

Funktionelle Charakterisierung heterozygoter *GLI2 missense* Mutationen bei
Patienten mit multiplem hypophysären Hormonmangel

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

eingereicht von:

Gunter Matthias Christian Flemming geboren am 26.02.1982 in Leipzig.

angefertigt an der:

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Leipzig

Betreuung:

Dr. rer. nat. Jürgen Klammt

Prof. Dr. med. Roland Pfäffle

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 17.12.2013

Für meine geliebten Eltern zum 70. Geburtstag, die immer für mich da sind und mich immer unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Bibliographische Beschreibung	4
2. Abkürzungen (alphabetisch sortiert)	6
3. Hintergrund	8
3.1 Minderwuchs	8
3.2 GeNeSIS-Programm	10
3.3 Entwicklung, Aufbau und Funktion der Hypophyse.....	11
3.4 Molekularbiologie der Hypophysenentwicklung.....	12
3.4.1 Signalmoleküle, die die Stratifizierung der Rathke-Tasche und die Festlegung der hypophysären Zelllinien bestimmen	12
3.4.2 Transkriptionsfaktoren, welche die frühen Phasen der Anlage kontrollieren.....	13
3.5 <i>Hedgehog</i> -Gen Familie	15
3.5.1 SHH-Prozessierung und Freisetzung	16
3.5.2 SHH-Rezeptorbindung	17
3.5.3 SHH-Signaltransduktion	17
3.6 GLI-Proteine	18
3.6.1 GLI2	19
3.6.2 GLI2-Mutationen bei Menschen	20
3.7 Rationale für die Promotionsarbeit	20
4. Publikation	22
4.1. Druckversion	22
4.2 Supplemental Material	32
5. Zusammenfassung und Interpretation	40
5.1 Screening	41
5.2 GLI2-Varianten	41
5.3 Experimentelle Untersuchungen	42
5.4 Interpretation und Diskussion	43
6. Referenzen.....	45
7. Anlagen	54
7.1 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	54
7.2 Lebenslauf	55
7.3 Publikationen und Auszeichnungen	56
7.3.1 Publikationen:	56
7.3.1 Auszeichnungen	56
7.5 Danksagung.....	57

1. Bibliographische Beschreibung

Gunter Flemming

Titel: Funktionelle Charakterisierung heterozygoter *GLI2 missense* Mutationen in Patienten mit multiplem hypophysärem Hormonmangel

Universität Leipzig, Dissertation

57 Seiten, 103 Literaturverweise, 1 Originalpublikation (9 Seiten, 35 Literaturverweise, Artikel, 3 Abbildungen, 1 Tabelle) mit *Supplemental material* (8 Seiten, 2 Abbildungen)

Referat:

Der *GLI2*-Transkriptionsfaktor ist eines der Haupt Effektor-Proteine des Sonic Hedgehog (SHH)-Signalweges und hat vermutlich eine Schlüsselfunktion in der Entwicklung der Hypophyse. Genomische *GLI2*-Veränderungen welche zu abgeschnittenen Proteinen führten, wurden beschrieben als Ursache für Holoprosenzephalie (HPE) oder HPE-ähnliche Veränderungen, teilweise in Verbindung mit einer Hypophysenunterfunktion.

Ziel dieser Arbeit war die Ermittlung der Frequenz von *GLI2*-Mutationen in Patienten mit multiplem hypophysärem Hormonausfall (*multiple pituitary hormone deficiency*, MPHD) und eine funktionelle Untersuchung der gefunden Mutationen mittels Transkriptionsaktivitäts-Untersuchungen durch funktionelle *Luciferase assays*.

Hierfür wählten wir Teilnehmer der *GeNeSIS (Genetics and Neuroendocrinology of Short Stature International Study)*-Studie. Patienten bei denen bereits Mutationen eines der etablierten Gene für MPHD nachgewiesen wurde, wurden ausgeschlossen. Insgesamt haben wir 168 Patienten mit MPHD untersucht. Bei allen Patienten waren mindestens ein GH- und ein TSH-Mangel dokumentiert, Auffälligkeiten in der zentralen Bildgebung mittels cMRT wurden bei 96 Patienten angegeben.

In fünf Studienteilnehmern wurden vier verschiedene heterozygote *missense* Varianten nachgewiesen, hiervon wurden zwei bislang noch nicht in der Literatur beschrieben. Eine Variante, pR516P, führte in den in-vitro Experimenten zu einem kompletten Verlust der Proteinaktivität. Zusätzlich zu einem Wachstumshormonmangel hatte der Träger dieser Mutation einen Mangel an TSH und der Gonadotropine, sowie einen nichtdeszendenten Hypophysenhinterlappen und eine Polydaktylie, aber keine ersichtlichen Mittelliniendefekte.

Anhand der funktionellen Untersuchung konnten wir erstmalig nachweisen, dass ein heterozygoter Aminosäuren-Austausch im *GLI2*-Protein zu einer möglichen

Funktionseinschränkung der Transkriptionsaktivität führen kann und somit die Ursache für MPHD mit milden extrahypophysären Auffälligkeiten sein könnte. Der Phänotyp von GLI2-Mutationen ist variabel und die Penetranz ist unvollständig. GLI2-Mutationen sind assoziiert mit einer Hypoplasie des Hypophysenvorderlappens und treten gehäuft mit einem ektopen Hypophysenhinterlappen auf.

2. Abkürzungen (alphabetisch sortiert)

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADH	Anitdiuretisches Hormon
AXIN	<i>Axis inhibition protein</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BOC	<i>Brother of CDO</i>
C-terminal	carboxyterminal
CAM	Calmodulin
CDO	<i>CAM-related 1 downregulated by oncogenes</i>
CGA	<i>glycoprotein hormones, alpha subunit</i>
Ci	<i>Cubitus interruptus</i>
DHH	<i>Desert hedgehog</i>
DISP	<i>Dispatched</i>
EGF	<i>Epithelial growth factor</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
fl	<i>full length</i>
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GAS1	<i>Growth arrest-specific 1</i>
GeNeSIS	<i>Genetics and Neuroendocrinology in Short stature International Study</i>
(h)GH	<i>(human) Growth hormone</i>
GHRH(R)	<i>Growth hormone releasing hormone (receptor)</i>
GnRH(R)	<i>Gonadotropin releasing hormone (receptor)</i>
GLI	<i>Glioma-associated oncogene homologue-Proteine</i>
HES1	<i>Hairyand enhancer of split1</i>
HESX1	<i>Homeobox expressed in ES cells 1</i>
HEY1	<i>hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1</i>
HH	<i>Hedgehog</i>
HIP	<i>Hedgehog-interacting protein</i>
HPE	Holoprosenzephalie
HVL	Hypophysenvorderlappen
HLL	Hypophysenhinterlappen
IGF	<i>Insulin like growth factor</i>
IGFBP	<i>Insulin like growth factor binding protein</i>

2. Abkürzungen (alphabetisch sortiert)

IGHD	<i>Isolated growth hormone deficiency</i> –isolierter Wachstumshormonmangel
IHH	<i>Indian hedgehog</i>
ISL1	Islet 1
KIF7	Kinesin <i>family</i> 7
LH	Luteinisierendes Hormon
LHX	<i>LIM homeobox transcription factor</i>
LIM-Domäne	Lin-11, islet-1, mec-3 –cysteinreiche Zinkfinger-Bindungsdomäne
MPHD	<i>Multiple pituitary hormone deficiency</i> –multipler hypophysärer Hormonmangel
(c)MRT	(craniale) Magnetresonanztomographie
MSH	Melanozytenstimulierendes Hormon
N-terminal	Aminoterminal
PAX	<i>Paired box gene</i>
PKA	Phosphatkinase A
PTCH	<i>Patched</i>
PIT1	<i>Pituitary-specific positive transcription factor 1</i> (heute gebräuchlicher: POU1F1)
PITX	<i>Paired-like homeodomain transcription factor</i>
POU1F1	<i>POU-family</i> : PIT1, OCT1 and Unc-86
Prl	Prolaktin
PROP1	<i>Prophet of PIT1</i>
PTCH1	<i>Patched 1</i>
SDS	<i>Standard deviation score</i> –Standardabweichung
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
SMO	<i>Smoothend</i>
SIX	<i>Six homeodomain transcription factor</i>
SUFU	<i>Supressor of Protein Fused</i>
TSH	Thyreoida stimulierendes Hormon
WNT	<i>Wingnut</i>
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

3. Hintergrund

3.1 Minderwuchs

Minderwuchs zählt zu den häufigsten Gründen für den Besuch der pädiatrisch endokrinologischen Sprechstunde. Minderwuchs ist häufig das erste Symptom einer hypophysären Erkrankung, bedingt durch eine Störung der Signaltransduktion des Wachstumshormons (GH). Dies kann isoliert nur das Wachstumshormon (*isolated growth hormone deficiency*, IGHD) oder mehrere Achsen der hypophysären Hormonregulation betreffen (*multiple pituitary hormone deficiency*, MPHD) und mit oder ohne morphologischen Veränderungen der Hypophyse einhergehen. Die Gründe für eine mangelnde körperliche Entwicklung sind vielfältig [1], ursächlich beteiligt sein können: chromosomale Anomalien, genetische Faktoren, pränatale Störungen, Organ- und Stoffwechselerkrankungen, Hormonstörungen, Minderwuchs bei verschiedenen Syndromen, aber auch psychosozial bedingter Minderwuchs.

Wird der Minderwuchs rechtzeitig diagnostiziert, kann frühzeitig mit der ätiologischen Abklärung und bestmöglichen Therapie, gegebenenfalls mit einer GH-Substitution, begonnen werden.

Indikationen zur Untersuchung auf einen GH-Mangel stellen die folgenden Auffälligkeiten dar [2]:

- Länge ≤ -2.5 SDS unter dem Altersdurchschnitt
- Wachstumsgeschwindigkeit ≤ 25 . Perzentile, auch wenn aktuell kein Minderwuchs vorliegt
- Längen-SDS zwischen -2.0 und -2.5 unter dem Altersmittel in Verbindung mit Auffälligkeiten der Längenentwicklung ohne adäquate Erklärung
- Verdacht auf eine hypothalamisch-hypophysäre Dysfunktion (z.B. Hypoglykämien, Mikropenis, Kryptorchismus, Hypoplasie des *Nervus opticus*, intrakranielle Tumoren oder bei Zustand nach einer kranialen Radiatio) in Verbindung mit einem abnehmenden Längenwachstum [3]
- Nachweis von einem Mangel an hypothalamischen und oder hypophysären Hormonen (unabhängig ob erworben oder angeboren)

Wenn die Indikation zur Untersuchung des Kindes gegeben ist, sollten zunächst andere Ursachen für die Wachstumsstörung ausgeschlossen werden, hierzu zählen: Mangelernährung, chronische systemische Erkrankungen, Hypothyreose, Turner-Syndrom (bei Mädchen) und skelettale Fehlbildungen. Wenn es keine Hinweise auf solch eine

Erkrankung gibt, dann sollten zunächst die Bestimmungen von *insulin like growth factor-1* (IGF-1), sowie IGF-Bindungsprotein-3 (IGFBP-3) und eine Knochenalterbestimmung durchgeführt werden.

Bei dem kongenitalen Wachstumshormonmangel zeigt sich typischerweise keine unverminderte Geburtslänge aber eine ausgeprägte Wachstumsstörung innerhalb der ersten Lebensjahre und ein retardiertes Knochenalter. Deutlich erniedrigt sind die Serum-Werte für GH, IGF-1 und IGFBP-3 [3]. Leicht erniedrigte Serumwerte für IGF-1 und IGFBP-3 können durch einen GH-Mangel verursacht werden, aber auch bei anderen Ursachen für den Kleinwuchs auftreten (z.B. Mangelernährung). Erniedrigte IGF-1 und IGFBP-3 Werte sollten durch GH-Stimulationstests weiter abgeklärt werden. Bei Kindern werden zumeist der Arginin-, Clonidin- oder Glucagon-Stimulationstest durchgeführt, wohingegen der Insulin-induzierte Hypoglykämie-Stimulationstest bei Kindern aus Sicherheitsgründen nicht empfohlen wird [4]. Die Diagnose einer gestörten GH-Sekretion kann nur gestellt werden, wenn eine erniedrigte GH-Sekretion in zwei verschiedenen Stimulationstests nachgewiesen wurde. Bei Patienten mit einer bekannten Pathologie des zentralen Nervensystems (ZNS), mit Ausfall anderer hypophysärer Hormone oder einem entsprechenden genetischen Defekt ist nur ein GH-Stimulationstest ausreichend [2, 4].

Wenn ein GH-Mangel gesichert wurde, dann sollte neben einer Bestimmung der anderen hypophysären Hormone auch eine Magnetresonanztomographie (MRT) mit Fokussierung auf die Hypothalamus-Hypophysen-Region erfolgen. Durch die MRT-Untersuchung können sowohl Tumore ausgeschlossen werden, als auch bestimmte Malformationen der Hypophyse beurteilt werden, z.B.: Hypoplasie des Hypophysenvorderlappens (HVL), Agenesie des Hypophysenstiels und/oder eine ektopische Lage des Hypophysenhinterlappens (HHL). Somit können auch Hinweise für einen dauerhaften GH-Mangel gefunden werden, so zeigte eine Studie bei Jugendlichen nach Abschluss einer GH-Substitutionstherapie (wegen GH-Mangel im Kindesalter) häufiger eine Normalisierung des GH, wenn keine MR-morphologischen Auffälligkeiten der Hypothalamus-Hypophysen-Region nachweisbar waren [5].

In Abhängigkeit dieser Befunde kann dann gegebenenfalls mit einer Substitutionstherapie begonnen werden: dabei werden generell nur die betroffenen Effektorhormone ersetzt (bei MPH). Ausnahmen sind GH, welches sowohl bei IGHD und bei MPH und die Gonadotropine bei Fertilitätswunsch (bei MPH), welche als hypophysäre Hormone ersetzt werden.

Patienten unter einer Therapie mit hGH sollten zur Verlaufskontrolle regelmäßig in der endokrinologischen Ambulanz vorgestellt werden zum einen um den Therapie-Erfolg zu prüfen und zum anderen um mögliche Nebenwirkungen (u.a. gestörte Glukose-Toleranz, Pseudotumor cerebri oder Erhöhung des Augeninnendrucks [6]) rechtzeitig zu erkennen und zu therapieren.

Bislang konnten genetische Veränderungen nur in einem Teil der Patienten mit IGHD und MPHD nachgewiesen werden [7]. Ein besonderes Augenmerk liegt hier auch auf den Genen, welche in die Embryogenese der Hypophyse involviert sind [8, 9]. Die Untersuchung und Charakterisierung solcher genetischer Veränderungen spielt nicht nur für den Erkenntnisgewinn der physiologischen und pathophysiologischen Embryogenese bei verschiedenen Mutationen eine wesentliche Rolle, sondern ermöglicht auch eine genetische Beratung der Familie. Es kann gezielt nach weiteren, eventuell bislang bei dem Patienten unentdeckten Fehlbildungen oder Störungen, die mit bestimmten Mutationen assoziiert sind, gesucht werden. Zudem kann der Nachweis von Mutationen und die Klärung der Vererbungsmodi Aufschluss über das individuelle Wiederholungsrisiko für die Eltern bringen.

3.2 GeNeSIS-Programm

GeNeSIS (*Genetics and Neuroendocrinology in Short stature International Study*) ist eine offene, multinationale Observations- und Unbedenklichkeitsstudie nach Präparatzulassung. Die Studie wird finanziert durch Eli Lilly and Co. (Indianapolis, IN, USA). Ziel der Studie ist die Erfassung von Informationen über das klinische Management und den Behandlungsverlauf von Patienten mit Wachstumsstörungen unter der Therapie mit Wachstumshormon. Pädiatrische Patienten, die bereits eine Substitutionstherapie erhalten oder bei denen aufgrund einer Wachstumsstörung oder wegen einer Störung des Hypothalamus-Hypophysen-Systems eine Therapie mit Humatrope[®] (GH, Somatropin; Eli Lilly) begonnen werden soll, können in die Studie aufgenommen werden. Studienteilnehmer sollten auch nach Präparatewechsel oder Beendigung der Therapie in der Studie bleiben [10], um somit bessere Daten über den Langzeitverlauf zu erhalten. Ein weiterer Teil des GeNeSIS-Programms dient der Untersuchung des genetischen Hintergrundes von IGHD und MPHD, dabei werden sowohl bereits etablierte Gene (GH, GHRHR, PROP1, POU1F1, HESX1, LHX3, LHX4), als auch neu identifizierte Gene untersucht, die eine potentielle Auswirkung auf die Hypophysenentwicklung haben und/oder bei der Klärung der Pathophysiologie von MPHD/IGHD helfen könnten.

3.3 Entwicklung, Aufbau und Funktion der Hypophyse

Der Hypothalamus, der aus dem ventralen Diencephalon hervorgeht, ist die neuronale Schlüsselstruktur für die Regulation der Homöostase in Vertebraten. Er verarbeitet Informationen, sowohl der Peripherie als auch anderer Regionen des Gehirns, um die „innere Balance“ des Körpers aufrecht zu erhalten. Die wichtigsten Effektoren des Hypothalamus sind die Hypophyse und das autonome Nervensystem.

Die Hypophyse besteht aus drei Lappen und entspringt zwei unterschiedlichen embryologischen Anlagen: der Hypophysenvorderlappen (HVL) und der Mittellappen entstammen dem Ektoderm, wohingegen der Hypophysenhinterlappen (HHL) aus dem Neuroektoderm hervorgeht [11]. Im Plakodenstadium (Stadium 13) verdickt sich das ektodermale Dach der Mundbucht und legt sich vor der Rachenmembran dem Boden des Diencephalons eng an. Aus dieser plakodenartigen Verdickung entsteht im Stadium 17 die Hypophysentasche. An diese legt sich von oben und von *dorsal* die Anlage der Neurohypophyse an, welche sich aus dem Boden des Diencephalons ausstülpt. Die Aussackung des III. Ventrikels, die dadurch entsteht, bildet das Infundibulum. Die Trennung der Hypophyse vom Rachendach durch die knorpelige Schädelbasis erfolgt im Stadium 22. Dabei kommt die Hypophyse in der Aussparung der Sella turcica im Keilbein zu liegen. Die Verbindung zum Gehirn erfolgt durch den Hypophysenstiel.

