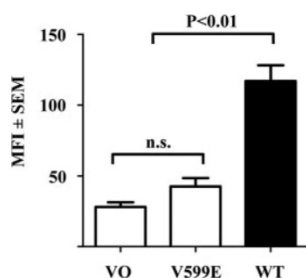


FIG. 4. Cell surface expression of IGF1R measured by means of flow cytometry. COS-7 cells were transfected with WT-IGF1R (WT), V599E-IGF1R (V599E), or VO. MFI \pm SEM from three independent experiments. MFI of WT-IGF1R and V599E-IGF1R or vector-only transfected cells are significantly different ($P < 0.01$). MFI of V599E-IGF1R and vector-only transfected cells are not significantly different (n.s.).

decompartmentalization under the experimental conditions (Fig. 5).

Expression of disulfide bond IGF1R forms

Due to the lack of the IGF1R β -subunit in V599E-IGF1R transfected cells, the fate of the nascent mutant receptor was further analyzed. Under nonreducing conditions, four receptor forms are described for the IR to occur during maturation: the early monomer (M1, 185 kDa), the late monomer (M2, 200 kDa), the precursor dimer (380 kDa), and the receptor tetramer (410 kDa) (5). These four receptor forms of the IR are also described for the IGF1R (22). Nonreducing immunoblotting of WT-IGF1R transfected cells 36 h after transfection revealed one high molecular band (about 400 kDa) and two lower bands (190 and 200 kDa) (Fig. 6A). This observation was independent from cell type (COS-7 or R⁻) and time of cell lysis after transfection (immunoblotting 12 h after transfection; data not shown). We assume that the lower bands correspond with the early and late monomeric form (M1 and M2) of the IGF1R. The high molecular band probably contains both the precursor dimer and the tetrameric receptor. These forms are not resolved under the conditions of our assay. Similarly, in V599E-IGF1R transfected cells, a high molecular band and two lower bands were detected. Due to the lack of proreceptor cleavage, the high molecular band probably represents the dimeric but not the tetrameric isoform.

Intracellular trafficking of IGF1R

Live cell confocal microscopy was performed to investigate the intracellular trafficking of the V599E-IGF1R. Cell surface, ER, and Golgi dye showed typical cellular compartments without cross-staining. The missing cellular uptake of trypan blue to the cytoplasm indicated cell vitality. The WT-IGF1R was predominantly expressed at the cell surface visualized by the high colocalization with trypan blue. Depending on the expression level, a smaller portion of WT-IGF1R proteins colocalized with ER and Golgi markers. In contrast, V599E-IGF1R proteins were

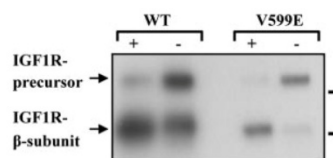


FIG. 5. Cleavage assay. R⁻ cells were transfected with either WT-IGF1R (WT) or V599E-IGF1R (V599E). Whole cell lysates incubated with (+) or without (-) recombinant furin for 1 h at 37 C. Immunoblot with primary antibodies against the IGF1R β -subunit. Arrows on the left indicate IGF1R precursor (200 kDa) and IGF1R β -subunit (97 kDa). Bars on right indicate molecular mass standard downward from top: 150 and 100 kDa.

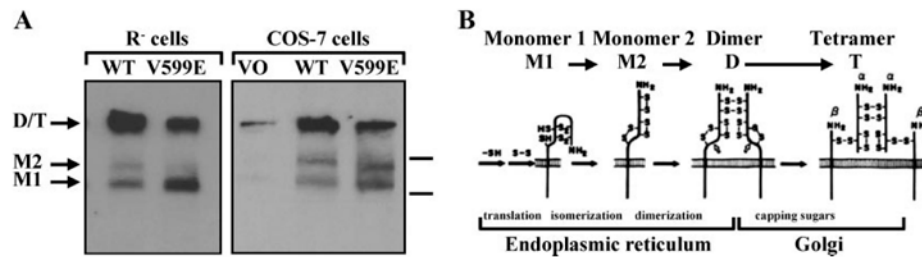


FIG. 6. Nonreducing immunoblotting. A, R⁻ and COS-7 cells were transfected with WT-IGF1R (WT), V599E-IGF1R (V599E), or VO. Immunoblotting was performed without reducing agents and primary antibodies against IGF1R β -subunit. Arrows on the left indicate IGF1R tetramer (~420 kDa; T), IGF1R precursor dimer (~380 kDa; D), IGF1R late monomer (~210 kDa; M2), and IGF1R early monomer (~200 kDa; M1). Bars on right indicate molecular mass standard downward from top: 250 and 200 kDa. B, Model of IGF1R maturation inside the ER and Golgi apparatus. Figures were modified from Ref. 5. After translation, the disulfide bonds of the M1 form are rearranged to the M2 form. Two M2 forms are assembled to IGF1R precursor dimer (D). Dimer is transported to Golgi and after cleavage reassembled to mature IGF1R (T).

nearly completely retained within the ER. No expression at the cell surface or within the Golgi compartment could be detected by microscopy. These distribution patterns are visualized in transiently transfected HEK 293 cells (Fig. 7, A and B). They were confirmed in HepG2 cells in transient expression and in the Flp-In, T-REx, -293 cell system as inducible system to exclude overexpression artifacts. Furthermore, we transiently expressed V599E-IGF1R in doxycycline-induced WT-IGF1R cells. The coexpression of mutant and WT receptor could not abolish the cell surface expression of WT-IGF1R proteins (data not shown). In summary, the V599E-IGF1R proteins turned out to be transport incompetent and completely retained within the ER.

Discussion

We identified a novel heterozygous IGF1R mutation in a girl born SGA who showed relatively high serum IGF-I levels. A hydrophobic amino acid at the position 599 is highly conserved in human IR, IGF1R, and IR-related receptor and also in a wide variety of different species (23). The mutation is located in the extracellular second fibronectin (Fn) III domain of the IGF1R. Fn III domains are found in a variety of proteins but frequently in extracellular matrix proteins and cell surface adhesion proteins (1). IGF1R and IR have three consecutive Fn III domains with an insert sequence containing the furin cleavage site within the second domain. Fn domains seem to allow protein-protein interactions and presumably act as spacer elements (1). Recent studies have revealed that the first Fn III domain is directly involved in IR ligand binding (24). Mutations of the second Fn III domain of IR can also lead to a massive change of insulin affinity (25). However, the functional impact of the second Fn domain of IGF1R is not yet clear. Our patient is heterozygous for the mutation, like all other SGA patients reported so far with mutations

in the *IGF1R* gene. We performed homozygous experiments to characterize the mutant's function and heterozygous expression to investigate the influence of the mutant on the WT receptor's trafficking. Phosphorylation assays were performed to characterize the activation and signal transduction ability of the V599E-IGF1R. Neither phosphorylation of IGF1R nor Akt could be detected in the presence of IGF-I representing a complete loss of function of the V599E-IGF1R mutant. Flow cytometry and live cell confocal laser scanning microscopy revealed a severely impaired trafficking of the mutant, resulting in an abolished cell surface expression. Additional immunoblotting under reducing conditions showed only a 200 kDa precursor form of the V599E-IGF1R. The subunits of the matured tetrameric receptor, which occur in WT transfected cells after cleavage in the trans-Golgi network, are not detectable in V599E-IGF1R transfected cells. Because this absence is independent from time intervals between transfection and immunoblotting and amount of transfected DNA, we conclude that this deficiency is genuine and not due to artifacts introduced by the experimental procedure. Furin cleavage assays suggested that the V599E-IGF1R is *per se* not resistant to the protease. Because furin is mainly located in the trans-Golgi network and whole cell lysates of V599E-IGF1R transfected cells do not contain any subunits of cleaved IGF1R, we conclude that the V599E-IGF1R does not reach this cellular compartment. By live cell confocal laser scanning microscopy we could identify the mutant as ER-retained. Membrane proteins like the IGF1R are matured within the ER and the Golgi apparatus and then transported to the cell membrane. The ER plays an important role in the cellular quality control, and various chaperones and enzymes are involved in the sophisticated endoplasmic processing of membrane proteins (26–28). Endoplasmic retention, accumulation, and eventual ER-associated degradation of mutated and misfolded proteins are performed by two

