
Klinisches Erscheinungsbild und funktionelle
Charakterisierung eines Patienten mit einer heterozygoten
Exon 6 Deletion im IGF1R

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

eingereicht von:

Eva-Maria Sophia Harmel, geb. Radermacher

Geburtsdatum / Geburtsort:

04.05.1988 / Berlin

angefertigt an / in:

Universität Leipzig / Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche

Betreuer:

Dr. rer. nat. Jürgen Klammt

Prof. Dr. med. Wieland Kiess

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom 24.03.2015

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis.....	- 4 -
1	Bibliographische Beschreibung.....	- 7 -
1.1	Referat.....	- 7 -
2	Einleitung und Hintergrund.....	- 9 -
2.1	Das menschliche Wachstum.....	- 9 -
2.2	Das IGF-System als Regulator von Wachstum und Entwicklung.....	- 10 -
2.3	Der IGF1-Rezeptor.....	- 11 -
2.4	Formen des Kleinwuchses.....	- 12 -
2.5	IGF1R-Mutationen.....	- 13 -
2.6	SHOX-Defizienz.....	- 14 -
2.7	Der Nonsense-Mediated mRNA Decay.....	- 15 -
2.8	Alu-Elemente.....	- 16 -
2.9	Überleitung.....	- 17 -
4	Originalpublikation.....	- 18 -
5	Zusammenfassung der Arbeit.....	- 31 -
5.1	Patientenbeschreibung.....	- 32 -
5.2	Experimentelle Untersuchungen.....	- 33 -
5.3	Interpretation.....	- 35 -
5.4	Ausblick.....	- 37 -
6	Literaturverzeichnis.....	- 39 -
III	Curriculum vitae.....	- 50 -
IV	Danksagung.....	- 52 -

I Abkürzungsverzeichnis

AGA	<i>appropriate for gestational age</i>
AKT/PKB	Proteinkinase B
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BMI	<i>body mass index</i>
BNP (NPPB)	<i>brain natriuretic peptide</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
bp	Basenpaare
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
(c)DNA	<i>(complementary) deoxyribonucleic acid</i>
EJC	<i>exon junction complex</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FGFR3	<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>
(rh)GH	<i>(recombinant human) growth hormone/Wachstumshormon</i>
GHR	Wachstumshormon-Rezeptor
GLI2	<i>zinc finger protein GLI2</i>
IFB	Integriertes Forschungs- und Behandlungszentrum
(rh)IGF-1	<i>(recombinant human) insulin-like growth factor type 1</i>
IGF-2	<i>insulin-like growth factor type 2</i>
IGFALS	<i>IGF binding protein complex acid labile subunit</i>
IGFBP-3	<i>IGF binding protein 3</i>
IGF1R	IGF1-Rezeptor
INSR	Insulin-Rezeptor
kb	Kilobasenpaare
LHX4	<i>LIM homeobox 4</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
PAR1	Pseudoautosomale Region 1
(RT-)PCR	<i>(reverse transcription-) polymerase chain reaction</i>

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCNT	Pericentrin
PTC	<i>premature termination codon</i>
RIA	Radioimmunoassay
(m)RNA	<i>(messenger) ribonucleic acid</i>
SDS	<i>standard deviation score</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SGA	<i>small for gestational age</i>
SH3	<i>SRC homology 3 domain</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
STAT5B	<i>signal transducer and activator of transcription 5B</i>
SHOX	<i>short stature homeobox gene</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
WT	Wildtyp

1 Bibliographische Beschreibung

Eva-Maria Sophia Harmel, geb. Radermacher

Klinisches Erscheinungsbild und funktionelle Charakterisierung eines Patienten mit einer heterozygoten Exon 6 Deletion im IGF1R

Universität Leipzig, Dissertation

52 Seiten, 93 Literaturangaben, 1 Artikel mit 12 Seiten, 46 Literaturangaben und 5 Abbildungen

1.1 Referat

Vor dem Hintergrund, dass Kleinwuchs neben einer psychosozialen Belastung einen eigenen Krankheitswert darstellt, ist es ein Anliegen der Forschung, die verschiedenen Ursachen von Kleinwüchsigkeit zu untersuchen.

Im Mittelpunkt dabei steht die somatotrope Achse, über die das menschliche Wachstum maßgeblich reguliert wird. Verschiedene Formen der Wachstumsstörungen gehen auf Defekte in dem *growth hormone/ insulin-like growth factor 1* (GH/IGF1)-System zurück. Hierin liegt in vielen Fällen nicht nur das ursächliche Problem, sondern auch ein möglicher Ansatz zur Verbesserung der Wachstumsprognose von betroffenen Kindern. Inzwischen stehen rekombinant hergestellte Hormonsubstitutionspräparate für die Therapie von GH- oder IGF1-Mangel zur Verfügung und ermöglichen durchaus ein altersgerechtes Wachstum. Andere Wachstumsstörungen, wie eine durch Mutationen im IGF1-Rezeptor (IGF1R) ausgelöste IGF1-Resistenz, stellen nach wie vor eine Herausforderung dar, da für diese Form des Kleinwuchses bisher keine kausale Therapie existiert. Es ist zu hoffen, dass durch die systematischen, klinischen und molekularbiologischen Untersuchungen von IGF1R-Mutationsträgern mehr Erkenntnisse für einen Therapieansatz gewonnen werden.