Der HVL und die Pars tuberalis, die den Hypophysenstiel umgibt, entstehen aus der Vorderwand der Hypophysentasche. Das meningeale Bindegewebe wird vom Epithel der Hypophysentasche durchsprösst. Diese Knospen und Epithelstränge sind von Kapillaren durchsetzt und differenzieren zu endokrinen Zellen, welche folgende Peptidhormone bilden können:

- Wachstumshormon (Growth Hormone, GH), es beeinflusst eine Reihe von Stoffwechselprozessen und stimuliert das Wachstum
- Thyreoideastimulierendes Hormon (TSH), es regelt die Sekretion der Schilddrüsenhormone
- Prolaktin (Prl), es ermöglicht die Laktation
- Luteinisierendes Hormon (LH) und Follikelstimulierendes Hormon (FSH), sie gehören zu den Gonadotropinen und sind bei beiden Geschlechtern für das Wachstum und die Funktion der Geschlechtsdrüsen verantwortlich.
- Adrenokortikotropes Hormon (ACTH), es stimuliert in der Nebennierenrinde hauptsächlich die Sekretion von Kortisol

Die Ausschüttung dieser Hormone wird durch Nervenzellen des Hypothalamus (Vielzahl von Kerngebieten) gesteuert, diese produzieren *releasing* Faktoren. Nach dem dieses Neurosekret über die Axone der Nervenzellen zum Hypophysenstiel transportiert wurde, gelangt es über venöse Kapillaren zum HVL (Portalkreislauf der Hypophyse). Der Mittellappen der Hypophyse, Produktionsort für Melanozyten-stimulierendes Hormon (MSH), entsteht aus der Hinterwand der Hypophysentasche. Hypophysenstiel und HHL entstammen dem diencephalen Anteil der Anlage. Oxytozin und Vasopressin werden von Nervenzellen des Hypothalamus (paraventriculäre und supraoptische Kerngebiete) produziert und gelangen nach Transport in den Axonen zum HHL, dort werden sie in Kapillaren, die dem pialen Gefäßplexus entstammen, sezerniert [11, 12].

3.4 Molekularbiologie der Hypophysenentwicklung

Molekularbiologische Untersuchungen sind vorwiegend in Mausmodellen etabliert. Wichtige Signalmoleküle für die Entwicklung der Hypophyse sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

3.4.1 Signalmoleküle, die die Stratifizierung der Rathke-Tasche und die Festlegung der hypophysären Zelllinien bestimmen

Sonic Hedgehog (SHH): Es spielt eine entscheidende Rolle für Proliferation und die Entwicklung verschiedener Zelltypen bereits in der frühen Embryogenese. SHH wird im ventralen Diencephalon und im oralen Ektoderm gebildet, allerdings nicht in der Rathke-Tasche, obgleich das strangabwärts gelegene Ziel-Gen Patch1 (PTCH1) hier exprimiert wird. Dies zeigt, dass die Vorläuferzellen der Hypophyse empfänglich für SHH sind. Wichtige Ziel-Gene für SHH sind die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren GLI1, GLI2 und GLI3.

Fibroblast growth factors (FGFs): Sie sind entscheidend für die Organogenese und Zelldifferenzierung. Auch für die Entwicklung der Hypophyse sind sie bedeutend. FGF3, -8, -10 und -18 werden während der Embryogenese unter anderem im Diencephalon und im HHL gebildet [13, 14]. Für FGF8 und -10 wurde gezeigt, dass sie entscheidend für die Entwicklung der Hypophyse sind. Sie führen zur Induktion von LHX3 und LHX4. FGF3 wird zur Aktivierung von Genen wie PIT1 und LHX3 benötigt, welche die frühen Schritte der hypophysären Spezifizierung regulieren.

Bone morphogenetic proteins (BMPs): BMP2 und -4 sind maßgeblich an der Bildung des HVL beteiligt. Sie sind unter anderem verantwortlich für die Invagination der Rathke-

Tasche [14, 15]. BMP2 ist imstande die Expression von ISL1 und CGA einzuleiten. Beide sind ventrale Marker für die Hypophyse und supprimieren die Expression von ACTH.

Notchs: der *Notch*-Signalweg ist ein evolutionär konservierter Mechanismus für die Regulierung von Proliferation, Apoptose und Morphogenese während der frühen hypophysären Entwicklung. In späteren Phasen der Entwicklung nimmt die Notch-Aktivität deutlich ab, dies ist bedeutend für die Entdifferenzierung verschiedener Zelllinien. Direkte strangabwärts gelegene Zielgene sind *HEY1* und *HES1* [16, 17].

Wingnuts (WNTs): WNTs kontrollieren die Proliferation verschiedener Zellen und die Aufrechterhaltung und Verteilung von Stammzellen [13]. WNTs sind wichtig für das Wachstum und die Größe der Hypophyse und für die Ausbildung PIT1-abhängiger Zellen. Die Expression von 10 der 19 WNT-Gene konnten in der sich entwickelnden Hypophyse nachgewiesen werden. Bislang wurde für WNT4 und WNT5a gezeigt, dass sie spezifisch für die Entwicklung der vorderen Hypophyse sind [18]. Ein direktes Zielgen ist *AXIN2*.

Epithelial growth factor (EGF): die genaue Funktion von EGF für die Entwicklung der Hypophyse wurde noch nicht aufgeklärt, er scheint aber eine wichtige Rolle für die Ausbildung somatotroper und laktotroper Zellen zu haben [19].

3.4.2 Transkriptionsfaktoren, welche die frühen Phasen der Anlage kontrollieren

Paired-like homeodomänen Transkriptionsfaktoren (PITX): Besonders PITX1 und -2 haben sowohl überschneidende als auch unterschiedliche Expressionsmuster in der hypophysären Anlage [20]. Unter anderem können beide folgende hypophysäre Faktoren aktivieren: CGA, TSH β , LH β , FSH β , GnRHR, Prl und GH [21]. Sowohl PITX1 als auch -2 sind obligatorisch für die Induktion von LHX3 [22].

LIM-Homeodomän (LIM-HD) Transkriptionsfaktoren: Zwölf LIM-HD Proteine wurden in Säugern nachgewiesen, in der Rathke-Tasche unter anderen ISL1, LHX3 und LHX4. Die LIM-HD Proteine enthalten N-terminal vor der DNA-Bindungsstelle zwei Tandem-Wiederholungen, welche eine Protein-Protein-Interaktion mit Kofaktoren ermöglichen [23]. Die ISL1 Expression wird durch BMP2 induziert und durch FGF8/FGF2 reprimiert. ISL1 ist essenziell für die Proliferation und Differenzierung hypophysärer Progenitorzellen [14]. LHX3 wird benötigt um die Hesx1-Expression aufrecht zu erhalten und die PIT1-Expression zu induzieren [24]. Des Weiteren agiert LHX3 *downstream* von PITX1 und PITX2 und verhindert die Apoptose. LHX4 wird im Gegensatz zu LHX3 nicht mehr im Erwachsenenalter nachgewiesen.

HESX1: Die Expression von HESX1 wird von LHX3 und PROP1 reguliert, wobei HESX1 die Expression aufrechterhält und PROP1 die Expression reprimiert [25, 26]. HESX1 ist ein Transkriptionsrepressor mit zwei Repressordomänen, die N-terminal und in der Homeodomäne gelegen sind [27].

Prophet of Pit1 (PROP1/POU1F1): ist ein Homeodomänen-Transkriptionsfaktor. PROP1 fungiert sowohl als Aktivator als auch als Repressor der Transkription. PROP1 bindet an seine Bindungsstelle und aktiviert Zielgene über die C-terminal gelegene Transaktivierungs-Domäne, wohingegen der N-terminale Bereich repressorische Funktionen hat [28]. Der PROP1/ β -Catenin-Komplex fungiert als Aktivator für PIT1 und als Repressor für HESX1, dies ist abhängig von den beteiligten Kofaktoren [26]. Die Expression von PROP1 ist auf die sich entwickelnde Hypophyse beschränkt. Mutationen im PROP1-Gen sind eine der häufigsten bekannten Ursachen für multiplen hypophysären Hormonausfall (MPHD) [29].

SIX homeodomänen Transkriptionsfaktoren: In Säugern wurden sechs Mitglieder der SIX Familie gefunden, die abhängig von der Sequenzkonservierung zwei Subfamilien zugeordnet werden. SIX1, -3, -4 und SIX6 konnten in der Anlage der Hypophyse nachgewiesen werden. SIX1 und -4 haben Überschneidungen in ihren Zielgenen, wobei SIX1 bedeutender zu sein scheint und wichtig für die Modulierung der Proliferation hypophysärer Zellen ist [30]. Die SIX6 Expression unterliegt einem *dorsal-ventralen* Gradienten in der frühen hypophysären Entwicklung [13]. SIX3 wird in den am weitesten *anterior* gelegenen Bereich der Neuralplatte exprimiert und beschränkt sich während der Reifung auf Retina-Vorläuferzellen und die Hypophyse. SIX3 wirkt BMP4 und WNT entgegen und ermöglicht somit die *anteriore* Identität der Hypophyse [31].

Paired box gene 6 (PAX6): Es ist ein hoch konserviertes Mitglied einer Familie von Transkriptionsfaktoren. Es ist unter anderem für die Entwicklung von Augen, des olfaktorischen Systems, des Gehirns, des Rückenmarks und des Pankreas zuständig. Während der hypophysären Entwicklung wird PAX6 im oralen Ektoderm gebildet, aber nicht in den Regionen in denen SHH produziert wird. Die PAX6 Expression hat einen *dorsal-ventralen* Gradienten in der Hypophyse und wird herunter reguliert, wenn die Zellen ihre Entdifferenzierung erhalten. Somit ist PAX6 für die Ausbildung einer Grenze zwischen *dorsalen* somatotropen/laktotropen und *ventralen* thyreotropen/gonadotropen Bereichen mitverantwortlich [32].

3.5 Hedgehog-Gen Familie

Das *Hedgehog*-Gen wurde erstmals 1980 in *Drosophila* bei Untersuchungen zur Segmentierung identifiziert [33]. Mutationen dieses Gens führen dazu, dass die Larven Stacheln auf der Unterseite bekamen und somit an Igel erinnern. *Hedgehog* ist ein Segmentpolarisationsgen, welches in den *posterioren* Zellen jedes Segmentes gebildet wird und in einem konzentrationsabhängigen Gradienten für eine Aktivierung oder Repression der Zielgene sorgt [34]. In *Drosophila* ist Hh an der Kopf-, Gliedmassen- und Flügeldifferenzierung beteiligt [35] und ist unerlässlich für die Entwicklung des ZNS, der embryonalen Epidermis, der Augen-Imaginalscheibe, des viszeralen Mesoderms, der Genital-Imaginalscheibe, des adulten Kopfes, des adulten Abdomens, des Bolwig-Organs, des Herzens, des Trachealsystems und des Fettkörpers [36, 37]. Im Gegensatz zu *Drosophila* und anderen wirbellosen Tieren gibt es in Vertebraten drei Orthologe für Hh: Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) und Desert Hedgehog (DHH). Bei diesen sogenannten Morphogenen [38] der *HH*-Gen-Familie ist sicherlich SHH das bedeutendste Ortholog in Vertebraten.

IHH wird während der Embryonalentwicklung im extraembryonalen Entoderm [39], in Lunge, Darm, Milchdrüsenanlagen [40] und Knochenanlagen [41] exprimiert. IHH-defiziente Mäuse sterben entweder intrauterin oder kurz nach der Geburt an respiratorischem Versagen, sie zeigen schwere Skelettfehlbildungen [42].

DHH wird in peripheren Nerven, im Darm und geschlechtsspezifisch in den Sertoli-Zellen der sich entwickelnden Hoden gebildet [35, 43]. DHH-defiziente männliche Mäuse sind infertil, weibliche Mäuse zeigen keinerlei Auffälligkeiten [44].

SHH wird bereits kurz nach der Gastrulation gebildet und initiiert unter anderem die Rechts-Links-Asymmetrie in den frühesten Stadien der Embryogenese. In den folgenden Stadien ist SHH beteiligt an der Entwicklung: des Notochords, der Flurplatte, des *ventrolateralen* Mittelhirns, des *ventralen* Prosenzephalons, des Darm-Entoderms, der Branchialbögen, des *posterior-distalen* Extremitäten-Mesenchyms und des Epithels von Lunge, Darm, Harnblase, Harnröhre, Vasa deferentia und von Haarwurzeln [35, 45]. SHH-defiziente Mäuse sind nicht lebensfähig, sind zyklisch, haben ausgeprägte Defekte des Neuralrohres, bilden keine Wirbelsäule und haben Fehlbildungen der distalen Extremitäten [46].

Untersuchungen bei Zebrafischen, Hühnern und Nagetieren haben gezeigt, dass SHH eine wichtige Rolle für das Wachstum, das Verteilungsmuster und die Morphogenese verschiedener Gewebe hat. SHH reguliert die Proliferation, das Überleben und die

Spezifizierung in vielen verschiedenen Zelltypen. SHH ist auch bei den frühen Schritten der Hypophysen-Ontogenese wichtig. SHH ist ein Morphogen, welches im ventralen Dienzephalon und im oralen Ektoderm (außer im Primordium der Rathke'schen Tasche) gebildet wird. Ein Mangel der SHH-Expression oder -Aktivität führt unter anderem zu einer Hypoplasie oder Fehlfunktion der Hypophyse [47, 48]. Sowohl der SHH-Rezeptor Patched (PTCH1) als auch die SHH-Effektor-Transkriptionsfaktoren GLI1, GLI2 und GLI3 werden in der Rathke-Tasche exprimiert. Dies spricht für die Kompetenz der sich entwickelnden Hypophyse SHH-Signale zu empfangen und auf diese zu reagieren [7].

3.5.1 SHH-Prozessierung und Freisetzung

Die Signalaktivität ist abhängig von einer Reihe posttranslationaler Modifikationen, diese wurden vor allem in Mausmodellen für das Hh-Ortholog SHH untersucht. Man geht davon aus, dass diese Vorgänge stellvertretend für alle Mitglieder der Hedgehog-Familie sind. Im Folgenden soll daher auf die SHH-Prozessierung eingegangen werden. SHH wird in Vertebraten im gesamten sich entwickelnden Nervensystem und in vielen epithelialen Geweben exprimiert [37]. Nach der Translation wird das SHH-Vorläuferpeptid (ca. 45 kDa) in das endoplasmatische Retikulum transloziert, hier erfolgt eine cholesterolabhängige autokatalytische Spaltung in ein 19 kDa cholesterolmodifiziertes N-terminales Peptidfragment (SHH-N) und ein 25 kDa C-terminales Fragment (SHH-C). Nur dieser C-terminale Anteil des Vorläuferpeptides besitzt die autoproteolytische Aktivität, obgleich die C-terminale Domäne deutlich geringer konserviert ist als die N-terminale [49]. SHH-C wird nach der Spaltung des Vorläuferpeptides an Ubiquitin gebunden und über das Proteasom abgebaut [50], bislang ist keine weitere biologische Bedeutung bekannt [51]. Die eigentliche Signaltransduktion erfolgt über das N-terminale Peptidfragment (SHH-N), nach einer Reihe von chemischen Modifikationen. Nach der kovalenten Bindung eines Cholesterin-Restes an das C-terminale Ende wird an das N-terminale Ende ein Palmitatrest gebunden, zudem wird das SHH-N-Molekül glykosyliert [52] und somit in seine biologisch aktive Form überführt (fortan nur SHH genannt). Diese Lipid-Modifikationen sind mitverantwortlich für die Bindung an die *lipid rafts* [53], für die Multimerisierung der SHH-Proteine [53], für die Entstehung des morphogenetischen Gradienten [54, 55] und für die Wirksamkeit an den Zielzellen [52]. Nach diesen Modifikationen wird SHH über das trans-Golgi-Netzwerk zur Zellmembran transportiert und sezerniert. SHH kann sowohl die Zellen in unmittelbarer Nähe zur sezernierenden Zelle (*short range* Wirkung) als auch Zellen die mehrere Zelldurchmesser -bis zu 300 µm

in den Anlagen der Vertebraten-Extremitäten- beeinflussen (*long range*-Wirkung). Für die Freisetzung, aber auch für die *long range* Wirkung von SHH wird die Aktivität des 12-Transmembrandomänen-Proteins *Dispatched* (DISP) benötigt [56, 57]. So haben Studien in DISP-defizienten Mäusen und Fliegen gezeigt, dass SHH zwar korrekt produziert wird, aber zu einem großen Teil in der Zelle akkumuliert. Lediglich benachbarte Zellen werden durch SHH aktiviert, aber eine *long range* Wirkung ist nicht möglich [58, 59].

3.5.2 SHH-Rezeptorbindung

Die Wirkung von SHH an der Zielzelle wird durch den Hh-Rezeptor Patched (PTCH) vermittelt, dieser ist ein 12-Transmembrandomänen-Rezeptor und kommt bei Säugetieren in zwei homologen Formen, PTCH1 und PTCH2, vor [35], welche zu 73% identisch sind. Hauptunterschiede liegen in den Transmembran-Domänen 6 und 7. Fast die gesamte Signalwirkung von SHH wird über PTCH1 durch eine Enthemmung des 7-Transmembrandomänen-Proteins Smoother (SMO) übertragen. Wichtige Co-Faktoren für die Rezeption des SHH-Signals sind in Vertebraten: *CAM-related 1 downregulated by oncogenes* (CDO), *Brother of Cdo* (BOC) und *Growth arrest-specific 1* (GAS1) [60]. Bei Vertebraten gibt es noch ein zusätzliches SHH-Bindungs-Protein: *Hedgehog-interacting protein* (HIP), dies hat keine *downstream* Signalfunktion und agiert vermutlich als Decoy-Rezeptor, indem es mit PTCH um die SHH-Bindung kompetitiv konkurriert [61]. PTCH1 hat eine doppelte Bedeutung, es agiert sowohl als Hauptrezeptor für SHH, als auch als potenter Repressor des SHH-Signalweges [62].