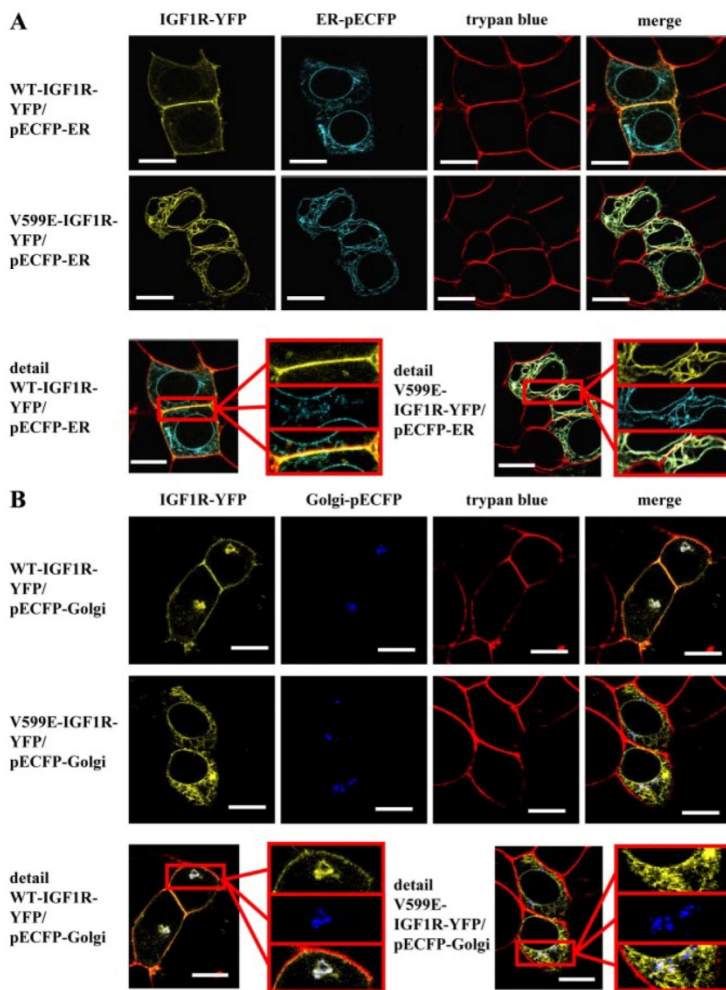


FIG. 7. Confocal laser scanning microscopy of transfected HEK293 cells. Cells were transfected with fluorescently tagged WT-IGF1R (WT-IGF1R-YFP) or V599E-IGF1R (V599E-IGF1R-YFP). Membrane staining and cell vitality control was performed with trypan blue visualized by its red fluorescence. *White bars* indicate 10 μ m. **A**, Cotransfection with ECFP-tagged markers for the ER (pECFP-ER). **B**, Cotransfection with ECFP-tagged markers for the Golgi apparatus (pECFP-Golgi).

levels within the quality control system. The primary quality control—based on structural and biophysical features—includes chaperones and folding sensors that retain proteins with a nonnative conformation by binding to modified or incorrectly exposed protein regions. Disturbances of protein glycosylation are causing retention by this primary control. Mutations of asparagine sites of the IR are known to lead to ER retention (27, 29, 30). The secondary quality control is based on specific recognition mechanisms. So far, such specific control proteins are not known for the IGF1R, and the V559E mutation leads to no specific ER retention motifs on the amino acid level

like the RXR- or KDEL-motifs (28, 31). Therefore, we assume that the V559E-IGF1R mutant is retained by the primary quality control system of the ER, which prohibits its furin cleavage in the Golgi.

Three different types of IR have been observed inside the ER during maturation (5). The receptor is translated as an early monomeric form (M1) and rearranged to a late monomeric form (M2), and two M2 forms are assembled to a precursor dimer (D). There is evidence that the IGF1R undergoes similar maturation (22). Characterizing the V599E-IGF1R, we were able to detect all three receptor forms. Because the receptor proteins are retained within the ER, we conclude that the dimerization of the IGF1R precursor also occurs in the ER as previously described for the IR. Moreover, this occurrence of all ER-associated proreceptor forms indicates unhampered disulfide bond-mediated proreceptor processing of V599E-IGF1R.

Only a few cases of IGF1R mutations in humans have been described (10, 17, 18, 22, 32–34). Intrauterine and postnatal growth retardation without complete postnatal catch-up growth is the central feature of all patients. Auxological data of our patient were between -2.83 and -1.82 SDS for height, between -2.57 and $+1.57$ SDS for body mass index, and between -3.28 and -2.34 SDS for HC. With respect to these data, our patient always had proportionate growth retardation. Patients with terminal deletion of chromosome 15 and a complete loss of the *IGF1R* and adjacent genes present growth retardation and multiple dysmorphic signs (35–37). Patients with IGF1R mutations, however, were reported with only mild (like triangular shape of face or small hands and feet) or no dysmorphic signs. Similarly, our patient has no distinct anomalies. Apart from two cases, the bone age of all described patients with IGF1R mutations was found to be delayed like in our patient. Developmental tests in affected patients revealed heterogeneous results. Our patient showed a mental retardation that could be explained by the influence of the GH/IGF-I axis on cognitive function

(38). An important clinical question is the interaction of disturbed IGF-I signaling and glucose homeostasis. HbA_{1c} levels of the patient described in this study were in the upper normal range or slightly elevated (5.7–6.0%), but an oral glucose tolerance test was unsuspecting. In summary, the clinical symptoms of our patient were comparable to those of other patients with IGF1R mutations, which have been shown to cause defect ligand binding, incomplete proreceptor processing, or impaired receptor autophosphorylation. The symptoms observed in our patient can be explained by the IGF1R haploinsufficiency due to ER retention of the protein expressed from the mutated allele. Because coexpression of mutant and WT receptor did not lead to an abolishment of the WT cell surface expression, we conclude that the growth retardation is due to a quantitative reduction of functional IGF1R at the cell surface and the lack of receptor maturation and plasma membrane trafficking. ER retention of the immature receptor has been identified for the first time as the underlying pathomechanism of IGF-I resistance. A detailed clinical evaluation of additional patients combined with an in-depth molecular analysis possibly will tell us whether certain types of IGF1R mutations are associated with or predispose to specific comorbidities such as developmental delay as observed in our patient. Further studies on larger patient populations of patients with IGF1R defects also should enable us to evaluate the benefits and risks of the therapeutic intervention with rhGH in this special subgroup of SGA patients with IGF-I resistance and demonstrate options to avoid comorbidities or alleviate their effects.

Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Roland Pfäffle, University Hospital for Children and Adolescents, Liebigstrasse 20a, D-04103 Leipzig, Germany. E-mail: rpfaeffle@medizin.uni-leipzig.de.

Disclosure Summary: This work was supported by grants from the Medical Faculty of the University of Leipzig (to T.W.) and Deutsche Forschungsgemeinschaft (Bonn, Germany, project PF 225/3-1) (to R.P. and W.K.). W.K. has also received unrestricted research grants from Pfizer, Novo Nordisk, Ipsen, and Merck Serono. Work in the laboratory of W.K. is also supported by KFO 152, Deutsche Forschungsgemeinschaft (Bonn, Germany), and Kompetenznetze Adipositas und Diabetes, Bundesministerium für Bildung und Forschung (Berlin, Germany). T.W., S.W., J.Kl., T.K., J.Kr., G.S., M.S., E.M., H.S.v.d.L. have nothing to declare. W.K. is on Pfizer and Novo Nordisk advisory boards. R.P. received lecture fees from Eli Lilly, Pharmacia, and Novo Nordisk.

References

- Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW 2000 Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci* 57:1050–1093
- Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC, Forbes BE 2005 Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:421–439
- Denley A, Bonython ER, Booker GW, Cosgrove LJ, Forbes BE, Ward CW, Wallace JC 2004 Structural determinants for high-affinity binding of insulin-like growth factor II to insulin receptor (IR)-A, the exon 11 minus isoform of the IR. *Mol Endocrinol* 18:2502–2512
- LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts Jr CT 1995 Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16:143–163
- Olson TS, Bamberger MJ, Lane MD 1988 Post-translational changes in tertiary and quaternary structure of the insulin proreceptor. Correlation with acquisition of function. *J Biol Chem* 263:7342–7351
- Bass J, Chiu G, Argon Y, Steiner DF 1998 Folding of insulin receptor monomers is facilitated by the molecular chaperones calnexin and calreticulin and impaired by rapid dimerization. *J Cell Biol* 141:637–646
- Anderson ED, VanSlyke JK, Thulin CD, Jean F, Thomas G 1997 Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *EMBO J* 16:1508–1518
- Thomas G 2002 Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:753–766
- Lehmann M, André F, Bellan C, Remacle-Bonnet M, Garrouste F, Parat F, Lissitsky JC, Marvaldi J, Pommier G 1998 Deficient processing and activity of type I insulin-like growth factor receptor in the furin-deficient LoVo-C5 cells. *Endocrinology* 139:3763–3771
- Kawashima Y, Kanzaki S, Yang F, Kinoshita T, Hanaki K, Nagaishi J, Ohtsuka Y, Hisatome I, Ninomoya H, Nanba E, Fukushima T, Takahashi S 2005 Mutation at cleavage site of insulin-like growth factor receptor in a short-stature child born with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4679–4687
- Butler AA, Yakar S, Gewolb IH, Karas M, Okubo Y, LeRoith D 1998 Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 121:19–26
- Laviola L, Natalicchio A, Giorgino F 2007 The IGF-I signaling pathway. *Curr Pharm Des* 13:663–669
- Klammt J, Pfäffle R, Werner H, Kiess W 2008 IGF signaling defects as causes of growth failure and IUGR. *Trends Endocrinol Metab* 19:197–205
- Suh Y, Atzmon G, Cho MO, Hwang D, Liu B, Leahy DJ, Barzilai N, Cohen P 2008 Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:3438–3442
- Tao Y, Pinzi V, Bourhis J, Deutsch E 2007 Mechanisms of disease: signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor pathway—therapeutic perspectives in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 4:591–602
- Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Géloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y 2003 IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421:182–187
- Walenkamp MJ, van der Kamp HJ, Percira AM, Kant SG, van Duyvenvoorde HA, Kruithof MF, Breuning MH, Romijn JA, Karperien M, Wit JM 2006 A variable degree of intrauterine and postnatal growth retardation in a family with a missense mutation in the insulin-like growth factor I receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3062–3070
- Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, Grigorescu F, Lautier C, Keller E, Kiess W, Klammt J, Kratzsch J, Osgood D, Pfäffle R, Raile K, Seidel B, Smith RJ, Chernausek SD 2003 IGF-I receptor muta-

- tions resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Engl J Med* 349:2211–2222
19. Pfaeffle RW, Savage JJ, Hunter CS, Palme C, Ahlmann M, Kumar P, Bellone J, Schoenau E, Korsch E, Brämswig JH, Stobbe HM, Blum WF, Rhodes SJ 2007 Four novel mutations of the LHX3 gene cause combined pituitary hormone deficiencies with or without limited neck rotation. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1909–1919
 20. Brandt I, Reinken L 1988 Die Wachstumsgeschwindigkeit gesunder Kinder in den ersten 16 Lebensjahren: Longitudinale Entwicklungsstudie Bonn - Dortmund. *Klin Pädiatr* 200:451–456
 21. Abellan R, Ventura R, Palmi I, di Carlo S, Bacosi A, Bellver M, Olive R, Pascual JA, Pacifici R, Segura J, Zuccaro P, Pichini S 2008 Immunoassays for the measurement of IGF-II, IGFBP-2 and -3, and ICTP as indirect biomarkers of recombinant human growth hormone misuse in sport. Values in selected population of athletes. *J Pharm Biomed Anal* 48:844–852
 22. Inagaki K, Tiulpakov A, Rubtsov P, Sverdlowa P, Peterkova V, Yakar S, Terekhov S, LeRoith D 2007 A familial insulin-like growth factor-I receptor mutant leads to short stature: clinical and biochemical characterization. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1542–1548
 23. Garza-Garcia A, Patel DS, Gems D, Driscoll PC 2007 RILM: a web-based resource to aid comparative and functional analysis of the insulin and IGF-1 receptor family. *Hum Mutat* 28:660–668
 24. McKern NM, Lawrence MC, Streltsov VA, Lou MZ, Adams TE, Lovrecz GO, Elleman TC, Richards KM, Bentley JD, Pilling PA, Hoyne PA, Cartledge KA, Pham TM, Lewis JL, Sankovich SE, Stoichevska V, Da Silva E, Robinson CP, Frenkel MJ, Sparrow LG, Fernley RT, Epa VC, Ward CW 2006 Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation. *Nature* 443:218–221
 25. Whittaker L, Hao C, Fu W, Whittaker J 2008 High-affinity insulin binding: insulin interacts with two receptor ligand binding sites. *Biochemistry* 47:12900–12909
 26. Ellgaard L, Helenius A 2003 Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:181–191
 27. Hirsch C, Gauss R, Horn SC, Neuber O, Sommer T 2009 The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature* 458:453–460
 28. van Anken E, Braakman I 2005 Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40:191–228
 29. Collier E, Carpentier JL, Beitz L, Carol H, Taylor SI, Gorden P 1993 Specific glycosylation site mutations of the insulin receptor α subunit impair intracellular transport. *Biochemistry* 32:7818–7823
 30. Elleman TC, Frenkel MJ, Hoyne PA, McKern NM, Cosgrove L, Hewish DR, Jachno KM, Bentley JD, Sankovich SE, Ward CW 2000 Mutational analysis of the N-linked glycosylation sites of the human insulin receptor. *Biochem J* 347:771–779
 31. Lewis MJ, Pelham HR 1992 Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell* 68:353–364
 32. Raile K, Klammt J, Schneider A, Keller A, Laue S, Smith R, Pfäffle R, Kratzsch J, Keller E, Kiess W 2006 Clinical and functional characteristics of the human Arg59Ter insulin-like growth factor I receptor (IGF1R) mutation: implications for a gene dosage effect of the human IGF1R. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2264–2271
 33. Fang P, Schwartz ID, Johnson BD, Derr MA, Roberts Jr CT, Hwa V, Rosenfeld RG 2009 Familial short stature caused by haploinsufficiency of the insulin-like growth factor I receptor due to nonsense-mediated messenger ribonucleic acid decay. *J Clin Endocrinol Metab* 94:1740–1747
 34. Kruis T, Klammt J, Galli-Tsinopoulou A, Wallborn T, Schlicke M, Muller E, Kratzsch J, Körner A, Odeh R, Kiess W, Pfäffle R 2010 Heterozygous mutation within a kinase-conserved motif of the insulin-like growth factor I receptor causes intrauterine and postnatal growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 95:1137–1142
 35. Hammer E, Kutsche K, Haag F, Ullrich K, Sudbrak R, Willig RP, Braulke T, Kubler B 2004 Mono-allelic expression of the IGF-I receptor does not affect IGF responses in human fibroblasts. *Eur J Endocrinol* 151:521–529
 36. Hengstschläger M, Mittermayer C, Repa C, Drahnovsky R, Deutingen J, Bernaschek G 2004 Association of deletions of the chromosomal region 15q24-ter and diaphragmatic hernia: a new case and discussion of the literature. *Fetal Diagn Ther* 19:510–512
 37. Klaassens M, van Dooren M, Eussen HJ, Douben H, den Dekker AT, Lee C, Donahoe PK, Galjaard RJ, Goemaere N, de Krijger RR, Wouters C, Wauters J, Oostra BA, Tibboel D, de Klein A 2005 Congenital diaphragmatic hernia and chromosome 15q26: determination of a candidate region by use of fluorescent in situ hybridization and array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet* 76:877–882
 38. van Nieuwpoort IC, Drent ML 2008 Cognition in the adult with childhood-onset GH deficiency. *Eur J Endocrinol* 159(Suppl 1):S53–S57

5. ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Klinisches Erscheinungsbild und zugrundeliegende molekularbiologische Mechanismen der heterozygoten V599E-IGF-I Rezeptormutation

eingereicht von:

Tillmann Wallborn

angefertigt an:

Universität Leipzig / Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche

betreut von:

Dr. rer. nat. Jürgen Klammt

Prof. Dr. med. Wieland Kiess

Monat und Jahr der Einreichung:

Juni 2011

5.1 Screeningprojekt IGF1R Mutationen

Im Jahr 2003 wurde unter Mitarbeit des Forschungslabors der Kinderklinik Leipzig erstmals eine IGF1R Mutation als Ursache eines intrauterinen Kleinwuchses mit IGF-I Resistenz beschrieben (87). Zur Identifikation weiterer Mutationen wurden auffällige SGA-Patienten auf Veränderungen des IGF1R Gens untersucht (Geburtslänge und/oder Geburtsgewicht < 2,0 SDS, Körpergröße mit 3 Jahren oder älter < -2,0 SDS, IGF-I Spiegel > -0,5 SDS). Die Auswahl der Patienten erfolgte zum Teil über die auxologische Sprechstunde der Klinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche der Universität Leipzig. Zusätzlich wurden Patienten über das in Leipzig beheimatete Netzwerk zur Früherkennung von Störungen der Wachstums- und Gewichtsentwicklung (CrescNet gGmbH) sowie durch nationale und internationale Kooperationen rekrutiert. Ausschlusskriterien für die Aufnahme in die Studie waren die Diagnose eines syndromischen oder organisch bedingten Kleinwuchses.

Die in dieser Studie beschriebene Patientin wurde klinisch durch hohe IGF-I Spiegel (bis +2,17 SDS) bei einer ausgeprägten intrauterinen und postnatalen Wachstumsretardierung auffällig. Sie hatte zur Geburt eine Körperlänge von 47 cm (-1,82 SDS), ein Körpergewicht von 2250 g (-2,26 SDS) und einen Kopfumfang von 30 cm (< 3. Perzentile). Postnatal zeigte sie kein Aufholwachstum und erreichte schließlich zu Beginn dieser Studie im Alter von 9,02 Jahren eine Körpergröße von 122,9 cm (-2,10 SDS), ein Körpergewicht von 26,2 kg (+0,38 SDS) und einen Kopfumfang von 48 cm (< 3. Perzentile). Eine Knochenalterbestimmung nach Greulich und Pyle im chronologischen Alter von 7,83 Jahren zeigte eine Entwicklungsverzögerung von 1,83 Jahren.

Bei einigen Patienten mit IGF1R Mutationen wurde ein vermehrtes Auftreten von Diabetes Mellitus Typ II beobachtet (88). Mögliche Ursachen sind die molekularstrukturellen Ähnlichkeiten von IGF-I und Insulin bzw. der entsprechenden Rezeptoren und eine nachweisbare Interaktion beider Systeme. Bei der hier beschriebenen Patientin zeigte ein oraler Glukosetoleranztest jedoch keine Auffälligkeiten. HbA_{1c} Werte waren grenzwertig normal zwischen 5,7 und 6,0% (normal 4,3-5,8%). Weitere paraklinische Tests wie Elektrokardiographie, Elektroenzephalographie, Audiometrie, Schädel-Magnetresonanztomographie und Blutuntersuchungen (TSH, fT3, fT4, Transglutaminase IgA, ALAT, ASAT, γ GT, Estradiol, LH, FSH und Prolaktin) waren unauffällig. Diagnostiziert wurde eine Aufmerksamkeitsdefizit/Hyperaktivitätsstörung. Ein Intelligenztest zeigte eine starke Entwicklungsverzögerung (-2,0 SDS in Kaufmann Assessment Battery for Children). Eine im Alter von 7,42 Jahren initiierte Wachstumshormontherapie erbrachte nur eine marginale Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit.