Die vorliegende Arbeit widmet sich der klinischen Beschreibung und der molekularbiologischen Charakterisierung eines Patienten mit nicht-symptomatischem, proportioniertem Kleinwuchs. Im Genom des Patienten wurde eine bisher nicht beschriebene heterozygote IGF1R-Mutation identifiziert. Es handelt sich bei der Mutation um eine Deletion im *IGF1R*-Gen, die zwischen zwei hochkonservierten Alu-Sequenzen im Intron 5 und 6 liegt. In der Folge entsteht ein fehlerhaftes Transkript, welches kein Exon 6 trägt. Durch die Rasterverschiebung des offenen Leserahmens kommt es zur Einführung eines vorzeitigen Stopp-Codons und die mutierte mRNA wird abgebaut, sodass der Patient ausschließlich das IGF1R-Protein des Wildtypallels exprimiert.

Zudem wurde eine Variante im *short statured homeobox gene* (SHOX) des Patienten identifiziert, wobei ein Einfluss auf den Phänotyp aufgrund fehlender SHOX-assoziiierter Deformitäten als gering einzuschätzen ist. Eher ist es die partielle IGF1-Resistenz, hervorgerufen durch die verminderte Rezeptorzahl und die damit einhergehende herabgesetzte Rezeptoraktivierung, die dem Kleinwuchs des Patienten als pathologische Ursache zugrunde liegt. Somit weisen die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen molekularbiologischen Untersuchungen einen Kausalzusammenhang zwischen der Wachstumsstörung unseres Patienten und seiner IGF1R-Mutation auf.

2 Einleitung und Hintergrund

2.1 Das menschliche Wachstum

Auf welche Körpergröße ein Mensch heranwächst, wird durch ein Zusammenspiel von Genen, komplex interagierenden Wachstumsfaktoren und vielfältigen Einflüssen aus der Umwelt bedingt. Die endgültige Körpergröße kann sehr verschieden ausfallen, so misst der in der Literatur beschriebene kleinste Mensch 62,8 cm, der größte 251 cm (Durand and Rappold, 2013).

Das menschliche Wachstum verläuft nicht linear, sondern in Phasen. Es wird die intra-uterine von der infantilen, kindlichen und pubertären Wachstumsphase unterschieden (Muntau 2009). Der Größenzuwachs ist in Abhängigkeit von wachstumstimulierenden Hormonen unterschiedlich stark. Dem GH/IGF1-System kommt dabei eine Schlüsselrolle zu. Während IGF1 *in utero* essentiell für das Wachstum ist und hauptsächlich GH-unabhängig agiert, gewinnt GH erst nach der Geburt an Bedeutung, wo es zu einem Moduswechsel kommt, der die IGF1-Sekretion an die Präsenz von GH bindet (Dupont and Holzenberger, 2003; Rosenfeld, 2003). Erste Hinweise darauf lieferten Tiermodell-Experimente. So haben Mäuse mit einer GH-Defizienz ein normales Geburtsgewicht (Efstratiadis, 1998; Zhou et al., 1997), wohingegen Mäuse mit einem *IGF1-* oder *IGF1R-knockout* lediglich 60 beziehungsweise 45 Prozent des normalen Geburtsgewichtes auf die Waage bringen (Baker et al., 1993).

Binnen 40 Wochen wächst schließlich eine befruchtete Eizelle zu einem lebensfähigen Neugeborenen von durchschnittlich 46,1 bis 53,0 cm heran (WHO Child Growth Standards). In den ersten zwei Lebensjahren legt ein Kind dann in der Regel um 30 bis 35 cm an Größe zu. Hieran schließt sich eine Phase konstanten Wachstums mit 5 bis 7 cm pro Jahr an, die bis zum achten Lebensjahr anhält (Rogol et al., 2002). Schließlich kommt es in der Pubertät, die bekanntlich bei Mädchen etwas früher einsetzt, erneut zu einem beachtlichen Wachstumsschub. Durch den synergistischen Effekt der Sexual- und Wachstumshormone verdoppelt sich nun die Wachstumsgeschwindigkeit annähernd auf Spitzenwerte von 10,3 cm/Jahr (Jungen) oder 9,5 cm/Jahr (Mädchen) (Rogol, 2010).