3.5.3 SHH-Signaltransduktion

Alle Schlüssel-moleküle der SHH-Signaltransduktion zeigen eine Anreicherung in den Zilien während der SHH-Signalaktivierung. Zilien sind schlank-röhrenförmige Fortsätze der Zellmembran, die fast jede eukaryote Zelle besitzt. Sie sind wichtig für die Wahrnehmung chemischer und mechanischer Signale, agieren als Kommunikations-Schnittstelle und sind notwendig für die Kontrolle der Zelldifferenzierung und -polarität [63]. In Abwesenheit von SHH ist das membrangebundene PTCH1 an der Basis des primären Ziliums in der Nähe des Basalkörperchens lokalisiert und hemmt die Aktivierung und den Transport von SMO in die Zilie [64, 65]. Der genaue Mechanismus der Hemmung von PTCH auf SMO ist noch nicht ausreichend aufgeklärt [62]. Wenn SHH an PTCH bindet, dann transloziert PTCH aus dem primären Zilium und wird von den Lysosomen abgebaut, wodurch die inhibitorische Wirkung auf SMO entfällt. SMO kann nun den zytosolischen Multiprotein-Komplex (u.a. aus GLI, SUFU und KIF7) nach dessen

Akkumulation im primären Ziliurn aktivieren. Nach der Freisetzung der GLI-Proteine aus diesem Komplex translozieren diese in den Nukleus und agieren als Transkriptionsfaktoren der SHH-Zielgene [66, 67].

3.6 GLI-Proteine

Die *Glioma-associated oncogene homologue* (GLI)-Proteine sind zinkfingerhaltige Transkriptionsfaktoren und die Effektoren für die SHH-abhängige Aktivierung von bestimmten Genen in den Zielzellen. In *Drosophila* gibt es nur ein Mitglied der GLI-Familie: *Cubitus interruptus* (Ci) [68], wohingegen in Vertebraten drei Orthologe nachgewiesen wurden: GLI1, GLI2 und GLI3 [69]. GLI2 und GLI3 zeigen strukturell große Ähnlichkeit mit Ci auf, sie besitzen eine Aktivator- und eine Repressor-Domäne, welche die DNA-Bindungsdomäne flankieren. Ohne eine SHH-Signalwirkung wird GLI3 (genauso wie Ci in *Drosophila*) proteolytisch im Zytoplasma gespalten, dieses beschnittene Protein (GLI3R) dient als Repressor der Transkription der SHH-Zielgene [70]. GLI2 kann ebenso wie GLI3 in Abwesenheit einer SHH-Signalwirkung in eine Repressorform (GLI2R) gespalten werden, allerdings wird der Großteil der GLI2 Proteine in Abwesenheit von einer SHH-Signalwirkung komplett gespalten [71]. In Anwesenheit einer SHH-Signalwirkung wird die Degradation der GLI2 und -3 Proteine verhindert und es kommt zur Translokation in den Nukleus und zur Bildung der aktiven Formen (GLIA). Die SHH-abhängige Transkriptionsaktivität von GLI2 ist deutlich höher als die von GLI3. Vermutlich dient GLI3R, in Abwesenheit von SHH, als Hauptrepressor der SHH-Signalkaskade, wohingegen GLI2A als prädominanter Transkriptionsaktivator, in Anwesenheit von SHH, fungiert [62, 72]. GLI1 ist im Gegensatz zu GLI2 und GLI3 nur ein Aktivator in der SHH-Signaltransduktion, da es keine Repressor-Domäne besitzt [73]. Bei Zebrafischen erfolgt die Aktivierung der SHH-abhängigen Gene vorwiegend durch GLI1, im Gegensatz dazu wird diese Funktion in Mäusen von anderen GLI-Familienmitgliedern übernommen. Während der Entwicklung in Vertebraten werden GLI2 und GLI3 in mehr lateralen Regionen exprimiert, während GLI1 fast ausschließlich entlang der Mittellinie exprimiert wird [74]. Mutationsanalysen bei Mäusen haben gezeigt, dass GLI2 und GLI3 als die primären Mediatoren des SHH-Signalweges agieren und somit essentiell für die Embryogenese sind. Im Gegensatz dazu ist GLI1 für die Embryogenese entbehrlich und scheint als Teil eines positiven Verstärkermechanismus im SHH-Signalweg zu funktionieren [72]. GLI1 und GLI2 agieren primär als Transkriptionsaktivatoren, die Aktivität beider ist abhängig von der Signalaktivität von SHH. Bei GLI2 kann, im Gegensatz zu GLI1, diese Abhängigkeit von SHH durch eine

Abspaltung der N-terminalen Protein-Region durchbrochen werden (GLI2 Δ N genannt). Denn diese Abspaltung führt dazu, dass GLI2 Δ N als starker konstitutiver Aktivator dient. Somit kann GLI2 Δ N SHH-abhängige Signalwege sogar in Abwesenheit einer SHH-Signalaktivität induzieren [75].

3.6.1 GLI2

GLI2 ist, mit seiner aktivierenden Wirkung im SHH-Signalweg ein wichtiger Transkriptionsfaktor. Das *GLI2*-Gen ist beim Menschen auf Chromosom 2 lokalisiert (2q14), es besteht aus 13 Exonen (ENSEMBL acc. ENSG00000074047; GenBank acc. NM_005270.4) und kodiert ein Protein aus der Klasse der C2H2-Zinkfinger-Proteine aus der Subklasse der GLI-Familie. Das GLI2-Protein besteht aus 1586 Aminosäuren (UniProtKB acc. P10070). Die funktionellen Domänen des humanen GLI2 sind noch nicht vollkommen verstanden. Bei Mäusen besteht das GLI2 Ortholog aus einer zentralen DNA-Bindungsdomäne aus 5 Zinkfingern und wird flankiert von einer N-terminalen Repressordomäne und einer C-terminalen Transaktivierungs-Domäne mit fünf Bindungsstellen für die Phosphatkinase A (PKA) [76]. *In vitro* Analysen einer humanen GLI2-Variante, welche keine N-terminale-Repressor-Domäne besitzt, zeigten eine 30-fach höhere Transkriptionsaktivität im Vergleich zum unbeschnittenen Protein [75].

GLI2 ist während der Embryogenese unter anderem an der Entwicklung der Lunge, Trachea und des Ösophagus beteiligt [77]. Des Weiteren wird durch die Expression von GLI2 im Mesoderm entscheidend die *ventro-posteriore* Entwicklung beeinflusst [78]. Auch für das sich entwickelnde ZNS ist GLI2 von hoher Bedeutsamkeit. GLI2 wird unter anderem im Dienzephalon exprimiert und induziert hier die Expression von BMP4 und FGF8. Durch die GLI2-Expression im oralen Ektoderm ist GLI2 an der Proliferationssteuerung von Hypophysenvorläuferzellen beteiligt [79].

Untersuchungen an GLI2 *knock out* Mäusen ergaben einen gehäuft letalen Phänotyp der Embryonen, besonders durch Störungen der frühen Gehirn- und Rückenmarksentwicklung. Mutationen im *GLI2*-Gen führten bei Mäusen dazu, dass keine Grundplatte gebildet wurde, allerdings entwickelten sich Motoneurone, welche die ventrale Mittellinie des Neuralrohrs einnahmen [80]. Die Embryonen mit GLI2-Mutationen zeigten kraniofaziale, skelettale (z.B. Polydaktylie), Lungendefekte und auch variable Defekte in der Organogenese der Hypophyse [81]. Weitere Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass die Inaktivierung von GLI2 zu einer Verringerung der Zahl von Hypophysenvorläuferzellen, zu einer Hypoplasie

des HVL und zu einer Verminderung der Expression von BMP4 und FGF8 führt. Die Folge ist das Fehlen des HHL [79].

3.6.2 GLI2-Mutationen bei Menschen

Mutationen im *GLI2*-Gen wurden als mögliche Ursachen für Holoprosenzephalie (HPE), Hypophyseninsuffizienz, Polydaktylie [74], kraniofaziale und Branchialbögen-Anomalien [82], Spalt-Hand/Fuß-Malformationen und Störungen der langen Röhrenknochen [83] beschrieben.

Des Weiteren gibt es eine zunehmende Zahl an Berichten, dass GLI2 auch in die Carcinogenese involviert ist, so zum Beispiel bei der Entstehung von Basalzell-, Magen-, Mamma-, Prostatakarzinomen, Medulloblastomen und Mantelzell-Lymphomen [84-89].

3.7 Rationale für die Promotionsarbeit

Die ersten Untersuchungen über eine entscheidende Rolle von GLI2 bei der Entstehung von Erkrankungen des Menschen wurden 2003 von Roessler et al. veröffentlicht. Sie konnten zeigen, dass Mutationen im *GLI2*-Gen, welche einen kompletten Funktionsverlust des Proteins verursachen zu Holoprosenzephalie führen können. Die Autoren berichteten auch, dass Hypophyseninsuffizienz gehäuft in den Familien von Patienten mit GLI2-Mutationen vorkommt, also eine mögliche Verbindung zwischen heterozygoten GLI2-Mutationen und dem Vorkommen von Hypophyseninsuffizienz besteht [74]. In anderen Untersuchungen über GLI2 *missense* Mutationen bei Patienten mit kranialen und fazialen Mittelliniendefekten konnten keine hypophysäre Anomalien festgestellt werden [82, 90].

Es wurden bereits Mutationen in verschiedenen Transkriptionsfaktoren bei Mäusen und auch bei Menschen mit IGHD und MPHD nachgewiesen. Dabei zeigen Mutationen in Transkriptionsfaktoren, welche nur in der Rathke-Tasche exprimiert werden, meist Auffälligkeiten des HVL, aber keine Veränderungen des HHL, hierzu zählen Mutationen im *PROPI* und *POU1F1*-Gen [8, 91]. Im Gegensatz dazu zeigen die meisten Patienten mit Mutationen in Transkriptionsfaktoren, welche in die frühe hypophysäre Entwicklung involviert sind, auch einen ektopen oder nicht deszendierten HHL. Als Beispiele für solche mutierten Transkriptionsfaktoren seien HESX1, LHX4 und OTX2 genannt [92-94]. Mutationen in diesen früh-agierenden Transkriptionsfaktoren führen häufig, neben den hypophysären Auffälligkeiten, zu Anomalien in den Strukturen, die den gleichen embryonalen Ursprung haben wie die Hypophyse (z.B. Vorderhirn und Augen) [7]. Die bisherige Mutationsanalysen in den Transkriptionsfaktoren der Hypophysenentwicklung konnten die Ätiologie von MPHD und IGHD nur bei einem kleinen Teil der Patienten

aufklären [7, 8]. Aus diesem Grund wurden Mutationen von *GLI2* als mögliches Kandidaten-Gen für das Auftreten von MPHD in der vorliegenden Arbeit untersucht.

4. Publikation

4.1. Druckversion

Functional Characterization of a Heterozygous GLI2 Missense Mutation in Patients With Multiple Pituitary Hormone Deficiency.

Gunter M.C. Flemming, Dr. Jürgen Klammt, Dr. Geoff Ambler, Dr. Yong Bao, Prof. Dr. Werner F. Blum, Chris Cowell, Dr. Kim Donaghue, Nevil Howard, Dr. Anil R. Kumar, Dr. Janine Sanchez, Heike Stobbe und Prof. Dr. Roland W. Pfäffle

Erschienen in: *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98(3), Seite E567-E575, März 2013

Functional Characterization of a Heterozygous GLI2 Missense Mutation in Patients With Multiple Pituitary Hormone Deficiency

G. M. C. Flemming, J. Klammt, G. Ambler, Y. Bao, W. F. Blum, C. Cowell, K. Donaghue, N. Howard, A. Kumar, J. Sanchez, H. Stobbe, and R. W. Pfäffle

Hospital for Children and Adolescents (G.M.C.F., J.K., W.F.B., H.S., R.W.P.), University of Leipzig, D-04103 Leipzig, Germany; The Children's Hospital at Westmead and University of Sydney (G.A., C.C., K.D., N.H.), Westmead, New South Wales 2145, Australia; Leonard Miller School of Medicine (Y.B., J.S.), University of Miami, Mailman Center for Child Development, Miami, Florida 33136; Lilly Research Laboratories (W.F.B.), Eli Lilly and Company, D-61352 Bad Homburg, Germany; and Virginia Commonwealth University Health System (A.K.), Richmond, Virginia 23298

Context: The GLI2 transcription factor is a major effector protein of the sonic hedgehog pathway and suggested to play a key role in pituitary development. Genomic GLI2 aberrations that mainly result in truncated proteins have been reported to cause holoprosencephaly or holoprosencephaly-like features, sometimes associated with hypopituitarism.

Objective: Our objective was to determine the frequency of GLI2 mutations in patients with multiple pituitary hormone deficiency (MPHD).

Design: Patients were selected from participants in the Genetics and Neuroendocrinology of Short Stature International Study (GeNeSIS) program. Patients with mutations within established candidate genes were excluded.

Patients: A total of 165 patients with MPHD defined as GH deficiency and at least 1 additional pituitary hormone deficiency were studied regardless of the presence of extrapituitary clinical manifestations.

Main Outcome Measures: Prevalence of GLI2 variations in MPHD patients was assessed and detailed phenotypic characterization is given. Transcriptional activity of identified GLI2 variants was evaluated by functional reporter assays.

Results: In 5 subjects, 4 heterozygous missense variants were identified, of which 2 are unpublished so far. One variant, p.R516P, results in vitro in a complete loss of protein function. In addition to GH deficiency, the carrier of the mutation demonstrates deficiency of thyrotrope and gonadotrope function, a maldescended posterior pituitary lobe, and polydactyly, but no midline defects.

Conclusions: For the first time, we show that heterozygous amino acid substitutions within GLI2 may lead to MPHD with mild extrapituitary findings. The phenotype of GLI2 mutations is variable, and penetrance is incomplete. GLI2 mutations are associated with anterior pituitary hypoplasia, and frequently, ectopy of the posterior lobe occurs. (*J Clin Endocrinol Metab* 98: E567–E575, 2013)

Studies in zebrafish, chicken, and rodents suggest that sonic hedgehog (Shh), a morphogen that is expressed in the ventral diencephalon and the oral ectoderm except the Rathke's pouch primordium, has a role in early steps

of pituitary ontogenesis. Deprivation of Shh expression or action results in pituitary hypoplasia and malfunction (1, 2). The Shh receptor patched (*Ptch1*) as well as the Shh effector transcription factors Gli1, Gli2, and Gli3 are ex-

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197
Printed in U.S.A.

Copyright © 2013 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2012-3224 Received August 30, 2012. Accepted December 26, 2012.

First Published Online February 13, 2013

Abbreviations: HPE, holoprosencephaly; MPHD, multiple pituitary hormone deficiency; MRI, magnetic resonance imaging; SDS, SD score; Shh, sonic hedgehog.

pressed in Rathke's pouch, indicating competence of the developing gland to receive and respond to Shh signals (3). *Gli2* knockout in mice results in severe skeletal abnormalities including absence of vertebral body and intervertebral discs, shortened limbs and sternum, cleft palate, and tooth defects (4). Pituitaries of *Gli2* knockout mice are absent in some but not all offspring (5). Moreover, *Gli2*-mediated Shh signals have been shown to be involved in dorsoventral and anteroposterior patterning and brain development (6–8).

Human *GLI2* (MIM 165230) is a 1586-amino acid protein (UniProtKB accession number P10070), which is encoded by 13 exons (ENSEMBL accession number ENSG00000074047; GenBank accession number NM_005270.4) on chromosome 2q14. The functional domains of the human *GLI2* protein are not yet well understood. In the murine *Gli2* ortholog, a central DNA-binding domain consisting of 5 zinc fingers is flanked N-terminally by a repressor domain and C-terminally by a transactivation domain (9). Accordingly, a human variant lacking the N-terminal repressor domain (ΔN) in vitro shows a 30-fold higher transcriptional activity compared with the full-length protein (10).

In humans, defects of SHH secretion and signaling during early stages of development are considered to be one of the main causes of holoprosencephaly (HPE) (11, 12). The clinical phenotype is characterized by a remarkable variability even among patients with identical mutations (11, 13) and may or may not comprise pituitary defects (14, 15). Similarly, several genomic *GLI2* aberrations have been reported that are phenotypically characterized by a variable degree of pituitary and extrapituitary malformations. In addition to its involvement in carcinogenesis (16), mutations within the *GLI2* gene have been initially reported to cause HPE or HPE-like features and polydactyly (17). Since then, *GLI2* sequence variants have been identified in patients with craniofacial anomalies ranging from severe midline defects to absence of clinical findings in mutational carriers (18–20). In some patients, these findings have been reported to occur associated with hypopituitarism. Multiple pituitary hormone deficiency (MPPHD) may also represent the sole clinical manifestation, although polydactyly is a frequently observed concomitant abnormality. However, the dominant inheritance pattern is characterized by incomplete penetrance and highly variable expressivity. The lack of classical Mendelian inheritance may be in part attributable to co-occurring mutations in interacting genes, although final evidence is lacking (21). Interestingly, all patients with *GLI2* mutations reported so far that have pituitary perturbations carry mutations that cause introduction of a premature termination codon and thereby have a truncated *GLI2*

protein (10, 17, 19, 22). Recently, *GLI2* missense mutations have been reported for patients with HPE and HPE-like features as well as isolated cleft lip and palate with polydactyly and branchial arch anomalies but without involvement of the pituitary gland (18, 21). The pathogenic impact of these missense variants awaits in vitro analyses. So far, molecular characterization of *GLI2* missense and loss-of-function mutations by Roessler et al (10, 17) revealed lack of *GLI2* activity for those mutations resulting in truncated *GLI2* proteins but wild-type activity for the missense mutations.

Here we describe a patient with MPPHD and polydactyly, who carries a heterozygous missense mutation within the *GLI2* gene. In vitro analysis supports our assumption of a causative relationship of the mutation with the patient's phenotype.

Subjects and Methods

Subjects

We studied 168 patients with MPPHD (165 pedigrees; mean age 9.13 years at the time of study entry [range 0.11–28.39 years]) from 15 countries selected from the Genetics and Neuroendocrinology of Short Stature International Study (GeNeSIS) program sponsored by Eli Lilly and Company (Indianapolis, Indiana). All patients had GH and TSH deficiency. ACTH and/or cortisol deficiency was reported in 62 and gonadotropin deficiency in 38 patients; however, because 87 children (63%) were prepubertal at evaluation (≤ 10 years), FSH/LH deficiency might evolve later on during development. Abnormal magnetic resonance imaging (MRI) was documented for 96 cases (anterior pituitary hypoplasia, 65 cases; ectopic or absent posterior pituitary, 52 cases; other anomalies affecting pituitary stalk, infundibulum, and sella turcica, 15 cases). In addition, DNA of 50 healthy subjects of normal height was investigated as a control. Written informed consent was obtained from all subjects and/or their legal guardians. The study was approved by the local institutions' ethics review boards according to the Declaration of Helsinki as required.