Zur weiteren Diagnostik wurden durch Amplifikation genomischer DNA der Patientin PCR Fragmente des IGF1R gewonnen. Diese wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie auf Sequenzabweichungen untersucht und Bruchstücke mit auffälligem Elutionsmuster sequenziert. Dabei wurde eine heterozygote Punktmutation in Position 1886 des offenen Leserahmens gefunden. Diese Mutation hat einen Aminosäureaustausch in Position 599 des IGF1R Proteins von Valin zu Glutaminsäure zur Folge (V599E-IGF1R). Position 599 befindet sich in der extrazellulären zweiten Fibronektin III (FN-III) Domäne des Rezeptors. FN-III Domänen finden sich in einer großen Anzahl verschiedener Proteine, insbesondere in extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen und Fibronektin (93). Hauptsächlich vermitteln diese Domänen Protein-Protein Interaktionen und fungieren als Platzhalter zur korrekten Positionierung funktionell relevanter Proteinregionen. Innerhalb des IGF1R und des Insulinrezeptors (IR) sind jeweils drei aufeinanderfolgende FN-III Domänen integriert. Die zweite Domäne wird von einer Zwischensequenz unterbrochen, in der sich eine Schnittstelle für die Protease Furin befindet. Die Bedeutung der FN-III Domänen des IGF1R ist bisher unbekannt. Studien am IR deuten eine

mögliche Involvierung dieser Regionen in die Ligandenbindung an (94). Interessanterweise zeigt ein Interspeziesvergleich der Mutationsposition sowohl für den IGF1R als auch für den IR und den IR-related Rezeptor einen hohen Konservierungsgrad (95). Bei einem breiten Spektrum von Lebewesen finden sich an der entsprechenden Position die hydrophoben und pH neutralen Aminosäuren Valin, Leucin oder Isoleucin. Die bei der hier beschriebenen Patientin an dieser Position vorkommende Glutaminsäure hingegen ist bei ähnlichem Molekularvolumen hydrophil und sauer. Bereits vor den ersten Experimenten zeigte sich so ein erster Hinweis auf eine mögliche funktionelle Relevanz der Mutation.

5.2 Experimentelle Untersuchungen

Ziel der experimentellen Untersuchungen war der Nachweis eines Zusammenhangs zwischen Mutation und Kleinwuchs und des zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismus. Leider konnten für die experimentellen Untersuchungen keine Primärzellen der betroffenen Patientin verwendet werden. Daher wurden alle Versuche mit IGF1R cDNA transfizierten COS-7 bzw. R- Zellen (IGF1R defiziente Mausfibroblasten) durchgeführt. Mit den verwendeten Systemen ließen sich in Transfektionsexperimenten nur homozygote Konstellationen in befriedigender Qualität simulieren. Diese entsprachen zwar nicht der Patientensituation, erlaubten aber eine Überprüfung der Mutationsfolgen ohne Überlagerung durch Wildtyp-IGF1R (WT-IGF1R). Insbesondere R- Zellen boten somit für die Durchführung dieser Studie einen erheblichen Vorteil.

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Fähigkeit des mutierten IGF1R zur Autophosphorylierung untersucht. Mit V599E-IGF1R transfizierte Zellen zeigten nach Stimulation mit IGF-I auch in supraphysiologischen Dosen keinerlei Phosphorylierung des Rezeptors oder nachgeschalteter Signalproteine. Kontrollexperimente an WT-IGF1R transfizierten Zellen hingegen wiesen erwartungsgemäß eine dosisabhängige Phosphorylierungskurve auf. Zusätzlich auffällig war das Fehlen gereifter V599E-IGF1R Proteine in diesem Versuch. Während sich mittels Western Blots in WT-IGF1R Zellen sowohl Vorläuferproteine als auch gereifte IGF1R Proteine nachweisen ließen, fanden sich in V599E-IGF1R Zellen lediglich Vorläuferproteine.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde der Ursache der fehlenden Rezeptorantwort nachgegangen. Transfizierte Zellen wurden mit Antikörpern gegen den extrazellulären Teil des IGF1R inkubiert und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Anders als in WT-IGF1R Zellen war in V599E-IGF1R Zellen kein Rezeptor an der Zelloberfläche nachweisbar. Zusammen mit

den Ergebnissen des Phosphorylierungsassays ließen diese Befunde auf eine posttranslationale, intrazelluläre Reifestörung des V599E-IGF1R schließen.

Zur Lokalisation dieser Störung wurde der V599E-IGF1R mit einem Fluoreszenzprotein fusioniert und in HEK293-Zellen eingebracht. Der fluoreszierende IGF1R wurde anschließend unter Zuhilfenahme eines konvokalen Laserscannmikroskops lokalisiert. Diese Arbeit wurde dankenswerterweise von einer kooperierenden Arbeitsgruppe der Universität Aachen durchgeführt. Durch Co-Transfektion mit Markern für das Endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat konnte schließlich eine Retention des V599E-IGF1R im ER nachgewiesen werden. Diese Retention konnte durch eine weitere Versuchsreihe unserer Leipziger Arbeitsgruppe bestätigt werden. Western Blot Versuche zeigten, dass der V599E-IGF1R genau wie der WT-IGF1R nach einer Zellyse und der damit verbundenen Aufhebung intrazellulärer Kompartimente durch die Protease Furin geschnitten werden kann. Die Protease Furin befindet sich vorwiegend im Trans-Golgi-Netzwerk und überführt den Vorläufer-IGF1R während des normalen Reifeprozesses in seine aktive Form. Die Tatsache, dass der V599E-IGF1R durch Furin schneidbar war, in transfizierten Zellen aber nur als Vorläuferprotein vorkam stützte die These, dass dieses Protein das Trans-Golgi-Netzwerk nicht erreicht.

Die experimentellen Befunde konnten so eine befriedigende Antwort auf die initiale Fragestellung geben. Die V599E-IGF1R Mutation erzeugt ein Protein, dass nach der Translation im ER retiniert wird. Dieser Mechanismus wird mit der hier vorgelegten Studie zum ersten Mal beschrieben. Es ist mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass dieser Mechanismus für die partielle IGF-I Resistenz der Patientin verantwortlich ist. Eine tiefgreifendere Untersuchung der gestörten Prozessierung innerhalb des ER erbrachte bedauerlicherweise keine weiteren Erkenntnisse. Mittels nicht reduzierenden Western Blots konnten alle innerhalb des ERs vorkommenden Rezeptorvorstufen nachgewiesen werden. Eine weitere Untersuchung der Retentionsursache scheint daher nur mit erheblichem experimentellen Aufwand realisierbar zu sein und muss daher einer neuen Studie vorbehalten bleiben.

5.3 Einordnung in den aktuellen wissenschaftlichen Diskurs

Die Identifikation von IGF1R Mutationen als Kleinwuchsursache ist ein weiterer medizingeschichtlicher Schritt der Aufdeckung genetisch verursachter Wachstumsstörungen. Mit diesem Schritt sind nun vom Growth Hormone Releasing Hormone Rezeptor bis zum IGF1R auf allen Ebenen der GH/IGF-I Achse genetische Defekte und ihre korrespondierenden klinischen Bilder entdeckt worden. Dabei zeigten sich auffällige Phänotypen wie das Laron-Syndrom bei Growth Hormone Rezeptor Defekten, gemeinsame Merkmale wie Hörstörungen bei

homozygoten IGF-I Mutationen, aber auch variierende Erscheinungsformen wie bei Patienten mit IGF1R Mutationen. Genetisch bedingter Kleinwuchs ist insgesamt ein stark heterogenes Krankheitsbild ohne einheitliches klinisches Korrelat. Die auch mit dieser Studie gewonnenen neuesten Forschungsergebnisse vertiefen und erweitern das Verständnis dieses Krankheitsbildes. Möglicherweise werden so zukünftig die Identifikation betroffener Patienten und ein frühzeitiger Behandlungsbeginn deutlich erleichtert.