Screening for *GLI2* mutations

Fragments of the *GLI2* gene were PCR amplified from peripheral blood genomic DNA, prescreened by denaturing HPLC (WAVE System; Transgenomic, Glasgow, United Kingdom), and samples that showed an abnormal elution pattern were further analyzed by direct sequencing (ABI PRISM 310 DNA analyzer; Applied Biosystems, Foster City, California).

Database mining

The frequency of identified variants in publicly accessible variant databases was ascertained by performing gene- or sequence-centered queries at NCBI's dbSNP, the National Heart, Lung, and Blood Institute Exome Sequencing Project, and the 1000 Genomes Project (23). Allele frequency data of the study cohort presented herein were compared with the corresponding allele frequencies as stated for the published control populations by two-sided Fisher's exact test. Evaluation to predict the pos-

sible impact of the amino acid substitutions was obtained using the Polymorphism Phenotyping (PolyPhen-2) tool. URLs and accession dates are given in the Supplemental Material (published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>).

Functional analyses

Mouse embryonic fibroblast (NIH-3T3) or murine corticotrophinoma (AtT-20) cells, in which the Shh pathway is active (24, 25), as well as COS7 cells were transfected with pCS2 expression vectors containing either wild-type or mutant *GLI2* cDNA to provide expression of *GLI2* proteins for luciferase reporter and EMSAs, respectively. Plasmids containing full-length *GLI2* (pCS2-*GLI2*fl) and *GLI2* missing the N-terminal repressor domain (pCS2-*GLI2*ΔN) were kindly provided by Dr E. Roessler (National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland). Variants were introduced into wild-type cDNA by site-directed mutagenesis alone or in combination according to their native occurrence.

As reporter plasmid in cotransfection luciferase assays we used a pGL4.10 vector containing an 8-fold repeat of the 3'-Gli-binding site from Hnf3β floor plate enhancer in front of the chicken δ-crystallin minimal promoter that drives expression of the firefly luciferase (pGL4.10-8 × 3'-Gli-BS). The construct was generated from the original 8 × 3'-Gli BS-LucII plasmid kindly provided by Dr H. Sasaki, Osaka University, Osaka, Japan (26, 27). Reporter assays were performed using the dual-luciferase reporter assay system according to the recommendations of the manufacturer (Promega, Madison, Wisconsin).

Nonradioactive EMSAs were basically performed according to the LightShift chemiluminescent EMSA kit protocol (Thermo Fisher Scientific, Bonn, Germany) with some minor modifications. A 5'-biotin-labeled oligonucleotide comprising the consensus GLI-binding site and the surrounding sequence as present

in the human *PTCH1* promoter (5'-GTTGCCTACCTGGGTG-GTCTCTCTACTTT; consensus GLI-binding site highlighted) was used as probe. An oligonucleotide with the same sequence but without biotin label was used in competition experiments. *GLI2* protein expression was verified by Western blotting.

Detailed protocols are provided in the Supplemental Material.

Results

We identified 5 subjects in 5 families bearing nonsynonymous *GLI2* variations in a cohort of 165 patients with MPHD (3.0%). Before the analysis of the *GLI2* gene, mutations in the *POU1F1*, *PROP1*, *HESX1*, *LHX3*, and *LHX4* genes were excluded in all patients. One patient had a *GLI2* dinucleotide substitution affecting two amino acids (patient C, p.[M1444I; L1445F]); two patients, who were not related to each other, carried an identical combination of 2 missense variations on one allele (patients A and B, p.[M1352V; D1520N]). Two more patients (patient D, p.R516P; patient E, p.R1543H) had single amino acid substitutions. All variations were heterozygous, and none of them was found in 50 German control individuals. However, all but one of the identified variations (p.R516P) have been found in large population exome sequencing projects (Table 1). The p.R1543H variant was identified only in the Exome Sequencing Project (ESP) cohort. Both the dinucleotide substitution and the monoallelic double variation have been reported previously (Table 1). Only variants p.R516P and p.R1543H show a high phy-

Table 1. Summary of *GLI2* Variations Identified in This Study, Allele Frequency Data and Literature Review

Amino Acid Position ^a	Nucleotide Position ^b	PolyPhen	dbSNP ID	Allele Frequencies			Other Studies		
				This Study (Controls)	ESP ^c	1000 Genomes ^c	Allele Frequency (Controls)	Context	Ref.
R516P	1547G>C	Probably damaging		0/100					
<u>M1352V</u>	4054A>G	Benign		0/100	101/6863 <i>P</i> = .335	11/2188 <i>P</i> = .684	0/192 2/162	CFA SHFM	18 ^d 32
<u>D1520N</u>	4558G>A	Probably damaging	rs114814747	0/100	106/6914 <i>P</i> = .242	11/2188 <i>P</i> = .684	0/192 2/162	CFA, left anophthalmia SHFM	18 ^d 32
<u>M1444I</u>	4332G>A	Benign		0/100	9/7011 <i>P</i> = .369	13/2188 <i>P</i> = 1.000	3/110 0/>200	MPHD CFA	19 ^e 20 ^f
<u>L1445F</u>	4333C>T	Probably damaging		0/100	9/7011 <i>P</i> = .369	13/2188 <i>P</i> = 1.000	1/330 2/348 3/110	SHFM SHFM MPHD	32 31 19 ^e
R1543H	4628G>A	Probably damaging		0/100	5/7015 <i>P</i> = .241		1/330 2/348	SHFM SHFM	32 31

Abbreviations: CFA, craniofacial anomalies; SHFM, split hand/split foot malformation.

^a Affected amino acid position (UniProtKB P10070); underlines indicate variants occurring in *cis* on the same allele.

^b Position of the affected nucleotide within the *GLI2* open reading frame (GenBank NM_005270).

^c *P* values (Fisher's exact test) are shown. Statistics as well as restrictions and possible caveats for PolyPhen, ESP, and 1000 Genomes data are described in Subjects and Methods. For ESP, only European-American allele data are shown.

^d Bertolacini et al (18) identified the p.M1352V and p.D1520N variants in distinct patients.

^e Variants p.M1444I and p.L1445F described by Franca et al (19) are co-occurring with the putative pathogenic p.L788fsX794 *GLI2* mutation.

^f Rahimov et al (20) report the p.M1444I variant without the frequently co-occurring p.L1445F variation.

logenic conservation, a fact that is also reflected in the Polyphen prediction as damaging (Table 1 and Supplemental Figure 1).

Patients

Patients presented with MPHD affecting all pituitary hormones with only minor differences. Postnatal growth before GH replacement therapy was retarded (range -3.1 to -4.6 SD score [SDS]). Extrapituitary manifestations were, if occurring at all, generally mild and comprised postaxial polydactyly (patient D), crowding of midfacial features, and an antimongoloid slant in the first years of life as well as severe right-sided visual impairment (patient E). Severely afflicted vision in this patient was due to hypoplasia of the right optic nerve with an absent right-sided chiasm as revealed by MRI. In addition, MRI in all patients disclosed a hypoplastic anterior lobe of the pituitary, and most cases showed abnormally developed or located neurohypophysis and pituitary stalk to a variable extent. Because patient D is carrier of the causative pathogenic p.R516P GLI2 mutation, a detailed clinical description is given below; case reports of all other patients bearing GLI2 variants are provided in the Supplemental Material.

Patient D

Patient D carries a single point mutation (c.1547G>C) in exon 10 that changes arginine at position 516 to proline (p.R516P). The patient, a girl from Australia and second of three children of a Caucasian marriage, was presented because of short stature at the age of 5.6 years with a height of 97.2 cm (-3.13 SDS) and a weight of 13.4 kg (-3.16 SDS) (Figure 1). Bone age assessed at various occasions was retarded by approximately 1.5 years. Pituitary testing revealed a peak GH of 0.5 ng/ml in glucagon testing. Accordingly, IGF-I was decreased to 11.5 (normal 53–160) ng/ml. Central hypothyroidism became evident at age 10.9 years with TSH of 0.98 (normal 0.64–4.67) mIU/L and free T₄ of 6.9 (normal 10–23) pmol/L. T₄ replacement was commenced. By age 13 years, she had no breast development with prepubertal estradiol and gonadotropin measurements (LH <1 U/L; FSH 4.1 U/L; estradiol 64 pmol/L). Puberty was induced with increasing estrogen supplements from age 14 years with cyclical hormones introduced at age 17 years, which induced menarche and continue to be administered. Adrenal axis function appeared to be normal at several stimulation tests performed between 7 and 18 years. Prolactin levels measured at 2

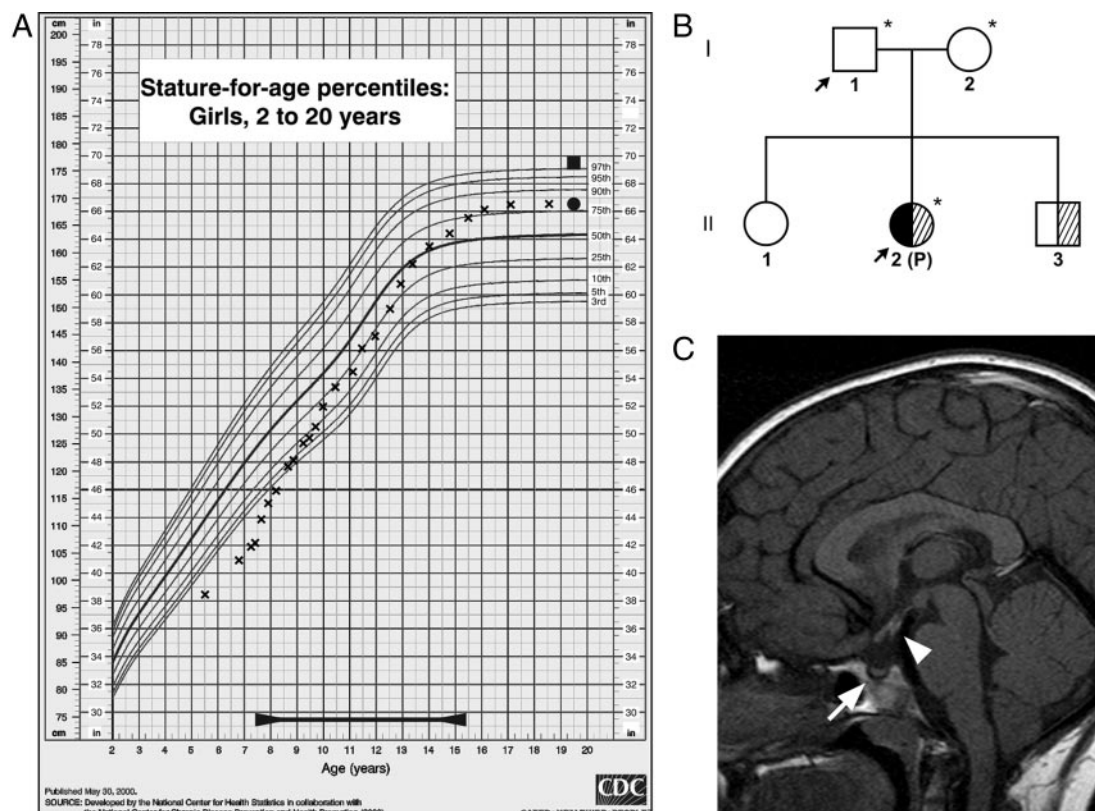


Figure 1. Patient D. A, Growth chart of the patient, showing the final height of father (filled square) and mother (filled circle). The period of GH replacement therapy is marked at the bottom of the chart. Percentiles are shown as indicated. B, Family tree of patient D. The proband (P) is the second of 3 children of a nonconsanguineous Caucasian marriage and as his father carrier of the p.R516P mutation (arrows). Asterisks indicate individuals for whom molecular genetic analysis has been performed. Filled symbol, pan-hypopituitarism; hatched symbols, polydactyly. C, MRI performed at 7 years. Sagittal scans show mild anterior pituitary hypoplasia (arrow) and a maldescended posterior lobe (arrowhead).

occasions were in the low-normal range (95 and 120 mU/L at 10.5 and 13.0 years, respectively).

Recombinant human GH replacement therapy was initiated at the age of 7 years (0.175 mg/kg/wk). During the first year of GH treatment, height velocity increased 2-fold from 5.1 to 10.4 cm/y (Δ height [SDS] 1.1). Continuation of GH replacement over nearly 9 years resulted in a normal height of 168.8 cm (0.89 SDS) at the patient's age of 17.6 years (Figure 1). At that time, she weighed 69.9 kg (1.15 SDS; body mass index of 24.5 [0.86 SDS]). After cessation of GH therapy stimulated GH, IGF-I and IGF-binding protein-3 serum concentrations returned to subnormal values, thus confirming the GH-deficient status.

No midline defects were reported. However, the patient had unilateral polydactyly (a small extra digit on 1 hand), which was corrected by simple ligation in the first week of life. MRI performed at 7 years showed mild anterior pituitary hypoplasia and a maldescended posterior lobe (Figure 1). Formal IQ testing (Wechsler Intelligence Scale for Children [WISC-R], WISC-IV) performed at the age of 10.5 years demonstrated a full-scale IQ of 84.

Genetic evaluation of the *GLI2* gene in the parents revealed inheritance of the c.1547G>C mutation from the father (Figure 1). Both parents are of normal height (mother, 169.0 cm; father, 176.5 cm) with no endocrine, dysmorphic, or neural abnormalities. Also, the patient's older sister presented without any obvious findings, whereas her younger brother had postaxial polydactyly with 1 extra digit on each hand. However, he grew normally, suggesting an unaffected pituitary gland. Unfortunately, both siblings were not available for genetic analysis.

Functional analysis

To evaluate whether the identified variations interfere with the basic transactivation and DNA-binding properties of the GLI2 transcription factor, we performed luciferase reporter assays. Transference of the promoter construct from the original backbone of the p δ 51 LucII plasmid into the optimized pGL4.10 reporter plasmid (see Subjects and Methods) led to an approximately 10-fold increase of reporter activity induced by GLI2 Δ N compared with wild-type GLI2 in NIH-3T3 cells (Supplemental Figure 2). Disruption of the GLI-binding sites completely abolished transactivation by both full-length and suppression-domain–devoid GLI2 wild-type effector constructs (data not shown).

Introduction of the p.[M1352V; D1520N] (patients A and B) or p.[M1444I; L1445F] (patient C) double variants into GLI2 Δ N reduced transcriptional activity to 75.2% or 59.5%, respectively, which was significantly different from wild-type activity (Figure 2A). The same variations within full-length GLI2 resulted in a decrease of luciferase activity to 64.7% (p.[M1352V; D1520N]) and 74.8% (p.[M1444I; L1445F]). In contrast, the p.R516P mutation completely abolished the transcriptional activity of both full-length and the repressor-domain–deficient GLI2 protein isoforms. Surprisingly, the p.R1543H identified in the most severely affected patient (patient E) did not compromise transcriptional activity under the conditions tested within this study.

Similar results were obtained when cotransfection experiments using the same constructs were performed in the murine corticotrophinoma cell line AtT-20 (data not shown).

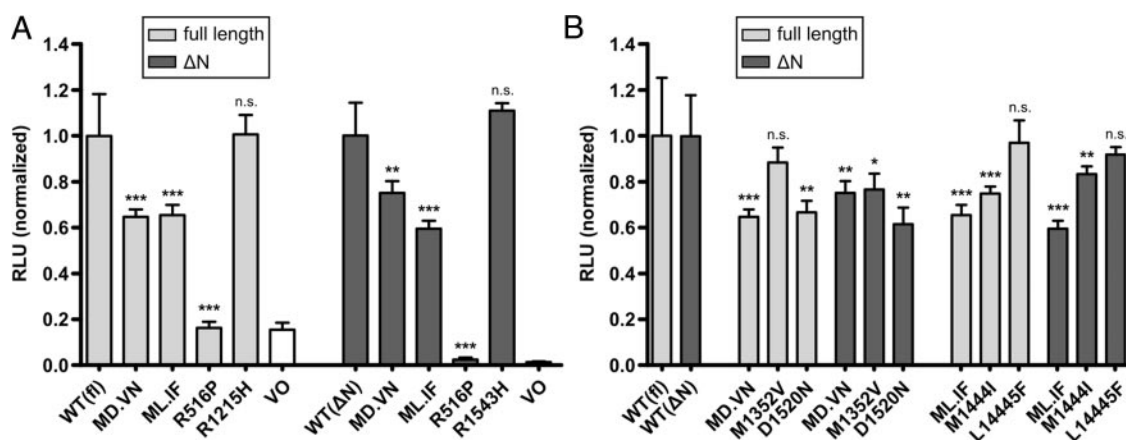


Figure 2. Proteins encoded by mutated *GLI2* genes display distinct degrees of their transactivation properties. Expression vectors for mutant GLI2 and wild-type (WT) proteins (full-length [fl] and N-terminally truncated [Δ N]) were transiently cotransfected into NIH-3T3 cells with a luciferase reporter gene under the control of an 8-fold repeat of the Hnf3 β Gli-binding site. Promoter activity was assayed by measuring luciferase activity 24 hours after transfection. Negative controls (vector only [VO]) received equivalent amounts of empty expression vector plasmid. Activities measured as relative light units (RLUs) are the mean of at least triplicate assays \pm SEM. RLUs were normalized and compared (where not otherwise indicated) with the activity of the corresponding WT construct. Significance levels are indicated as follows: *, $P \leq .05$; **, $P \leq .01$; ***, $P \leq .001$; n.s., not significant. MD.VN refers to p.[M1352V; D1520N]; ML.IF to p.[M1444I; L1445F]. A, Activity of the double and single variants as found in our patients. B, For the double mutants, each variant was cloned and tested separately and compared with the corresponding double and WT construct.

Because 3 of 5 patients in our study carried (known) monoallelic double variants, we sought to elucidate the impact of each individual variation. The rationale behind this approach was to clarify whether the synergistic effect of two variant amino acid residues might have a more damaging consequence for the affected protein than a single substitution alone or, alternatively, if either amino acid alteration might relieve a more detrimental effect of the other one. Luciferase reporter assays of p.M1352V and p.D1520N as well as p.M1444I and the p.L1445F single variants compared with the corresponding double variation in NIH-3T3 cells did not provide strong evidence for either of the suggested mechanisms (Figure 2B).