Nach der ersten Entdeckung einer funktional relevanten IGF1R Mutation im Jahr 2003 wurden weltweit lediglich 19 weitere Mutationsträger beschrieben. Insbesondere über therapeutische Interventionsmöglichkeiten zur Verbesserung der Lebensqualität der betroffenen Patienten gibt es bisher kaum wissenschaftliche Erkenntnisse. Versuche mit rekombinantem GH zeigten nur sporadischen Erfolg. Auch über die Häufigkeit von IGF1R Mutationen kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden. Die bekannten Mutationen wurden durch sehr kleine Screeningprogramme, meist bei SGA-Patienten mit hohen IGF-I Spiegeln, entdeckt. Selbst über die Häufigkeit dieser Patientengruppe unter SGA-Patienten, also die Häufigkeit potentieller Mutationsträger, gibt es keine verlässlichen Daten aus großen Studien. Dies alles zeigt, dass auf dem Feld der genetischen Wachstumsstörungen auch künftig noch erheblicher Forschungsbedarf bestehen wird.

6. REFERENZEN

1. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ 1989 Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 2:577-580
2. Clayton PE, Cianfarani S, Czernichow P, Johannsson G, Rapaport R, Rogol A 2007 Management of the child born small for gestational age through to adulthood: a consensus statement of the International Societies of Pediatric Endocrinology and the Growth Hormone Research Society. *J Clin Endocrinol Metab* 92:804-810
3. Wit JM, Finken MJ, Rijken M, Walenkamp MJ, Oostdijk W, Veen S 2005 Confusion around the definition of small for gestational age. *Pediatr Endocrinol Rev* 3:52-53; author reply 54
4. Saenger P, Czernichow P, Hughes I, Reiter EO 2007 Small for gestational age: short stature and beyond. *Endocr Rev* 28:219-251
5. Villar J, de Onis M, Kestler E, Bolanos F, Cerezo R, Bernedes H 1990 The differential neonatal morbidity of the intrauterine growth retardation syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 163:151-157
6. Bernstein IM, Horbar JD, Badger GJ, Ohlsson A, Golan A 2000 Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network. *Am J Obstet Gynecol* 182:198-206
7. Oyen N, Skjaerven R, Little RE, Wilcox AJ 1995 Fetal growth retardation in sudden infant death syndrome (SIDS) babies and their siblings. *Am J Epidemiol* 142:84-90
8. Pfab T, Slowinski T, Godes M, Halle H, Priem F, Hocher B 2006 Low birth weight, a risk factor for cardiovascular diseases in later life, is already associated with elevated fetal glycosylated hemoglobin at birth. *Circulation* 114:1687-1692
9. Hinchliffe SA, Lynch MR, Sargent PH, Howard CV, Van Velzen D 1992 The effect of intrauterine growth retardation on the development of renal nephrons. *Br J Obstet Gynaecol* 99:296-301
10. Forsen T, Eriksson J, Tuomilehto J, Reunanen A, Osmond C, Barker D 2000 The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes. *Ann Intern Med* 133:176-182
11. Bavdekar A, Yajnik CS, Fall CH, Bapat S, Pandit AN, Deshpande V, Bhawe S, Kellingray SD, Joglekar C 1999 Insulin resistance syndrome in 8-year-old Indian children: small at birth, big at 8 years, or both? *Diabetes* 48:2422-2429

12. Hofman PL, Cutfield WS, Robinson EM, Bergman RN, Menon RK, Sperling MA, Gluckman PD 1997 Insulin resistance in short children with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 82:402-406
13. Bazaes RA, Alegria A, Pittaluga E, Avila A, Iniguez G, Mericq V 2004 Determinants of insulin sensitivity and secretion in very-low-birth-weight children. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1267-1272
14. Geremia C, Cianfarani S 2004 Insulin sensitivity in children born small for gestational age (SGA). *Rev Diabet Stud* 1:58-65
15. Tenhola S, Martikainen A, Rahiala E, Herrgard E, Halonen P, Voutilainen R 2000 Serum lipid concentrations and growth characteristics in 12-year-old children born small for gestational age. *Pediatr Res* 48:623-628
16. McCarton CM, Wallace IF, Divon M, Vaughan HG, Jr. 1996 Cognitive and neurologic development of the premature, small for gestational age infant through age 6: comparison by birth weight and gestational age. *Pediatrics* 98:1167-1178
17. Larroque B, Bertrais S, Czernichow P, Leger J 2001 School difficulties in 20-year-olds who were born small for gestational age at term in a regional cohort study. *Pediatrics* 108:111-115
18. Low JA, Handley-Derry MH, Burke SO, Peters RD, Pater EA, Killen HL, Derrick EJ 1992 Association of intrauterine fetal growth retardation and learning deficits at age 9 to 11 years. *Am J Obstet Gynecol* 167:1499-1505
19. Strauss RS 2000 Adult functional outcome of those born small for gestational age: twenty-six-year follow-up of the 1970 British Birth Cohort. *JAMA* 283:625-632
20. Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW 1976 Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* 295:349-353
21. Law CM, Shiell AW 1996 Is blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from a systematic review of the literature. *J Hypertens* 14:935-941
22. Huxley R, Neil A, Collins R 2002 Unravelling the fetal origins hypothesis: is there really an inverse association between birthweight and subsequent blood pressure? *Lancet* 360:659-665
23. Osmond C, Barker DJ, Winter PD, Fall CH, Simmonds SJ 1993 Early growth and death from cardiovascular disease in women. *BMJ* 307:1519-1524
24. Leon DA, Lithell HO, Vagero D, Koupilova I, Mohsen R, Berglund L, Lithell UB, McKeigue PM 1998 Reduced fetal growth rate and increased risk of death from ischaemic heart disease: cohort study of 15 000 Swedish men and women born 1915-29. *BMJ* 317:241-245

25. Rich-Edwards JW, Stampfer MJ, Manson JE, Rosner B, Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC, Hennekens CH 1997 Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *BMJ* 315:396-400
26. Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Winter PD, Osmond C, Barker DJ 1999 Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study. *BMJ* 318:427-431
27. Barker DJ, Godfrey KM, Fall C, Osmond C, Winter PD, Shaheen SO 1991 Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease. *BMJ* 303:671-675
28. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, Winter PD 1991 Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 303:1019-1022
29. Lithell HO, McKeigue PM, Berglund L, Mohsen R, Lithell UB, Leon DA 1996 Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50-60 years. *BMJ* 312:406-410
30. Lackland DT, Bendall HE, Osmond C, Egan BM, Barker DJ 2000 Low birth weights contribute to high rates of early-onset chronic renal failure in the Southeastern United States. *Arch Intern Med* 160:1472-1476
31. Hoy WE, Rees M, Kile E, Mathews JD, Wang Z 1999 A new dimension to the Barker hypothesis: low birthweight and susceptibility to renal disease. *Kidney Int* 56:1072-1077
32. Valdez R, Athens MA, Thompson GH, Bradshaw BS, Stern MP 1994 Birthweight and adult health outcomes in a biethnic population in the USA. *Diabetologia* 37:624-631
33. Leger J, Levy-Marchal C, Bloch J, Pinet A, Chevenne D, Porquet D, Collin D, Czernichow P 1997 Reduced final height and indications for insulin resistance in 20 year olds born small for gestational age: regional cohort study. *BMJ* 315:341-347
34. Salonen M, Tenhola S, Laitinen T, Lyyra-Laitinen T, Romppanen J, Jaaskelainen J, Voutilainen R 2010 Tracking serum lipid levels and the association of cholesterol concentrations, blood pressure and cigarette smoking with carotid artery intima-media thickness in young adults born small for gestational age. *Circ J* 74:2419-2425
35. Lundgren EM, Cnattingius HM, Jonsson GB, Tuvemo TH 2001 Linear catch-up growth does not increase the risk of elevated blood pressure and reduces the risk of overweight in males. *J Hypertens* 19:1533-1538
36. Ibanez L, Potau N, Ferrer A, Rodriguez-Hierro F, Marcos MV, de Zegher F 2002 Reduced ovulation rate in adolescent girls born small for gestational age. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3391-3393