Specific *GLI2* mutations have been previously shown to exhibit dominant properties toward the wild-type protein. Cotransfection of p.R516P along with wild-type *GLI2* did not result in a dominant inhibition of wild-type *GLI2* transcriptional activity (Figure 3A). Because dominant-negative effects have been shown to require an intact DNA-binding ability of *GLI2*, we tested the DNA-protein interaction using EMSAs. As expected, wild-type *GLI2* strongly associated with the *PTCH1* promoter-derived probe, and competition with the corresponding unlabeled oligonucleotide abrogated the signal of the slowly migrating complex (Figure 3B). In contrast, p.R516P *GLI2*-expressing lysates did not demonstrate an electrophoretic shift of the DNA probe signal above background, suggesting loss of the DNA-binding capacity of the mutant protein.

Discussion

GLI transcription factors are the major effector proteins of the SHH pathway. Human SHH mutations have been shown to cause HPE, sometimes affecting the pituitary in a dominant manner but with incomplete penetrance. Accordingly, several variations of the human *GLI2* gene, which is regarded as the major *GLI* family effector in humans, have been identified in the past. Carriers of these *GLI2* variations present with clinical manifestations characterized by some phenotypic overlap with SHH mutational carriers. In the present investigation, we screened patients with MPHD for *GLI2* variants regardless of the presence of extrapituitary clinical manifestations.

In 5 subjects, 4 heterozygous variant alleles were identified, of which 2 represent novel, so far unpublished, missense variations (Table 1). The 4 variant carriers that were available for further clinical examinations showed panhypopituitarism and a hypoplastic anterior pituitary. Two of the 4 patients had an ectopic neurohypophysis, and 1 patient had no identifiable posterior pituitary tissue. Abnormal location of the neurohypophysis is not a common feature of MPHD but appears to be a frequent finding in *GLI2* mutational carriers. An ectopic or undescended posterior pituitary lobe in the context of hypopituitarism has otherwise been reported only for carriers of *HESX1*, *SOX3*, *OTX2*, and *LHX4* mutations. The first *GLI2* mutations were identified in patients presenting with hypopituitarism and variable manifestations within the HPE spectrum, but detailed description of pituitary imaging,

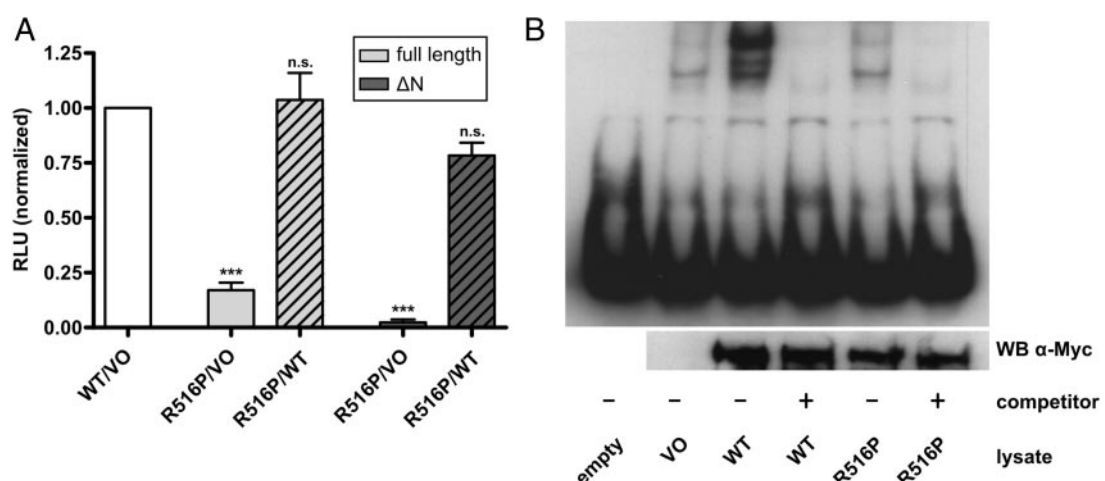


Figure 3. p.R516P does not show dominant-negative properties toward *GLI2* wild-type protein and fails to interact with the cognate *GLI2* DNA-binding site. **A**, Dual-luciferase assays were basically performed as described for Figure 2. NIH-3T3 cells were cotransfected with equal amounts of wild-type and p.R516P expression plasmids, or the same amount of each individual plasmid supplemented by the empty vector (vector only [VO]) to avoid differences in transfection efficiency. Relative light units (RLUs) were normalized and compared with the activity of the corresponding WT construct. Significance levels are indicated: ***, $P \leq .001$; n.s., not significant. **B**, EMSAs using whole-cell lysates of COS7 cells transfected with the indicated *GLI2* cDNA plasmids or a vector control (VO). Probe was a biotin-labeled *PTCH1* promoter-derived *GLI*-binding site oligonucleotide as described in Subjects and Methods. Competition experiments (+) were performed using a 100-fold excess of the unlabeled *PTCH1* oligonucleotide. Expression of wild-type and mutant *GLI2* proteins was confirmed by Western blotting using an anti-Myc-tag antibody (WB α -Myc).

particularly with respect to the posterior lobe, was not available (10, 17). In a well-investigated cohort of patients with isolated GH deficiency or MPPH, Franca and colleagues (19) recently reported on 3 index probands from Brazil without HPE or HPE-like features, who bear *GLI2* loss-of-function mutations (due to early peptide chain termination), and all demonstrated an ectopic or invisible posterior pituitary lobe. Maldevelopment of the posterior pituitary is in congruence with findings in mice, where in all *Gli2* mutants, the posterior lobe was absent (28).

In addition, the 2 carriers of the novel variations p.R516P and p.R1543H presented with extrapituitary findings, ie, polydactyly or craniofacial anomalies, respectively. Polydactyly has been found with high frequency in patients with pituitary anomalies and *GLI2* mutations and appears to be an extrapituitary hallmark of this condition (10, 17, 19). However, the appearance of an extra digit in *GLI2* patients is not necessarily associated with pituitary insufficiency but has also been described in patients with midline defects without reported hypopituitarism (18, 29).

So far, *GLI2* mutations with proven pathogenic impact have been exclusively identified in a heterozygous state and comprised nonsense and frameshift mutations, all leading to truncated proteins lacking a functional C-terminal transactivation domain. Loss of function has been demonstrated for some of them by distinct *in vitro* approaches, but experimental reasoning is so far limited to the mutations identified by Roessler et al. (10, 17). Evaluation of the influence of the *GLI2* variations identified within the present study on the transcriptional activity of the *GLI* protein revealed a quantitative effect for the double variants (25%–40% decrease) but a complete loss of function for the p.R516P mutation. In the latter, loss of transcriptional activity was independent from the cell system applied and did not change with presence or absence of the N-terminal suppressor domain. Arginine residue 516 resides within the third zinc finger of the DNA-binding domain of *GLI2*, which consists of 5 consecutive Cys₂His₂ fingers, whose zinc finger motifs 4 and 5 make the strongest base contacts (30). In the crystal structure of a *GLI*-DNA complex, the side chain of Arg516 makes direct contact through a hydrogen bond to a phosphodiester oxygen of the DNA backbone (30). Replacement of proline for arginine can be assumed to result in the loss of this hydrogen bond because proline cannot act as hydrogen bond donor. This assumption was confirmed by EMSAs that demonstrated that the p.R516P *GLI2* protein is not able to form complexes with a consensus *GLI*-binding site anymore.

Severity of the clinical manifestations in our study appeared to worsen when *GLI2* variants occurred within

protein domains with critical functional importance; p.R516P is assigned to the DNA-binding zinc finger domain, whereas p.R1543H resides within the essential transactivation domain. Failure to detect any loss of transcriptional activity as observed for the p.R1543H variant might be due to the fact that our test system relies on an artificial minimal promoter construct. The action of additional factors (such as coactivators), operating in the physical context of native *GLI2* target genes, might be affected by the conservative histidine for arginine substitution in the native environment but not in our system. Alternatively, indispensability of the C-terminal peptide has been demonstrated for the mouse ortholog (9), but functional importance might differ in the human *GLI2* protein. Additional studies employing more specific experimental models are necessary.

Although the phenotype of the p.R516P carrier was modestly affected compared with *GLI2* patients at the severe end of the HPE spectrum, we investigated whether the proline for arginine substitution demonstrates a dominant-negative effect on the wild-type *GLI2* protein. Cells cotransfected with wild-type and mutant *GLI2* constructs revealed an induction of the reporter gene comparable to cells expressing wild-type *GLI2* alone. Such a lack of functional dominance was also reported for a zinc-finger-3/4-lacking protein independent from the presence or absence of the N-terminal suppressor domain, and thus our results support the observation by Roessler et al (10) that dominant-negative action requires intact zinc finger domains and DNA-binding activity. The pathogenic impact of the p.R516P mutation, therefore, is probably the consequence of a dose effect.

In summary, evidence for a causative pathogenic effect, inferred from variant distribution within control cohorts and functional evaluation, can be provided for the p.R516P *GLI2* mutation. Clinical manifestations of *GLI2* mutational carriers are highly variable and may include HPE and HPE-like findings, midline facial anomalies, and maldevelopment of the anterior and posterior pituitary lobes leading to variable hormone deficiencies of the adenohypophysis and neurohypophysis, and may also comprise defects in the morphogenesis of the extremities resulting in preaxial or postaxial polydactyly and possibly being associated with the split hand/split foot malformation (31, 32). However, in conditions of pan-hypopituitarism, *GLI2* mutations appear to be frequently accompanied by an ectopic neurohypophysis and polydactyly. Striking clinical heterogeneity hallmarked by a lack of consistently occurring clinical findings as well as incomplete penetrance of specific *GLI2* mutations point to a modifying impact exerted by interacting genes (where common *GLI2* variants with modest functional impact

might act themselves as modifiers) and pathways within an individual genetic background (33, 34). Currently, the concept of autosomal random monoallelic expression is emerging, which indicates that a fraction of genes throughout the genome are expressed from only one randomly selected allele. Although the alleles that become transcribed differ within a single organism, there is a remarkable clonal stability (eg, within a given tissue), which might result in the preferential expression of a heterozygous disease-causing protein variant (35).

Acknowledgments

We thank all participating physicians within the Genetics and Neuroendocrinology of Short Stature International Study (GeNeSIS) program for collecting samples and providing data. Furthermore, we thank Dr E. Roessler (National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) and Dr H. Sasaki (Osaka University, Osaka, Japan) for kindly providing plasmids used in the cotransfection assays. The authors wish to acknowledge the support of the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) and the contributions of the research institutions, study investigators, field staff, and study participants in creating this resource for biomedical research.

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

Funding for GO ESP was provided by NHLBI Grants RC2 HL-103010 (HeartGO), RC2 HL-102923 (LungGO), and RC2 HL-102924 (WHISP). The exome sequencing was performed through NHLBI Grants RC2 HL-102925 (BroadGO) and RC2 HL-102926 (SeattleGO). This work was supported by the Genetics and Neuroendocrinology of Short Stature International Study (GeNeSIS) program sponsored by Eli Lilly and Company (Indianapolis, Indiana).

Disclosure Summary: R.P. has received research grants from Eli Lilly and Merck Serono and serves on an Ipsen advisory board. W.F.B. is an employee and stockholder of Eli Lilly and Company. G.M.C.F., J.K., G.A., Y.B., C.C., K.D., N.H., A.K., J.S., and H.S. have nothing to disclose.

References

- Dasen JS, Rosenfeld MG. Signaling mechanisms in pituitary morphogenesis and cell fate determination. *Curr Opin Cell Biol*. 1999; 11:669–677.
- Treier M, O'Connell S, Gleiberman A, et al. Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development*. 2001;128: 377–386.
- Kelberman D, Rizzotti K, Lovell-Badge R, Robinson IC, Dattani MT. Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. *Endocr Rev*. 2009;30:790–829.
- Mo R, Freer AM, Zinyk DL, et al. Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development*. 1997;124:113–123.
- Park HL, Bai C, Platt KA, et al. Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development*. 2000;127:1593–1605.
- Matise MP, Epstein DJ, Park HL, Platt KA, Joyner AL. Gli2 is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system. *Development*. 1998;125:2759–2770.
- Brewster R, Mullor JL, Altaba A. Gli2 functions in FGF signaling during antero-posterior patterning. *Development*. 2000;127:4395–4405.
- Altaba A, Palma V, Dahmane N. Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3:24–33.
- Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development*. 1999;126:3915–3924.
- Roessler E, Ermilov AN, Grange DK, et al. A previously unidentified amino-terminal domain regulates transcriptional activity of wild-type and disease-associated human GLI2. *Hum Mol Genet*. 2005; 14:2181–2188.
- Roessler E, Muenke M. The molecular genetics of holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010;154C:52–61.
- Dubourg C, Bendavid C, Pasquier L, Henry C, Odent S, David V. Holoprosencephaly. *Orphanet J Rare Dis*. 2007;2:8.
- Cohen MM Jr. Holoprosencephaly: clinical, anatomic, and molecular dimensions. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2006;76: 658–673.
- Nanni L, Ming JE, Du Y, et al. SHH mutation is associated with solitary median maxillary central incisor: a study of 13 patients and review of the literature. *Am J Med Genet*. 2001;102:1–10.
- Odent S, Atti-Bitach T, Blayau M, et al. Expression of the Sonic hedgehog (SHH) gene during early human development and phenotypic expression of new mutations causing holoprosencephaly. *Hum Mol Genet*. 1999;8:1683–1689.
- Stecca B, Ruiz IA. Context-dependent regulation of the GLI code in cancer by HEDGEHOG and non-HEDGEHOG signals. *J Mol Cell Biol*. 2010;2:84–95.
- Roessler E, Du YZ, Mullor JL, et al. Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:13424–13429.
- Bertolacini CD, Ribeiro-Bicudo LA, Petrin A, Richieri-Costa A, Murray JC. Clinical findings in patients with GLI2 mutations: phenotypic variability. *Clin Genet*. 2012;81:70–75.
- Franca MM, Jorge AA, Carvalho LR, et al. Novel heterozygous nonsense GLI2 mutations in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe without holoprosencephaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:E384–E391.
- Rahimov F, Ribeiro LA, de Miranda E, Richieri-Costa A, Murray JC. GLI2 mutations in four Brazilian patients: how wide is the phenotypic spectrum? *Am J Med Genet A*. 2006;140:2571–2576.
- Wannasilp N, Solomon BD, Warren-Mora N, et al. Holoprosencephaly in a family segregating novel variants in ZIC2 and GLI2. *Am J Med Genet A*. 2011;155A:860–864.
- Culler FL, Jones KL. Hypopituitarism in association with postaxial polydactyly. *J Pediatr*. 1984;104:881–884.
- The 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010;467: 1061–1073.
- Taipale J, Chen JK, Cooper MK, et al. Effects of oncogenic mutations in Smoothened and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature*. 2000;406:1005–1009.
- Vila G, Theodoropoulou M, Stalla J, et al. Expression and function of sonic hedgehog pathway components in pituitary adenomas: evidence for a direct role in hormone secretion and cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:6687–6694.

26. Sasaki H, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H. A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3 β floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development*. 1997; 124:1313–1322.
27. Kamachi Y, Kondoh H. Overlapping positive and negative regulatory elements determine lens-specific activity of the δ 1-crystallin enhancer. *Mol Cell Biol*. 1993;13:5206–5215.
28. Wang Y, Martin JF, Bai CB. Direct and indirect requirements of Shh/Gli signaling in early pituitary development. *Dev Biol*. 2010; 348:199–209.
29. Vieira AR, Avila JR, Daack-Hirsch S, et al. Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS Genet*. 2005;1:e64.
30. Pavletich NP, Pabo CO. Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science*. 1993;261:1701–1707.
31. Babbs C, Heller R, Everman DB, et al. A new locus for split hand/foot malformation with long bone deficiency (SHFLD) at 2q14.2 identified from a chromosome translocation. *Hum Genet*. 2007; 122:191–199.
32. David D, Marques B, Ferreira C, et al. Characterization of two ectrodactyly-associated translocation breakpoints separated by 2.5 Mb on chromosome 2q14.1-q14.2. *Eur J Hum Genet*. 2009;17: 1024–1033.
33. Cohen MM Jr. Hedgehog signaling update. *Am J Med Genet A*. 2010;152A:1875–1914.
34. Solomon BD, Mercier S, Velez JJ, et al. Analysis of genotype-phenotype correlations in human holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010;154C:133–141.
35. Gimelbrant A, Hutchinson JN, Thompson BR, Chess A. Widespread monoallelic expression on human autosomes. *Science*. 2007; 318:1136–1140.

4.2 Supplemental Material

Materials and Methods

Screening for *GLI2* mutations. Primer sequences for the 19 PCR fragments covering all coding exons and flanking intronic sequences can be provided upon request.

The monoallelic location of combined variants were confirmed either by direct sequencing of the *GLI2* gene fragment in parents and siblings or alternatively by restriction endonuclease digestion of PCR products.

Database mining. Gene or sequence centered queries were performed at

- NCBI's dbSNP [build 136; URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>; accessed November 2011]
- the NHLBI Exome Sequencing Project [Exome Variant Server, NHLBI Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA (URL: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>); accessed January 2012]
- the 1000 genomes project [URL: <http://www.1000genomes.org/>; accessed January 2012 (23)].

In the case of the NHLBI Exome Sequencing Project genotyping data are collected from the extremes of specific traits that tend to be related to heart, lung, and blood disorders. Since *GLI2* variants have not been described as associated with such traits, frequency data for the *GLI2* gene are assumed to represent the general population.

Evaluation to predict the possible impact of the amino acid substitutions were obtained using

- the Polymorphism Phenotyping (PolyPhen-2) tool (URL: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>; accessed November 2011).

Site directed mutagenesis. Variants were introduced into the cloning plasmid pBSK+*GLI2* alone or in combination according to their native occurrence using the QuickChange XL Site directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA). Subsequently, sequence cassettes bearing the variant were inserted into pCS2-*GLI2*fl and pCS2-*GLI2*ΔN by restriction endonuclease digestion and ligation. Detailed cloning protocols and sequences of the mutagenesis primers can be provided upon request.

Cell culture and luciferase reporter assays. AtT-20 and NIH-3T3 cells were cultured under standard conditions: AtT-20 in DMEM/F12 medium, NIH-3T3 in DMEM High Glucose, each supplemented with 10% fetal calf serum and 1% Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories). Transfections were carried out using Lipofectamin 2000 (Life Technologies, Darmstadt, Germany). COS7 cells cultured in DMEM High Glucose, supplemented with 10% fetal calf serum and 1% Penicillin/Streptomycin, were used for transfections and subsequent electromobility shift assays.