37. Paz I, Gale R, Laor A, Danon YL, Stevenson DK, Seidman DS 1995 The cognitive outcome of full-term small for gestational age infants at late adolescence. *Obstet Gynecol* 85:452-456
38. van Wassenauer A 2005 Neuodevelopmental Consequences of Being Born SGA. *Pediatr Endocrinol Rev* 2:372-377
39. Xita N, Tsatsoulis A 2010 Fetal origins of the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1205:148-155
40. Hattersley AT, Tooke JE 1999 The fetal insulin hypothesis: an alternative explanation of the association of low birthweight with diabetes and vascular disease. *Lancet* 353:1789-1792
41. Morgan AR, Thompson JM, Murphy R, Black PN, Lam WJ, Ferguson LR, Mitchell EA 2010 Obesity and diabetes genes are associated with being born small for gestational age: results from the Auckland Birthweight Collaborative study. *BMC Med Genet* 11:125
42. Albertsson-Wikland K, Karlberg J 2003 Natural growth in children born SGA with and without catch up growth. *Horm Res* 59 Suppl 1:129
43. Karlberg J, Albertsson-Wikland K 1995 Growth in full-term small-for-gestational-age infants: from birth to final height. *Pediatr Res* 38:733-739
44. Statistisches Bundesamt 2010 Statistisches Jahrbuch 2010. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt
45. Wollmann HA 1998 Intrauterine growth restriction: definition and etiology. *Horm Res* 49:1-6
46. Johnston LB, Clark AJ, Savage MO 2002 Genetic factors contributing to birth weight. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 86:F2-3
47. Lee PA, Chernausek SD, Hokken-Koelega AC, Czernichow P 2003 International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age, April 24-October 1, 2001. *Pediatrics* 111:1253-1261
48. Hokken-Koelega AC, De Ridder MA, Lemmen RJ, Den Hartog H, De Muinck Keizer-Schrama SM, Drop SL 1995 Children born small for gestational age: do they catch up? *Pediatr Res* 38:267-271
49. Thomas M, Massa G, Craen M, de Zegher F, Bourguignon JP, Heinrichs C, De Schepper J, Du Caju M, Thiry-Counson G, Maes M 2004 Prevalence and demographic features of childhood growth hormone deficiency in Belgium during the period 1986-2001. *Eur J Endocrinol* 151:67-72

50. Nobili V, Alisi A, Panera N, Agostoni C 2008 Low birth weight and catch-up-growth associated with metabolic syndrome: a ten year systematic review. *Pediatr Endocrinol Rev* 6:241-247
51. de Zegher F, Ong KK, Ibanez L, Dunger DB 2006 Growth hormone therapy in short children born small for gestational age. *Horm Res* 65 Suppl 3:145-152
52. Ong KK, Ahmed ML, Emmett PM, Preece MA, Dunger DB 2000 Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. *BMJ* 320:967-971
53. Soto N, Bazaes RA, Pena V, Salazar T, Avila A, Iniguez G, Ong KK, Dunger DB, Mericq MV 2003 Insulin sensitivity and secretion are related to catch-up growth in small-for-gestational-age infants at age 1 year: results from a prospective cohort. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3645-3650
54. Vaag A 2009 Low birth weight and early weight gain in the metabolic syndrome: consequences for infant nutrition. *Int J Gynaecol Obstet* 104 Suppl 1:S32-34
55. Singhal A, Fewtrell M, Cole TJ, Lucas A 2003 Low nutrient intake and early growth for later insulin resistance in adolescents born preterm. *Lancet* 361:1089-1097
56. Lundgren M, Cnattingius S, Jonsson B, Tuvemo T 2004 Intellectual performance in young adult males born small for gestational age. *Growth Horm IGF Res* 14 Suppl A:S7-8
57. Brandt I, Sticker EJ, Lentze MJ 2003 Catch-up growth of head circumference of very low birth weight, small for gestational age preterm infants and mental development to adulthood. *J Pediatr* 142:463-468
58. Skuse D 1987 The psychological consequences of being small. *J Child Psychol Psychiatry* 28:641-650
59. Cohen P, Rogol AD, Deal CL, Saenger P, Reiter EO, Ross JL, Chernausek SD, Savage MO, Wit JM 2008 Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4210-4217
60. Case A, Paxson C 2008 Stature and Status: Height, Ability, and Labor Market Outcomes. *J Pol Econ* 116:499-532
61. Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C 2005 Infant growth and income 50 years later. *Arch Dis Child* 90:272-273
62. Persico N, Postlewaite A 2004 The Effect of Adolescent Experience on Labor Market Outcomes: The Case of Height. *J Pol Econ* 112:1019-1053

63. Yeung MY 2006 Postnatal growth, neurodevelopment and altered adiposity after preterm birth--from a clinical nutrition perspective. *Acta Paediatr* 95:909-917
64. Raben MS 1958 Treatment of a pituitary dwarf with human growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 18:901-903
65. Wajnrajch MP, Gertner JM, Harbison MD, Chua SC, Jr., Leibel RL 1996 Nonsense mutation in the human growth hormone-releasing hormone receptor causes growth failure analogous to the little (lit) mouse. *Nat Genet* 12:88-90
66. Mullis PE 2005 Genetic control of growth. *Eur J Endocrinol* 152:11-31
67. Takahashi Y, Kaji H, Okimura Y, Goji K, Abe H, Chihara K 1996 Short stature caused by a mutant growth hormone with an antagonistic effect. *Endocr J* 43 Suppl:S27-32
68. Besson A, Salemi S, Deladoey J, Vuissoz JM, Eble A, Bidlingmaier M, Burgi S, Honegger U, Fluck C, Mullis PE 2005 Short stature caused by a biologically inactive mutant growth hormone (GH-C53S). *J Clin Endocrinol Metab* 90:2493-2499
69. Dattani MT 2005 Growth hormone deficiency and combined pituitary hormone deficiency: does the genotype matter? *Clin Endocrinol (Oxf)* 63:121-130
70. GH RESEARCH SOCIETY 2000 Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH Research Society. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3990-3993
71. Wit JM, van Unen H 1992 Growth of infants with neonatal growth hormone deficiency. *Arch Dis Child* 67:920-924
72. Walenkamp MJ, Wit JM 2006 Genetic disorders in the growth hormone - insulin-like growth factor-I axis. *Horm Res* 66:221-230
73. Rosenfeld RG 2003 Insulin-like growth factors and the basis of growth. *N Engl J Med* 349:2184-2186
74. de Graaff LC, Baan J, Govaerts LC, Hokken-Koelega AC 2008 Facial and pituitary morphology are related in Dutch patients with GH deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* 69:112-116
75. Rosenfeld RG, Belgorosky A, Camacho-Hubner C, Savage MO, Wit JM, Hwa V 2007 Defects in growth hormone receptor signaling. *Trends Endocrinol Metab* 18:134-141
76. Laron Z 2004 Laron syndrome (primary growth hormone resistance or insensitivity): the personal experience 1958-2003. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1031-1044
77. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A 1993 Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75:59-72