To normalize for transfection efficiency and cell number in luciferase reporter assays, the pGL4.7 vector expressing the renilla luciferase under control of a CMV promoter was co-transfected. GLI2 effector plasmid constructs are described above. Luciferase activity was measured 24 h after transfection and all assays were performed at least in triplicate.

Electromobility shift assays. After transfection cells were grown for 2 days, washed in PBS and lysed in EMSA lysis buffer [HEPES, pH7.9, 20 mM; NaCl, 0.42 M; NP40, 0.5 %; Glycerol 25 %; EDTA, 0.2 mM; MgCl₂, 1,5 mM; PMSF, 1 mM; DTT, 1 mM; Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific)]. 5'-Biotin-labeled oligonucleotides comprising the consensus GLI binding site and the surrounding sequence as present in the human *PTCH1* promoter (5'-GTTGCCTACCTIGGGTGGTCTCTACTTT) were annealed with the complementary strand and used as probes. Binding reactions using 40 µg cell lysate and 0.1 pmol probe were performed in the presence of 1 mM DTT, 1 µg poly(dI.dC), 2.5 % glycerol, 0.05 % Igepal, and competitor oligonucleotides where indicated. Protein/DNA complexes were separated in a 5 % polyacrylamide gel in 0.5× TBE buffer, transferred onto a nylon membrane and detected using horseradish peroxidase-conjugated avidin. To verify GLI2 protein expression portions of the same lysates used in the EMS assays were separated by SDS-PAGE and detected by western blotting using a primary antibody directed against the N-terminal Myc-tag that is encoded in-frame at the 5'-terminus of each GLI2 cDNA construct.

Supplemental Figures

Fig. 1. Phylogenic conservation of affected amino acids among GLI2 orthologues of the indicated species. UniProtKB accession numbers are given in parentheses. Full length proteins were aligned using the ClustalW2 algorithm at <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>; symbols below the alignment indicate “*”, identical residue, “:”, conserved substitutions, “.” semi-conserved substitutions.

p.R516P

```

human (P10070)      VVHMRRHTGEKPKCTFEGCSKAYSRLLENLKTHLRSHTEGKPYVCEHEGC 540
gorilla (G3SFH2)   VVHMRRHTGEKPKCTFEGCSKAYSRLLENLKTHLRSHTEGKPYVCEHEGC 523
dog (F1PB81)       VVHMRRHTGEKPKCTFEGCSKAYSRLLENLKTHLRSHTEGKPYVCEHEGC 491
pig (F1RX4)        VVHMRRHTGEKPKCTFEGCSKAYSRLLENLKTHLRSHTEGKPYVCEHEGC 371
elephant (G3U0V7)  VIHWQANTSFKCQPCI FEGCSKAYSRLLENLKTHLRSHTEGKPYVCEHEAC 445
mouse (Q0VGT2)     VVHMRRHTGEKPKCTFEGCSKAYSRLLENLKTHLRSHTEGKPYVCEHEGC 520
rat (F1M2B7)       VVHMRRHTGEKPKCTFEGCSKAYSRLLENLKTHLRSHTEGKPYVCEHEGC 474
opossum (F6SFS2)  VVHMRRHTGEKPKCTFEGCSKAYSRLLENLKTHLRSHTEGKPYVCEHEGC 422
clawed frog (F6Y5K1) VVHMRRHTGEKPKCTFEGCYKAYSRLLENLKTHLRSHTEGKPYVCEHEGC 457
zebrafish gli2a (B0S6T1) VVHMRRHTGEKPKCTFEGCSKAYSRLLENLKTHLRSHTEGKPYVCEHEGC 505
zebrafish gli2b (F1QH64) VVHMRRHTGEKPKCTFEGCSKAYSRLLENLKTHLRSHTEGKPYVCEHEGC 357
.*. : .* . * : * ***** *****

```

p.[M1444I; L1445F]

```

human (P10070)      AMPSSQETAEAVPKGAMGNMGSVPQPPQDAGGAPDHSMLYYYGQIHMV 1454
gorilla (G3SFH2)   AMPSSQETAEAVPKGAMGNMGSVPQPPQDAGGAPDHSMLYYYGQIHMV 1425
dog (F1PB81)       AVSANQEMVD-VPKGAMGNVGARPPQPPQDAGGAPDHSMLYYYGQIHMV 1380
pig (F1RX4)        ALSANQEMAEVVPKGTMLSL--PQPQAQDTGGAQDHSMLYYYGQIHMV 1280
elephant (G3U0V7)  AGVASQETTEAMSKGMMGTMPVLPQPPQDAGGAPDHSMLYYYGQIHMV 1296
mouse (Q0VGT2)     VTSANQETAEMPKGPAQTVMVLAQPS-QDTGRADQNTLYYYYGQIHMV 1418
rat (F1M2B7)       VTSANQETAEMPKGPAQTVMVLTQPS-QDTGRADQNTLYYYYGQIHMV 1370
opossum (F6SFS2)  TGTAGQETGEAIKPKSINDMP-----KDNALLYYSAQIHMV 1277
clawed frog (F6Y5K1) DLSPAQQTAETPKRPEEADPS-----KDNALLYYSAQIHMV 1303
zebrafish gli2a (B0S6T1) CSLSNVNSSASPKRPEEVGQH-----SNGNGTMYSGEIHML 1315
zebrafish gli2b (F1QH64) NFSPAYDTSASPK-----SSSMFYTQQIHMV 1115
      :  :  :  :  *

```

p.[M1352V; D1520N]

```

human (P10070)      LAGVPPPVPVQSYQQSHH LAAISMVSGYHQVPSLLPARQPGHMEPQTGP 1358
gorilla (G3SFH2)   LAGVPPPVPVQSYQQSHH LAAISMVSGYHQVPSLLPARQPGHMEPQTGP 1329
dog (F1PB81)       LAGMPLHS TQSYPQQGHH LATSMSQGYRQGPSLLPSQPGHMEPQQGT 1286
pig (F1RX4)        LPGMPPHAAQSYPQSHL LATAMSGYRQGPSLMP SHQPSHMEPQQGT 1188
elephant (G3U0V7)  -----QSHH LAAISMVSGYRQGPSLLPSQPGHMEPQQGM 1201
mouse (Q0VGT2)     LAAVS-----QPHVLSYQQSYQQSNLLS SHQPGHMESSQ-- 1329
rat (F1M2B7)       LAAVS-----QPHVLSYQQSYQQSGLLPS SHQPSHMESSQ-- 1279
opossum (F6SFS2)  MHMVTP---QNYQQSHH LPPSMVSGYHQVPSLLPSHQP NFDVQQNM 1210
clawed frog (F6Y5K1) -----TQGFANNFPINQDGLRPPNAYTPTQONCLEPQQNT 1218
zebrafish gli2a (B0S6T1) -----NLMHMNINQNGYVPLQTATQAGR----- 1249
zebrafish gli2b (F1QH64) -----NYSQMS-SNQQGYIVASQNVNGL----- 1060
          :  :  :  :  *

```

```

human (P10070)      LE-APOIDF DAIMDDGDHSLFSGALS PSLLHLSLQNSSRLTTPRNSLT 1553
gorilla (G3SFH2)   LE-APOIDF DAIMDDGDHSLFSGALS PSLLHLSLQNSSRLTTPRNSLT 1524
dog (F1PB81)       LE-APOIDF DAIMDDGDHSLSGALS PSLLHLSLQNSSCLTTPRNSLT 1479
pig (F1RX4)        LE-APOIDF DAIMDDGDHSLSGALS PGLLHLSLQSSSLR TTPRNSLT 1370
elephant (G3U0V7)  LE-APOVDF DAIMDDGDHSLSGALS PSLLHLSLQNSSRL TTPRNSLT 1390
mouse (Q0VGT2)     LE-PPOIDF DAIMDDGDHSLFSGALS PTLLHNLQNSRLTTPRNSLT 1511
rat (F1M2B7)       LE-PPOIDF DAIMDDGDHSLFSGALS PSLLHNLQNSRLTTPRNSLT 1463
opossum (F6SFS2)  LE-PPOIDF DAIMDDGDHSLMSGTSLPS ILQNLQNSRLTTPRNSLT 1345
clawed frog (F6Y5K1) LEQP VPI DF DAMDDGDHSLMSGTSLPS LLQSFQSSRLTTPRNSLT 1389
zebrafish gli2a (B0S6T1) SLDTQI DF DAMLDDGDHSLMSGTSLPS LLQSIQNSRLTTPRNSVLT 1406
zebrafish gli2b (F1QH64) -ADPQI DF DAMLDDGDHSLMSGTSLPALLRSLQNSSRLTTPRNSVLT 1192
      . : * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *

```

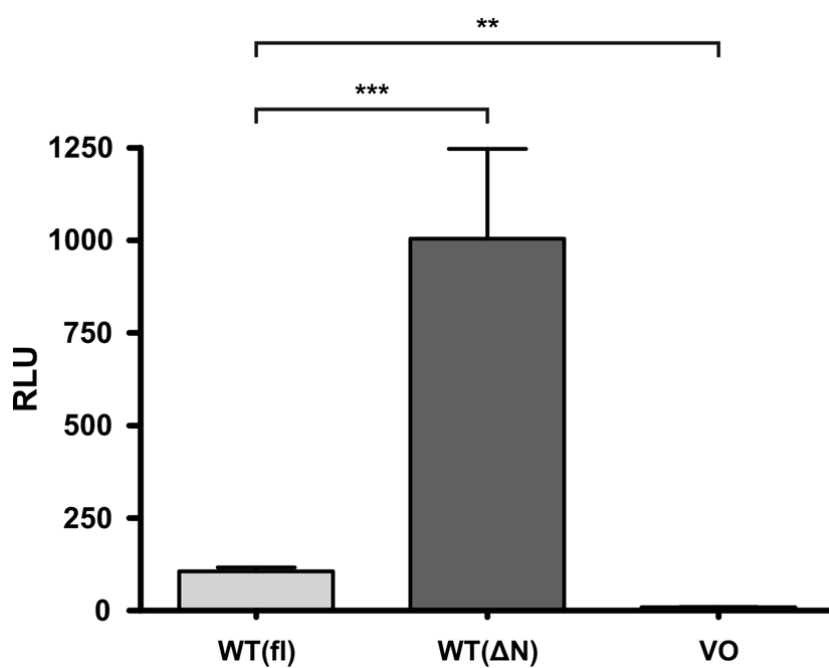
p.R1543H

```

human (P10070)      LE-APOIDF DAIMDDGDHSLFSGALS PSLLHLSLQNSSRLTTPRNSLT 1553
gorilla (G3SFH2)   LE-APOIDF DAIMDDGDHSLFSGALS PSLLHLSLQNSSRLTTPRNSLT 1524
dog (F1PB81)       LE-APOIDF DAIMDDGDHSLSGALS PSLLHLSLQNSSCLTTPRNSLT 1479
pig (F1RX4)        LE-APOIDF DAIMDDGDHSLSGALS PGLLHLSLQSSSLR TTPRNSLT 1370
elephant (G3U0V7)  LE-APOVDF DAIMDDGDHSLSGALS PSLLHLSLQNSSRL TTPRNSLT 1390
mouse (Q0VGT2)     LE-PPOIDF DAIMDDGDHSLFSGALS PTLLHNLQNSRLTTPRNSLT 1511
rat (F1M2B7)       LE-PPOIDF DAIMDDGDHSLFSGALS PSLLHNLQNSRLTTPRNSLT 1463
opossum (F6SFS2)  LE-PPOIDF DAIMDDGDHSLMSGTSLPS ILQNLQNSRLTTPRNSLT 1345
clawed frog (F6Y5K1) LEQP VPI DF DAMDDGDHSLMSGTSLPS LLQSFQSSRLTTPRNSLT 1389
zebrafish gli2a (B0S6T1) SLDTQI DF DAMLDDGDHSLMSGTSLPS LLQSIQNSRLTTPRNSVLT 1406
zebrafish gli2b (F1QH64) -ADPQI DF DAMLDDGDHSLMSGTSLPALLRSLQNSSRLTTPRNSVLT 1192
      . : * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *

```

Fig. 2. Induction of luciferase activity using the optimized pGL4.10-8x3'Gli-BS reporter plasmid in NIH-3T3 cells. Activation of reporter expression by the full length human GLI2 construct [WT(fl)], containing the inhibitory domain at the N-terminal region, was compared to the protein without the N-terminal suppressor sequence [WT(Δ N)]. As control the empty pCS2MT vector backbone without the GLI2 sequence was used (V0). The increase in transcriptional activity caused by N-terminal truncation is in line with data reported previously by Roessler E et al. [Hum Mol Genet 2005; 14(15):2181-2188].



Patient reports

Patient A

Patient A carries two point variations on the same allele (c.[4054A>G; 4558G>A]) which results in amino acid exchanges in position 1352 from methionine to valine and in position 1520 from aspartic acid to asparagine (p.[M1352V; D1520N]). The same monoallelic combination of these sequence variations was found in patient B for whom no further information beyond the diagnosis of MPHD was available. Location of both variations on the same allele of patient A was confirmed by analysis of parental DNA.

Patient A, a Caucasian boy from U.S.A., inherited the variations from his normal mother. He was presented because of low fT4 but normal TSH in the newborn screen. He had 3 seizures in the neonatal period of which one was a documented hypoglycemic seizure at 10 days of life. Delivery was uneventful at 38 weeks of gestational age with a birth weight of 3912 g (0.90 SDS) and a birth length of 52.5 cm (0.73 SDS). At referral clinical examination revealed hemangioma on the left ear, no visible midline defects, a stretched penile length of 2 cm, and undescended testicles. Laboratory evaluation showed free T4 6.43 pmol/l (normal 11.58-28.31), TSH 5.3 mIU/l (normal 0.35-5.5), random cortisol 46.9 nmol/l (normal 193-690), and GH 2.2 ng/ml. He was started on hydrocortisone and levothyroxine replacement and, in addition, he received 3 doses of testosterone (25 mg IM) every month to enhance penile length. His growth slowed down and went from 50th-75th percentile to below the 3rd percentile at 11 months of age with a height of 70.3 cm (-1.63 SDS) and weight of 8.34 kg (-1.56 SDS). A clonidine stimulation test showed a peak growth hormone of 1 ng/ml (>10 ng/ml). MR imaging revealed an ectopic posterior pituitary, small anterior lobe and an absent pituitary stalk. He was started on growth hormone therapy at 15 months of age and he responded very well reaching a normal height for age.

Patient C harbors a tandem point variation (c.4332_4333delinsAT) resulting in an amino acid exchange in position 1444 from methionine to isoleucine and the juxtaposed leucine to phenylalanine (p.[M1444I; L1445F]). A recognition site for the restriction enzyme SphI is obstructed by the presence of either variant. Thus, by restriction digestion of the PCR fragment, we could confirm that this double mutation is also monoallelic (data not shown).

The patient, a girl from Peru, was first presented to a pediatric endocrinologist in Peru at about 8 years of age. Reportedly, she had not been growing well after 6 years of age, before that she was a healthy normal child (birth weight 3800 g). During the evaluation in Peru when she was about 8 years and 4 months old, she was found to have low free T4 (0.74 ng/dl, normal range is 0.8 – 2.0 ng/dl) and normal TSH (2.2 mIU/ml). Levothyroxine treatment was started at that time. After the thyroid hormone was normalized, she had growth hormone testing using clonidine in two occasions. The peak GH levels were 1.9 ng/ml and 1.4 ng/ml respectively. Her karyotype study showed 46,XX. Her first evaluation in the U.S.A. was when she was about 10 years and 6 months old. Her height was 111.3 cm (below -4 SDS) and her weight was 19.77 kg (below the -3 SDS). Clinical examination showed no further syndromic features including no evidence of midline defects. Investigation for ACTH, prolactin and ADH showed normal results at that time. Her bone age had always been more than 3 years delayed from her chronological age.

MRI indicated a hypoplastic adenohypophysis with neurohypophysis identified in the posterior portion of the sella. The pituitary stalk was normal in size and the infundibulum appeared normal. Growth hormone replacement was started when she was approximately 12 years old [height 117 cm (-4.60 SDS), weight 22.5 kg (-3.15 SDS)]. She had substantial response to the treatment. At age 14 years she exhibited no signs of thelarche and adrenarche. Her baseline gonadotropin levels were undetectable. Thus, pituitary hormone deficiencies definitely involved TSH, GH, and gonadotropins but no evidence of adrenal insufficiency. Sex steroid replacement therapy was initiated at age of 17 years and 7 months with conjugated estrogens. At the age of 18 years and 6 months, her AM serum cortisol was 12.32 µg/dl. There have been no signs of ACTH deficiency or ADH deficiency. She reached her adult height of 161.7 cm at about 19 years of age (genetic target height, 143 cm). The menstrual cycles were established after addition of medroxyprogesterone at the age of 19 years.

The older sister of patient C, who carries the same combination of GLI2 variants, displays a similar spectrum of pituitary hormone deficiencies requiring GH, thyroid hormone and sex steroid replacement therapies. MR imaging disclosed the same appearance of the pituitary and stalk including a hypoplastic anterior lobe and a neurohypophysis in its normal location. Currently patient C and her sister live in Peru on thyroid hormone and sex steroid replacement therapies.

Patient E has a single point mutation (c.4628G>A) resulting in an exchange from arginine in position 1543 to histidine (p.R1543H).

The patient, a Caucasian girl from Australia, presented with early neonatal hypoglycemia and collapse. Length recorded one month after birth was 48.3 cm (-2.02 SDS) and weight 3200 g (-1.48 SDS). Pituitary testing at two weeks of age revealed ACTH (maximal cortisol after short synacthen test, 182 nmol/l) and TSH deficiency [fT4, 10.9 pmol/l (normal range, 13 – 35 pmol/l); TSH, 2.55 mU/l (normal range, 0 -10 mU/l)] and indicated gonadotropin deficiency with undetectable LH and FSH serum concentrations. At the age of seven months GH concentration was 2.8 ng/ml during fasting (BGL 2.4 mmol/l). IGF-1 was undetectable. Glucagon test showed a peak GH of 3.7 ng/ml, IGF1 serum concentration at that time was below the detection limit of the assay. GH therapy was initiated at the age of nine months due to decelerating length gain [58.2 cm (-3.84 SDS)] and the insufficient GH response to the glucagon stimulus. Adrenal hormone replacement was commenced with hydrocortisone and thyroid replacement with levothyroxine from 2 weeks of age. Under the consequent GH therapy the patient reached a normal height of 142.4 cm (0.72 SDS) at the age of 9.9 years [weight 34.2 kg (0.25 SDS); BMI 16.87 (0.03 SDS)]. Bone age was appropriate for chronological age over the entire period of supervision. She has mild learning difficulties.