78. Powell-Braxton L, Hollingshead P, Warburton C, Dowd M, Pitts-Meek S, Dalton D, Gillett N, Stewart TA 1993 IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev* 7:2609-2617
79. Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJ 1996 Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med* 335:1363-1367
80. Walenkamp MJ, Karperien M, Pereira AM, Hilhorst-Hofstee Y, van Doorn J, Chen JW, Mohan S, Denley A, Forbes B, van Duyvenvoorde HA, van Thiel SW, Sluimers CA, Bax JJ, de Laat JA, Breuning MB, Romijn JA, Wit JM 2005 Homozygous and heterozygous expression of a novel insulin-like growth factor-I mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2855-2864
81. Netchine I, Azzi S, Houang M, Seurin D, Perin L, Ricort JM, Daubas C, Legay C, Mester J, Herich R, Godeau F, Le Bouc Y 2009 Partial primary deficiency of insulin-like growth factor (IGF)-I activity associated with IGF1 mutation demonstrates its critical role in growth and brain development. *J Clin Endocrinol Metab* 94:3913-3921
82. Bonapace G, Concolino D, Formicola S, Strisciuglio P 2003 A novel mutation in a patient with insulin-like growth factor 1 (IGF1) deficiency. *J Med Genet* 40:913-917
83. Coutinho DC, Coletta RR, Costa EM, Pachi PR, Boguszewski MC, Damiani D, Mendonca BB, Arnhold IJ, Jorge AA 2007 Polymorphisms identified in the upstream core polyadenylation signal of IGF1 gene exon 6 do not cause pre- and postnatal growth impairment. *J Clin Endocrinol Metab* 92:4889-4892
84. van Duyvenvoorde HA, van Setten PA, Walenkamp MJ, van Doorn J, Koenig J, Gauguin L, Oostdijk W, Ruivenkamp CA, Losekoot M, Wade JD, De Meyts P, Karperien M, Noordam C, Wit JM 2010 Short stature associated with a novel heterozygous mutation in the insulin-like growth factor 1 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 95:E363-367
85. Ranke MB, Wolfle J, Schnabel D, Bettendorf M 2009 Treatment of dwarfism with recombinant human insulin-like growth factor-1. *Dtsch Arztebl Int* 106:703-709
86. Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y 2003 IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421:182-187
87. Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, Grigorescu F, Lautier C, Keller E, Kiess W, Klammt J, Kratzsch J, Osgood D, Pfaffle R, Raile K, Seidel B, Smith RJ, Chernausek SD 2003 IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Engl J Med* 349:2211-2222

88. Kruis T, Klammt J, Galli-Tsinopoulou A, Wallborn T, Schlicke M, Muller E, Kratzsch J, Korner A, Odeh R, Kiess W, Pfaffle R 2010 Heterozygous mutation within a kinase-conserved motif of the insulin-like growth factor I receptor causes intrauterine and postnatal growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 95:1137-1142
89. Inagaki K, Tiulpakov A, Rubtsov P, Sverdlova P, Peterkova V, Yakar S, Terekhov S, LeRoith D 2007 A familial insulin-like growth factor-I receptor mutant leads to short stature: clinical and biochemical characterization. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1542-1548
90. Walenkamp MJ, van der Kamp HJ, Pereira AM, Kant SG, van Duyvenvoorde HA, Kruithof MF, Breuning MH, Romijn JA, Karperien M, Wit JM 2006 A variable degree of intrauterine and postnatal growth retardation in a family with a missense mutation in the insulin-like growth factor I receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3062-3070
91. Raile K, Klammt J, Schneider A, Keller A, Laue S, Smith R, Pfaffle R, Kratzsch J, Keller E, Kiess W 2006 Clinical and functional characteristics of the human Arg59Ter insulin-like growth factor i receptor (IGF1R) mutation: implications for a gene dosage effect of the human IGF1R. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2264-2271
92. Kawashima Y, Kanzaki S, Yang F, Kinoshita T, Hanaki K, Nagaishi J, Ohtsuka Y, Hisatome I, Ninomoya H, Nanba E, Fukushima T, Takahashi S 2005 Mutation at cleavage site of insulin-like growth factor receptor in a short-stature child born with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4679-4687
93. Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW 2000 Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci* 57:1050-1093
94. McKern NM, Lawrence MC, Streltsov VA, Lou MZ, Adams TE, Lovrecz GO, Elleman TC, Richards KM, Bentley JD, Pilling PA, Hoyne PA, Cartledge KA, Pham TM, Lewis JL, Sankovich SE, Stoichevska V, Da Silva E, Robinson CP, Frenkel MJ, Sparrow LG, Fernley RT, Epa VC, Ward CW 2006 Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation. *Nature* 443:218-221
95. Garza-Garcia A, Patel DS, Gems D, Driscoll PC 2007 RILM: a web-based resource to aid comparative and functional analysis of the insulin and IGF-1 receptor family. *Hum Mutat* 28:660-668

7. ANLAGEN

7.1 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Leipzig, den

7.3 Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wieland Kiess für die Vergabe der Promotion und das damit entgegengebrachte Vertrauen, die Gewährleistung der Rahmenbedingungen für diese Arbeit, die großzügige Unterstützung und das häufige kritische Hinterfragen aller Daten.

Ich danke Prof. Dr. Roland Pfäffle für seine stete Hilfsbereitschaft und die klinisch-endokrinologische Beratung.

Ich danke der Aachener Arbeitsgruppe von Dr. Stefan Wüller und Hildegard Schmitz van de Leur für die sehr gute und erfolgreiche Kooperation.

Ganz besonders danke ich Dr. Jürgen Klammt für seine beinahe rund um die Uhr erfolgte Unterstützung bei Planung, Durchführung und Auswertung der gesamten Arbeit. Ohne ihn wäre sie nicht möglich gewesen.

Besonders danke ich auch Tassilo Kruis, mit dem ich mich freundschaftlich verbunden fühle und von dessen stets klar durchdachter und konzentrierter Arbeitsweise ich viel lernen konnte.

Ich danke Frau Dr. Gabriele Schmidt für die Erhebung und Übermittlung klinischer Daten, Prof. Dr. Jürgen Kratzsch für erfolgte labormedizinischen Untersuchungen und Marina Schlicke und Eva Müller für Hilfe, Beratung und Unterstützung. Ich danke Ruth Gausche von der CrescNet gGmbH für die epidemiologisch-statistische Beratung.

Gedankt sei außerdem dem gesamten Team des Leipziger Forschungslabors: Anja Barnikol-Oettler, Maria Schönberg, Daniela Friebe, Roy Tauscher, Antje Garten, Antje Berthold, Claudia Allritz, Sylvia Taube, Maike Ziegler, Anja Moll, Heike Stobbe, Gunter Flemming, Luise Kobelt, Rico Vogel, Norman Händel, Christin Melchior und Emanuela Klein. Ihnen allen danke ich für die vielseitige wissenschaftliche Unterstützung, die familiäre Arbeitsatmosphäre, die fröhlichen Aufmunterungen in schwierigen Phasen und die stete Versorgung mit Kaffee und Nutella. Sie alle haben dazu beigetragen, dass mein Forschungsjahr das schönste Jahr meines Studiums wurde.

Ich danke zudem der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig für die großzügige Förderung meiner Arbeit.