Clinical examination showed a crowding of midfacial features and an antimongoloid slant, which later on resolved resulting in a reportedly non-dysmorphic appearance. MRI showed severe anterior pituitary hypoplasia and absent posterior pituitary and pituitary stalk. The right optic nerve was hypoplastic with an absent right-sided chiasm, whereas left optic nerve and left-sided chiasm appeared normal. Vision was very poor on the right (0.2/30) and normal on the left.

The heterozygous c.4628G>A mutation was inherited from the father, who is 182.9 cm tall with no apparent disease reported.

5. Zusammenfassung und Interpretation

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Funktionelle Charakterisierung heterozygoter *GLI2 missense* Mutationen bei Patienten mit multiplem hypophysären Hormonmangel

eingereicht von Gunter Matthias Christian Flemming geboren am 26.02.1982 in Leipzig.

angefertigt an der Klinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche der Universität Leipzig

Betreuung:

Dr. rer. nat. Jürgen Klammt

Prof. Dr. med. Roland Pfäffle

Eingereicht im April 2013

Bislang konnte nur in einem Teil der Patienten mit MPHD eine genetische Ursache für den Hormonausfall, mit oder ohne morphologische Ausfälle der Hypophyse, gefunden werden. Im Rahmen des GeNeSIS-Programms wurden bislang mehrere tausend Teilnehmer auf bekannte IGHD/MPHD-assoziierte Genmutationen untersucht, zu diesen etablierten Genen gehören: *GH*, *GHRHR*, *PROP1*, *POU1F1*, *HESX1*, *LHX3*, *LHX4*, aber *GLI2* bislang nicht. *GLI2*-Mutationsanalysen an Mäusen ergaben, dass diese Mäuse, neben anderen Auffälligkeiten (z.B. kraniofaziale Defekte, Lungenentwicklungsstörung und skelettalen Fehlbildungen wie *Polydaktylie*), auch Störungen der Organogenese der Hypophyse aufwiesen [81]. Der erste Bericht über *GLI2*-Mutationen im Menschen wurde 2003 von Roessler et al. publiziert. Dieser ergab, dass *GLI2 loss of function* Mutationen für das Auftreten von Holoprosenzephalie verantwortlich sein können. Interessanterweise zeigte sich in den Stammbaumanalysen betroffener Familien ein Zusammenhang zwischen

heterozygoten *GLI2*-Mutationen und dem Auftreten einer Hypophyseninsuffizienz [74]. Ziel dieser Arbeit war es eine Gruppe der Teilnehmer des GeNeSIS-Programms, welche in den o.g. etablierten Genen keine Veränderungen aufwiesen, auf Mutationen im *GLI2*-Gen zu untersuchen. Bislang konnte experimentell ein pathogener Effekt von *GLI2*-Varianten nur für *nonsense* und *frame shift* Mutationen, welche zu einem beschnittenen Protein dem die C-terminale Transaktivierungsdomäne fehlt, nachgewiesen werden [74, 75]. Daher führten wir für die von uns gefundenen *GLI2*-Varianten funktionelle Untersuchungen durch, um eine mögliche Funktionsbeeinträchtigung des veränderten *GLI2*-Proteins nachzuweisen.

5.1 Screening

Wir haben 168 Patienten mit MPHD aus 165 Familien in 15 Ländern untersucht. Das Durchschnittsalter bei Studieneinschluss lag bei 9.13 Jahren (Spannweite: 0.11-28.39 Jahre). Bei allen Patienten waren mindestens ein GH- und ein TSH-Mangel dokumentiert. Ein ACTH- und/oder Cortisol-Mangel wurde bei 62 Patienten, ein Gonadotropin-Mangel bei 38 Patienten angegeben. Allerdings waren 87 Kinder (63%) bei Studieneinschluss präpubertär (≤ 10 Jahre), somit könnte sich ein FSH/LH-Mangel im Zuge der Pubertät noch ergeben. Auffälligkeiten in der zentralen Bildgebung mittels cMRT wurden bei 96 Patienten angegeben: 65 mit Hypoplasie des HVL, 52 mit ektopem oder fehlendem HHL, sowie 15 mit Auffälligkeiten des Hypophysenstiels des Infundibulum oder der Sella turcica. Zusätzlich untersuchten wir 50 gesunde deutsche Schulkinder als Kontrollpopulation.

Nach der DNA-Isolation aus EDTA-Blut wurde die PCR-Amplifizierung der *GLI2*-Gen-Fragmente durchgeführt. Das humane *GLI2*-Gen besteht aus 13 Exonen. Aufgrund der Länge einzelner Exone erfolgte eine Aufteilung in 19 PCR-Fragmente und anschließend das Prä-Screening mittels *dHPLC*. Proben die ein auffälliges Elutionsmuster von der *dHPLC*-Säule zeigten wurden weiter durch *direct sequencing* untersucht.

5.2 *GLI2*-Varianten

In der Kohorte von 168 Patienten mit MPHD konnten wir 5 Kinder aus 5 verschiedenen Familien identifizieren, bei denen das *GLI2*-Gen vier verschiedene nichtsynonyme *missense* Varianten zeigte. In vorangegangenen Untersuchungen wurden für alle untersuchten Patienten Mutationen in folgenden Genen ausgeschlossen: *POU1F1*, *PROPI*, *HESX1*, *LHX3* und *LHX4*. Patient A und B: identische Kombination von 2 *missense*

Varianten p.(M1352V;D1520N), obwohl sie nicht verwandt waren. Patient C: Dinukleotid-Substitution mit konsekutivem Austausch von zwei Aminosäuren p.(M1444I, L1445F). Patient D: einzelner Aminosäureaustausch (p.R516P). Patient E: einzelner Aminosäureaustausch (p.R1543H). Alle Varianten waren heterozygot und konnten nicht in der Kontrollgruppe aus 50 gesunden Kindern nachgewiesen werden. Vier der fünf von uns gefundenen Varianten wurden in mindestens einem großen populationsbasiertem Exom-Sequenzierungs-Projekt beschrieben (*dbSNP*, *ESP* und/oder *1000 genomes* [10]). Die Variante p.R516P (Patient D) wurde bislang noch nie beschrieben. Und auch die Variante p.R1543H (Patient E) wurde noch niemals krankheitsbezogen publiziert. Nur die Varianten p.R516P (Patient D) und p.R1543H (Patient E) weisen eine hohe phylogenetische Konservierung auf und werden durch *PolyPhen* als schädigend eingeschätzt. Für vier der fünf Patienten waren weitere Untersuchungsergebnisse verfügbar (alle bis auf Patient B): Die Patienten hatten ein retardiertes postnatales Wachstum (Spannweite -3.1 bis -4.6 SDS) bis zum Start einer Wachstumshormon-Ersatztherapie. Extrahypophysäre Auffälligkeiten wurden nicht bei allen Patienten berichtet und waren, falls vorhanden, eher mild ausgeprägt: *postaxiale* Polydactylie (Patient D), Mittelgesichtshypoplasie mit anti-mongoloider Lidachse und Hypoplasie des rechten *Nervus opticus* (Patient E). Im cMRT war bei allen Patienten eine Hypoplasie des HVL auffällig, zudem wiesen die meisten eine Anlagestörung oder Fehllage des HHL bzw. des Hypophysenstiels auf.

5.3 Experimentelle Untersuchungen

Die GLI2-Varianten wurden in pCS2-Expressions-Vektoren eingebracht, dabei untersuchten wir sowohl das *full length* GLI2 (fl), als auch das N-terminal beschnittene GLI2 (Δ N). Um einen möglichen Effekt der von uns gefundenen GLI2-Varianten auf DNA-Bindungsmöglichkeit und die Transaktivierungs-Eigenschaften nachzuweisen, führten wir Co-Transfektions *Luciferase-Assays* durch. Als Zell-Linien nutzten wir NIH-3T3 und AtT-20 Zellen, da bekannt ist, dass der SHH-Signalweg in diesen Zellreihen aktiv ist [95, 96]. Wie zu vermuten war, zeigte das GLI2 Δ N eine deutlich höhere Aktivität im Vergleich zu GLI2fl (ca. 10fach höher). Die Einführung der Varianten der Patient A und B (p.[M1352V; D1192N]) und Patient C (p.[M1444I; L1445F]) in GLI2 Δ N verursachte eine Reduktion der Transkriptionsaktivität auf 75.2% bzw. 59.5%, und in GLI2fl auf 64.7% bzw. 74.8% im Vergleich zum Wildtyp.

Da bei den Patienten die Doppel-Varianten monoallelisch vorlagen, erfolgten zusätzlich *Luciferase-Assays* mit den jeweiligen Einzel-Varianten. Es ergab sich in unserem Reporter-System kein Hinweis, dass es zu einem synergistischen oder einem

antagonistischen Effekt der Einzelvarianten im Vergleich zur Aktivität der Doppelvarianten kommt.

Eine fast vollständige Reduktion der Transkriptionsaktivität ergab sich für die Variante von Patient D (p.R516P), sowohl für GLI2 Δ N als auch für GLI2fl.

Erstaunlich ist, dass die Variante p.R1543H, welche in dem Patienten mit den schwerwiegendsten phänotypischen Veränderungen gefunden wurde, in unseren Studien keine signifikante Reduktion der Transkriptionsaktivität im Vergleich zum Wildtyp zeigte.

Da bereits GLI2-Mutationen mit einem dominant negativen Effekt beschrieben wurden und auch unsere Varianten alle monoallelisch vorkamen, führten wir Cotransfektionsstudien mit äquimolaren Mengen sowohl des GLI2-WT- als auch der Varianten-Plasmide durch. Hierbei konnte kein dominant negativer Effekt der Varianten auf die Transkriptionsaktivität des WT-GLI2 nachgewiesen werden.

Da die Variante p.R516P (Patient D) in der DNA-Bindungsdomäne liegt, führten wir ein *electromobility shift assay* durch. Wir konnten zeigen, dass diese Variante dazu führt, dass das veränderte GLI2-Protein nicht die Konsensus GLI-Bindungsstelle bindet. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die niedrige Transkriptionsaktivität in den *Luciferase-Assays*.

5.4 Interpretation und Diskussion

Träger von GLI2-Mutationen zeigen ein breites Spektrum an klinischen Manifestationen, wie HPE, HPE-ähnliche Auffälligkeiten, Mittelgesichtsfehlbildungen, Fehlentwicklung des HVL und HHL (mit daraus resultierendem Hormonmangel), aber auch Defekte in der Morphogenese der Extremitäten (z.B. prä- und postaxiale Polydaktylie und möglicherweise Spalthand/Spaltfuß-Malformationen) [83, 97]. Bei Patienten mit Panhypopituitarismus und nachgewiesenen GLI2-Varianten scheint es eine Assoziation zu dem Auftreten einer ektopen Lage der Neurohypophyse und Polydaktylie zu geben. Es zeigt sich jedoch eine starke Heterogenität mit variabler Ausprägung der klinischen Symptome und eine inkomplette Penetranz bei Patienten mit GLI2-Varianten. Dies wurde auch für Varianten anderer Gene beschrieben, die in die Entwicklung der Hypophyse involviert sind (LHX4, HESX1 oder OTX2) [94, 98, 99]. Diese Abweichungen und Veränderungen könnten auch durch einen modifizierenden Einfluss interagierender Gene und Signalwege begründet sein, welche durch einen individuellen genetischen Hintergrund bedingt sind [100, 101]. Auch GLI2 könnte solch ein modifizierender Faktor für andere Signalwege sein. Dies wäre eine Erklärung dafür, dass relativ milde GLI2-Varianten ausgeprägte klinische Auffälligkeiten zeigen können.

Ein aktuelles Konzept der autosomalen zufälligen monoallelischen Expression findet zunehmende Verbreitung und Akzeptanz. So wird ein Teil der Gene des gesamten Genoms nur von einem zufällig ausgewählten Allel exprimiert. Obwohl sich das Allel, welches transkribiert wird in einem Individuum unterscheiden kann, erweist sich doch eine gewisse klonale Stabilität in Abhängigkeit der Lokalisation. Dies könnte auch zu einer bevorzugten Expression eines heterozygoten, krankheitsverursachenden Protein-Variante in bestimmten Geweben führen [102].

Sowohl unsere Studie als auch die Arbeit von Franca et al. bestätigt eine erhöhte Anzahl von *GLI2*-Varianten bei Patienten mit MPHD auch ohne Zeichen einer Holoprosenzephalie. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zeigt die Studie von Franca et al., dass die meisten Patienten mit *GLI2*-Varianten MR-morphologische Auffälligkeiten der Hypophyse aufweisen (Hypoplasie des HVL in 21/22 Fällen; ektopter HHL in 16/22, kein HHL sichtbar bei 4/22 Fällen) [103].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass *GLI2* ein neues Kandidaten-Gen für das Auftreten von MPHD ist. Insbesondere bei Patienten mit MPHD und einem ektopten oder nicht nachweisbaren HHL sollte auch auf das Vorliegen von *GLI2*-Varianten untersucht werden. Die Wachstumsbeeinträchtigung bei Patienten mit *GLI2*-Varianten zeigt ein exzellentes Ansprechen auf eine hGH-Substitutionstherapie, so kann bei einem frühzeitigen Beginn der Therapie eine unbeeinträchtigte Endgröße erreicht werden.

6. Referenzen

1. Sitzmann FC. *Pädiatrie* 2002: Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
2. Richmond EJ, Rogol AD. Growth hormone deficiency in children. *Pituitary* 2008; 11: 115-20
3. Rosenfeld RG, Albertsson-Wikland K, Cassorla F, Frasier SD, Hasegawa Y, Hintz RL, Lafranchi S, Lippe B, Loriaux L et al. Diagnostic controversy: the diagnosis of childhood growth hormone deficiency revisited. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1532-40
4. Growth Hormone Research S. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH Research Society. GH Research Society. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3990-3
5. Maghnie M, Strigazzi C, Tinelli C, Autelli M, Cisternino M, Loche S, Severi F. Growth hormone (GH) deficiency (GHD) of childhood onset: reassessment of GH status and evaluation of the predictive criteria for permanent GHD in young adults. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1324-8
6. Youngster I, Rachmiel R, Pinhas-Hamiel O, Bistrizter T, Zuckerman-Levin N, de Vries L, Naugolny L, Eyal O, Braunstein R et al. Treatment with recombinant human growth hormone during childhood is associated with increased intraocular pressure. *J Pediatr* 2012; 161: 1116-9
7. Kelberman D, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Robinson IC, Dattani MT. Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. *Endocr Rev* 2009; 30: 790-829
8. Pfaffle R, Klammt J. Pituitary transcription factors in the aetiology of combined pituitary hormone deficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25: 43-60
9. Kiess W, Kratzsch J, Kruis T, Muller E, Wallborn T, Odeh R, Schlicke M, Klammt J, Pfaffle R. Genetics of human stature: Insight from single gene disorders. *Horm Res Paediatr* 2011; 76 Suppl 3: 11-3
10. Genomes Project C, Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, Hurles ME, McVean GA. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2010; 467: 1061-73

11. Rizzoti K, Lovell-Badge R. Early development of the pituitary gland: induction and shaping of Rathke's pouch. *Rev Endocr Metab Disord* 2005; 6: 161-72
12. Drews U. *Taschenatlas der Embryologie* 1993, Stuttgart-New York: Thieme-Verlag-Stuttgart-New York.
13. Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG. Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev* 2007; 87: 933-63
14. Ericson J, Norlin S, Jessell TM, Edlund T. Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development* 1998; 125: 1005-15
15. Takuma N, Sheng HZ, Furuta Y, Ward JM, Sharma K, Hogan BL, Pfaff SL, Westphal H, Kimura S et al. Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development* 1998; 125: 4835-40
16. Raetzman LT, Ross SA, Cook S, Dunwoodie SL, Camper SA, Thomas PQ. Developmental regulation of Notch signaling genes in the embryonic pituitary: Prop1 deficiency affects Notch2 expression. *Dev Biol* 2004; 265: 329-40
17. Raetzman LT, Wheeler BS, Ross SA, Thomas PQ, Camper SA. Persistent expression of Notch2 delays gonadotrope differentiation. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 2898-908
18. Rosenfeld MG, Briata P, Dasen J, Gleiberman AS, Kioussi C, Lin C, O'Connell SM, Ryan A, Szeto DP et al. Multistep signaling and transcriptional requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Recent Prog Horm Res* 2000; 55: 1-13; discussion 13-4
19. Roh M, Paterson AJ, Asa SL, Chin E, Kudlow JE. Stage-sensitive blockade of pituitary somatomammotrope development by targeted expression of a dominant negative epidermal growth factor receptor in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 600-13
20. Gage PJ, Suh H, Camper SA. The bicoid-related Pitx gene family in development. *Mamm Genome* 1999; 10: 197-200
21. Tremblay JJ, Goodyer CG, Drouin J. Transcriptional properties of Ptx1 and Ptx2 isoforms. *Neuroendocrinology* 2000; 71: 277-86
22. Charles MA, Suh H, Hjalt TA, Drouin J, Camper SA, Gage PJ. PITX genes are required for cell survival and Lhx3 activation. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 1893-903
23. Hunter CS, Rhodes SJ. LIM-homeodomain genes in mammalian development and human disease. *Mol Biol Rep* 2005; 32: 67-77

24. Zhao Y, Morales DC, Hermes E, Lee WK, Pfaff SL, Westphal H. Reduced expression of the LIM-homeobox gene *Lhx3* impairs growth and differentiation of Rathke's pouch and increases cell apoptosis during mouse pituitary development. *Mech Dev* 2006; 123: 605-13
25. Sheng HZ, Zhadanov AB, Mosinger B, Jr., Fujii T, Bertuzzi S, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Mahon KA et al. Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene *Lhx3*. *Science* 1996; 272: 1004-7
26. Olson LE, Tollkuhn J, Scafoglio C, Kronen A, Zhang J, Ohgi KA, Wu W, Taketo MM, Kemler R et al. Homeodomain-mediated beta-catenin-dependent switching events dictate cell-lineage determination. *Cell* 2006; 125: 593-605
27. Dasen JS, Barbera JP, Herman TS, Connell SO, Olson L, Ju B, Tollkuhn J, Baek SH, Rose DW et al. Temporal regulation of a paired-like homeodomain repressor/TLE corepressor complex and a related activator is required for pituitary organogenesis. *Genes Dev* 2001; 15: 3193-207
28. Showalter AD, Smith TP, Bennett GL, Sloop KW, Whitsett JA, Rhodes SJ. Differential conservation of transcriptional domains of mammalian Prophet of Pit-1 proteins revealed by structural studies of the bovine gene and comparative functional analysis of the protein. *Gene* 2002; 291: 211-21
29. Cushman LJ, Showalter AD, Rhodes SJ. Genetic defects in the development and function of the anterior pituitary gland. *Ann Med* 2002; 34: 179-91
30. Ando Z, Sato S, Ikeda K, Kawakami K. *Slc12a2* is a direct target of two closely related homeobox proteins, *Six1* and *Six4*. *FEBS J* 2005; 272: 3026-41
31. Gestri G, Carl M, Appolloni I, Wilson SW, Barsacchi G, Andreazzoli M. *Six3* functions in anterior neural plate specification by promoting cell proliferation and inhibiting *Bmp4* expression. *Development* 2005; 132: 2401-13
32. Simpson TI, Price DJ. *Pax6*; a pleiotropic player in development. *Bioessays* 2002; 24: 1041-51
33. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 1980; 287: 795-801
34. Briscoe J, Chen Y, Jessell TM, Struhl G. A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol Cell* 2001; 7: 1279-91
35. Hammerschmidt M, Brook A, McMahon AP. The world according to hedgehog. *Trends Genet* 1997; 13: 14-21

36. Chuang PT, Kornberg TB. On the range of hedgehog signaling. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10: 515-22
37. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 2001; 15: 3059-87
38. Gritli-Linde A, Lewis P, McMahon AP, Linde A. The whereabouts of a morphogen: direct evidence for short- and graded long-range activity of hedgehog signaling peptides. *Dev Biol* 2001; 236: 364-86
39. Becker S, Wang ZJ, Massey H, Arauz A, Labosky P, Hammerschmidt M, St-Jacques B, Bumcrot D, McMahon A et al. A role for Indian hedgehog in extraembryonic endoderm differentiation in F9 cells and the early mouse embryo. *Dev Biol* 1997; 187: 298-310
40. Bitgood MJ, McMahon AP. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol* 1995; 172: 126-38
41. Iwasaki M, Le AX, Helms JA. Expression of indian hedgehog, bone morphogenetic protein 6 and gli during skeletal morphogenesis. *Mech Dev* 1997; 69: 197-202
42. St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 1999; 13: 2072-86
43. Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* 1996; 6: 298-304
44. Oldak M, Grzela T, Lazarczyk M, Malejczyk J, Skopinski P. Clinical aspects of disrupted Hedgehog signaling (Review). *Int J Mol Med* 2001; 8: 445-52
45. Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H, Jessell TM. Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 1996; 87: 661-73
46. Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 1996; 383: 407-13
47. Dasen JS, Rosenfeld MG. Signaling mechanisms in pituitary morphogenesis and cell fate determination. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 669-77
48. Treier M, O'Connell S, Gleiberman A, Price J, Szeto DP, Burgess R, Chuang PT, McMahon AP, Rosenfeld MG. Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development* 2001; 128: 377-86

49. Bumcrot DA, Takada R, McMahon AP. Proteolytic processing yields two secreted forms of sonic hedgehog. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2294-303
50. Chen X, Tukachinsky H, Huang CH, Jao C, Chu YR, Tang HY, Mueller B, Schulman S, Rapoport TA et al. Processing and turnover of the Hedgehog protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 2011; 192: 825-38
51. Porter JA, Ekker SC, Park WJ, von Kessler DP, Young KE, Chen CH, Ma Y, Woods AS, Cotter RJ et al. Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell* 1996; 86: 21-34
52. Taylor FR, Wen D, Garber EA, Carmillo AN, Baker DP, Arduini RM, Williams KP, Weinreb PH, Rayhorn P et al. Enhanced potency of human Sonic hedgehog by hydrophobic modification. *Biochemistry* 2001; 40: 4359-71
53. Chen MH, Li YJ, Kawakami T, Xu SM, Chuang PT. Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes Dev* 2004; 18: 641-59
54. Lewis PM, Dunn MP, McMahon JA, Logan M, Martin JF, St-Jacques B, McMahon AP. Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell* 2001; 105: 599-612
55. Li Y, Zhang H, Litingtung Y, Chiang C. Cholesterol modification restricts the spread of Shh gradient in the limb bud. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 6548-53
56. Burke R, Nellen D, Bellotto M, Hafen E, Senti KA, Dickson BJ, Basler K. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* 1999; 99: 803-15
57. Kawakami T, Kawcak T, Li YJ, Zhang W, Hu Y, Chuang PT. Mouse dispatched mutants fail to distribute hedgehog proteins and are defective in hedgehog signaling. *Development* 2002; 129: 5753-65
58. Callejo A, Biloni A, Mollica E, Gorfinkiel N, Andres G, Ibanez C, Torroja C, Doglio L, Sierra J et al. Dispatched mediates Hedgehog basolateral release to form the long-range morphogenetic gradient in the *Drosophila* wing disk epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 12591-8

59. Ma Y, Erkner A, Gong R, Yao S, Taipale J, Basler K, Beachy PA. Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of dispatched. *Cell* 2002; 111: 63-75
60. Tenzen T, Allen BL, Cole F, Kang JS, Krauss RS, McMahon AP. The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice. *Dev Cell* 2006; 10: 647-56
61. Chuang PT, McMahon AP. Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 1999; 397: 617-21
62. Ryan KE, Chiang C. Hedgehog secretion and signal transduction in vertebrates. *J Biol Chem* 2012; 287: 17905-13
63. Goetz SC, Anderson KV. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 331-44
64. Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* 2007; 317: 372-6
65. Heretsch P, Tzagkaroulaki L, Giannis A. Modulators of the hedgehog signaling pathway. *Bioorg Med Chem* 2010; 18: 6613-24
66. Delattre M, Briand S, Paces-Fessy M, Blanchet-Tournier MF. The Suppressor of fused gene, involved in Hedgehog signal transduction in *Drosophila*, is conserved in mammals. *Dev Genes Evol* 1999; 209: 294-300
67. Park HJ, Lee J, Kim MJ, Kang TJ, Jeong Y, Um SH, Cho SW. Sonic hedgehog intradermal gene therapy using a biodegradable poly(beta-amino esters) nanoparticle to enhance wound healing. *Biomaterials* 2012; 33: 9148-56
68. Alexandre C, Jacinto A, Ingham PW. Transcriptional activation of hedgehog target genes in *Drosophila* is mediated directly by the cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes Dev* 1996; 10: 2003-13
69. Bai CB, Stephen D, Joyner AL. All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3. *Dev Cell* 2004; 6: 103-15
70. Ingham PW, Placzek M. Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 841-50
71. Pan Y, Bai CB, Joyner AL, Wang B. Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 3365-77

72. Hui CC, Angers S. Gli proteins in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; 27: 513-37
73. Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Maekawa T, Nakafuku M, Ishii S. Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J Biol Chem* 1999; 274: 8143-52
74. Roessler E, Du YZ, Mullor JL, Casas E, Allen WP, Gillessen-Kaesbach G, Roeder ER, Ming JE, Ruiz i Altaba A et al. Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 13424-9
75. Roessler E, Ermilov AN, Grange DK, Wang A, Grachtchouk M, Dlugosz AA, Muenke M. A previously unidentified amino-terminal domain regulates transcriptional activity of wild-type and disease-associated human GLI2. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 2181-8
76. Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* 1999; 126: 3915-24
77. Motoyama J, Liu J, Mo R, Ding Q, Post M, Hui CC. Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus. *Nat Genet* 1998; 20: 54-7
78. Brewster R, Mullor JL, Ruiz i Altaba A. Gli2 functions in FGF signaling during antero-posterior patterning. *Development* 2000; 127: 4395-405
79. Wang Y, Martin JF, Bai CB. Direct and indirect requirements of Shh/Gli signaling in early pituitary development. *Dev Biol* 2010; 348: 199-209
80. Ding Q, Motoyama J, Gasca S, Mo R, Sasaki H, Rossant J, Hui CC. Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in Gli2 mutant mice. *Development* 1998; 125: 2533-43
81. Park HL, Bai C, Platt KA, Matise MP, Beeghly A, Hui CC, Nakashima M, Joyner AL. Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development* 2000; 127: 1593-605
82. Rahimov F, Ribeiro LA, de Miranda E, Richieri-Costa A, Murray JC. GLI2 mutations in four Brazilian patients: how wide is the phenotypic spectrum? *Am J Med Genet A* 2006; 140: 2571-6
83. Babbs C, Heller R, Everman DB, Crocker M, Twigg SR, Schwartz CE, Giele H, Wilkie AO. A new locus for split hand/foot malformation with long bone

- deficiency (SHFLD) at 2q14.2 identified from a chromosome translocation. *Hum Genet* 2007; 122: 191-9
84. Hutchin ME, Kariapper MS, Grachtchouk M, Wang A, Wei L, Cummings D, Liu J, Michael LE, Glick A et al. Sustained Hedgehog signaling is required for basal cell carcinoma proliferation and survival: conditional skin tumorigenesis recapitulates the hair growth cycle. *Genes Dev* 2005; 19: 214-23
 85. Hegde GV, Munger CM, Emanuel K, Joshi AD, Greiner TC, Weisenburger DD, Vose JM, Joshi SS. Targeting of sonic hedgehog-GLI signaling: a potential strategy to improve therapy for mantle cell lymphoma. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 1450-60
 86. Thiyagarajan S, Bhatia N, Reagan-Shaw S, Cozma D, Thomas-Tikhonenko A, Ahmad N, Spiegelman VS. Role of GLI2 transcription factor in growth and tumorigenicity of prostate cells. *Cancer Res* 2007; 67: 10642-6
 87. Bar EE, Chaudhry A, Farah MH, Eberhart CG. Hedgehog signaling promotes medulloblastoma survival via Bc/II. *Am J Pathol* 2007; 170: 347-55
 88. Yoo YA, Kang MH, Kim JS, Oh SC. Sonic hedgehog signaling promotes motility and invasiveness of gastric cancer cells through TGF-beta-mediated activation of the ALK5-Smad 3 pathway. *Carcinogenesis* 2008; 29: 480-90
 89. Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling pathway and gastric cancer. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 1050-4
 90. Vieira AR, Avila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Felix TM, Rahimov F, Harrington J, Schultz RR, Watanabe Y et al. Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS Genet* 2005; 1: e64
 91. Alatzoglou KS, Dattani MT. Genetic forms of hypopituitarism and their manifestation in the neonatal period. *Early Hum Dev* 2009; 85: 705-12
 92. Dattani MT, Martinez-Barbera JP, Thomas PQ, Brickman JM, Gupta R, Martensson IL, Toresson H, Fox M, Wales JK et al. Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nat Genet* 1998; 19: 125-33
 93. Diaczok D, Romero C, Zunich J, Marshall I, Radovick S. A novel dominant negative mutation of OTX2 associated with combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 4351-9
 94. Machinis K, Pantel J, Netchine I, Leger J, Camand OJ, Sobrier ML, Dastot-Le Moal F, Duquesnoy P, Abitbol M et al. Syndromic short stature in patients with a germline mutation in the LIM homeobox LHX4. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 961-8

95. Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L, Scott MP, Beachy PA. Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* 2000; 406: 1005-9
96. Vila G, Theodoropoulou M, Stalla J, Tonn JC, Losa M, Renner U, Stalla GK, Paez-Pereda M. Expression and function of sonic hedgehog pathway components in pituitary adenomas: evidence for a direct role in hormone secretion and cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6687-94
97. David D, Marques B, Ferreira C, Vieira P, Corona-Rivera A, Ferreira JC, van Bokhoven H. Characterization of two ectrodactyly-associated translocation breakpoints separated by 2.5 Mb on chromosome 2q14.1-q14.2. *Eur J Hum Genet* 2009; 17: 1024-33
98. Thomas PQ, Dattani MT, Brickman JM, McNay D, Warne G, Zacharin M, Cameron F, Hurst J, Woods K et al. Heterozygous HESX1 mutations associated with isolated congenital pituitary hypoplasia and septo-optic dysplasia. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 39-45
99. Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T et al. Heterozygous orthodenticle homeobox 2 mutations are associated with variable pituitary phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 756-64
100. Cohen MM, Jr. Hedgehog signaling update. *Am J Med Genet A* 2010; 152A: 1875-914
101. Solomon BD, Mercier S, Velez JI, Pineda-Alvarez DE, Wyllie A, Zhou N, Dubourg C, David V, Odent S et al. Analysis of genotype-phenotype correlations in human holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2010; 154C: 133-41
102. Gimelbrant A, Hutchinson JN, Thompson BR, Chess A. Widespread monoallelic expression on human autosomes. *Science* 2007; 318: 1136-40
103. Franca MM, Jorge AA, Carvalho LR, Costalonga EF, Otto AP, Correa FA, Mendonca BB, Arnhold IJ. Relatively High Frequency of Non-synonymous GLI2 Variants in Patients with Congenital Hypopituitarism without Holoprosencephaly. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012

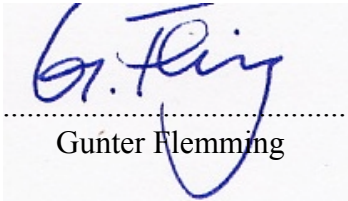
7. Anlagen

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.

16.04.2013

.....
Leipzig, den


.....
Günter Flemming

7.2 Lebenslauf

Name: Gunter Matthias Christian Flemming

Geburtsdatum: 26.02.1982

Geburtsort: Leipzig

Abitur

2000 Abitur am Carl-Goerdeler-Gymnasium Leipzig (Note 1,7)

Studium

08/2001-12/2007 Medizinstudium an der Universität Leipzig

08/2003 Ärztliche Vorprüfung (Note 2,66)

12/2007 Ärztliche Prüfung (Note 1,5)

Beruflicher Werdegang

Seit 07/2008 Assistenzarzt in Klinik für Kinder – und Jugendmedizin, Universität Leipzig

7.3 Publikationen und Auszeichnungen

7.3.1 Publikationen

1. Uhlig H, Flemming G, Spranger C. Chronische Bauchschmerzen bei Kindern. *Kinder- und Jugendmedizin* 2009; 9: 243-248
2. Flemming G, Möckel A, Mothes T, Uhlig H. Zöliakie und Lebererkrankung. *Kinder- und Jugendmedizin* 2009; 9: 215-217
3. Flemming G. Helicobacter-pylori -Infektion. *Kinder- und Jugendmedizin* 2011; 11: 271-276
4. Flemming GM, Petzold S, Meigen C, Korner A, Kiess W, Kratzsch J. Is circulating osteocalcin related to adipokines and overweight/obesity in children and adolescents? *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2012; 120: 383-7
5. Flemming G, Schlensog-Schuster F. Dystrophie im Säuglingsalter. *Kinder- und Jugendmedizin* 2012; 12: 147-154
6. Flemming G, Oberschmid B, Siebolts U, Hirsch W, Schuster V. Abdominal Tuberculosis in Children and Adolescents: to this Day a Diagnostic Challenge. *Klin Padiatr* 2012; 225: 47-49
7. Flemming GM, Klammt J, Ambler G, Bao Y, Blum WF, Cowell C, Donaghue K, Howard N, Kumar A, Sanchez J, Stobbe H, Pfäffle RW. Functional Characterization of a Heterozygous GLI2 Missense Mutation in Patients With Multiple Pituitary Hormone Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: E567-75.

7.3.1 Auszeichnungen

06/2008 ENDO (The Endocrine Society) -90th Annual Meeting, San Francisco

Oral Session: Functional Analysis of Novel GLI2-Mutations in Patients Suffering from Multiple Pituitary Hormone Deficiency(MPHD)

→Travel Grant Award

09/2008 ESPE (The European Society of Paediatric Endocrinology) -47th Annual Meeting, Istanbul

Poster: Functional Analysis of Novel GLI2-Mutations in Patients Suffering from Multiple Pituitary Hormone Deficiency(MPHD)

→Poster Award

7.4 Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Roland Pfäffle für die Vergabe des Promotionsthemas, für seine uneingeschränkte Unterstützung, das entgegengebrachte Vertrauen und die unvergleichliche Art als Mentor sowohl im Labor als auch jetzt in der Klinik stets für Fragen und zur Lösung von Problemen da zu sein.

Überaus dankbar bin ich Dr. Jürgen Klammt für seine freundschaftliche Art der Betreuung. Für all die Zeit und Mühen die er für dieses Projekt und meine Betreuung auf sich genommen hat. Für die Nerven die ich ihm gekostet habe. Ohne seine Hilfe, Unterstützung, Rat und Antrieb wäre diese Arbeit nicht denkbar gewesen.

Mein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Wieland Kiess für die stetige direkte und indirekte Unterstützung im Labor und in der Klinik.

Ich danke allen Koautorinnen und Koautoren für die verschiedenen Beiträge zur erfolgreichen Publikation der Ergebnisse, namentlich bei Prof. Dr. Werner Blum für die Mithilfe der Konzeption und all die hilfreichen Kommentare.

Mein allerherzlichster Dank gilt auch den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Forschungslabors der Universitätskinderklinik Leipzig. Ich danke für die freundschaftliche Art, die liebevolle Aufnahme und die stetige Unterstützung mit Rat und Tat und vor allem auch Humor: Heike Stobbe, Roy Tauscher, Maike Ziegler, Jutta Ullmann, Anja Moll, Anja Barnikol-Oettler, Antje Berthold, Antje Garten, Tassilo Kruis, Tillmann Wallborn, Luise Kobelt, Norman Händel, Anja Dietzel, Ines Koch.

Des Weiteren danke ich: Dr. E. Roessler und Dr. H. Sasaki für die Bereitstellung eines Teiles der Plasmide für die Cotransfektions-Studien.

Und besonders danke ich zudem allen Ärztinnen und Ärzten die am GeNeSIS-Programm teilnehmen und somit die Proben und klinischen Daten bereitstellen.