Zur Geburt ist die Größe eines Kindes vor allem durch maternale Faktoren, wie die Ernährung und Gesundheit der Mutter oder die Funktion der Plazenta, bedingt (Saenger et

al., 2007). Im ersten Lebensmonat ist die Umwelt für die Wachstumsprognose von essentieller Bedeutung und schließlich scheint dann in den folgenden Jahren die Körpergröße vor allem durch das genetische Wachstumspotential eines jeden Individuums bestimmt zu sein (Touwslager et al., 2011). So beträgt der Korrelationskoeffizient zwischen der Geburtslänge und der endgültigen Größe lediglich 0,25, zwischen der Größe zum Zeitpunkt des zweiten Lebensjahres und der letztendlichen Körpergröße allerdings 0,80 (Tanner et al. 1956).

2.2 Das IGF-System als Regulator von Wachstum und Entwicklung

Das menschliche Wachstum wird maßgeblich über die somatotrope Achse gesteuert (Rosenfeld and Hwa, 2009). Mit der Entdeckung wachstumsstimulierender Substanzen durch Salmon und Daughaday *et al.* im Jahre 1957 wurde der Grundstein für die Erforschung des für das Wachstum bedeutsamen Regelkreises gelegt (Salmon & Daughaday 1957). Er besteht aus einer Abfolge von Hormonen, in welcher nachgeschaltete Wachstumsfaktoren über den negativen Feedback-Mechanismus eine Über- oder Unterstimulation verhindern.

Im Hypothalamus wird das *GH releasing hormone* (GHRH) gebildet, welches über das hypophysäre Portalvenensystem durch Bindung an spezifische Rezeptoren des Hypophysenvorderlappens zu einer pulsatilen Ausschüttung von GH führt. Neben GHRH fördern Ghrelin, Östrogen und Dopamin, sowie durch Insulin induzierte Hypoglykämien und proteinreiche Mahlzeiten die GH-Sekretion, wohingegen Somatostatin, IGF1, Hypoglykämien, Leptin und Glucokortikoide diese drosseln (Bideci and Camurdan, 2009; Goldenberg and Barkan, 2007). Das zirkulierende GH hat sowohl direkte als auch zahlreiche indirekte Effekte über das IGF1-Molekül (Butler and Roith, 2001). Beide Hormone nehmen auf den Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinmetabolismus Einfluss. GH vermittelt über GH-Rezeptoren sowohl die Zunahme des Körpergewichts und des longitudinalen Wachstums als auch die Synthese von IGF1. Etwa 75 Prozent des Serum-IGF1 werden GH-abhängig in den Hepatozyten synthetisiert und in den Blutkreislauf sezerniert. Der restliche Anteil stammt vor allem aus dem Knochen- und Knorpelgewebe sowie aus der Niere (Butler et al., 2002).

Die gewebsspezifische autokrine und parakrine IGF1-Sekretion ermöglicht es dem Körper, nicht nur systemischen sondern auch lokalen Wachstumsanforderungen gerecht zu werden. Schließlich bindet IGF1 an IGF1-Rezeptoren, die ubiquitär auf den Zellen des menschlichen

Organismus exprimiert werden. Über jene Rezeptoren vermittelt IGF1 Zellproliferation und -differenzierung und wirkt als starker Apoptoseinhibitor (Leroith et al., 1995). Damit bildet der IGF1R die Schnittstelle zwischen dem humoralen und intrazellulären System und ist an der Informationsweitergabe von zentral nach peripher beteiligt (Butler et al., 1998).

2.3 Der IGF1-Rezeptor

Der IGF1R gehört, wie der Insulin-Rezeptor und der *insulin receptor-related receptor*, zur Familie der Insulin-Rezeptoren, die eine membranständige Tyrosinkinase-Aktivität besitzen. Das auf dem Chromosom 15 (15q26.3) lokalisierte *IGF1R*-Gen (*IGF1R*, MIM 147370) wird in eine mRNA umgeschrieben, die aus 21 Exons besteht und in ein Protein aus 1367 Aminosäuren translatiert wird.

Im Rahmen der co- und posttranslationalen Modifikation wird der Prorezeptor in einen heterotetrameren Rezeptor überführt und erhält seine endgültige Konfiguration, indem das 30 Aminosäuren lange Signalpeptid im endoplasmatischen Retikulum abgespalten und das Protein mit Glykosylierungen und Disulfidbrücken stabilisiert wird. Nach der Zerlegung durch die Furinprotease im Trans-Golgi-Netzwerk ist der Rezeptor fertiggestellt: er besteht aus zwei Hemirezeptoren, je aus einer α - und β -Kette, die über Disulfidbrücken verbunden sind (Adams et al., 2000).

Die in den Extrazellulärraum ausgerichteten α -Ketten tragen cysteinreiche Ligandenbindungsstellen, die mit einer hohen Affinität ($\sim 10^{-10}$ M) den Liganden IGF1 und IGF2 und mit einer wesentlich schwächeren ($\sim 10^{-8}$ M) Insulin binden (Werner et al., 2008). Die β -Untereinheiten weisen zusätzlich einen zytoplasmatischen und einen hydrophoben, transmembranösen Teil auf. Die ins Zellinnere reichenden β -Ketten beherbergen die katalytische Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität. Bei Bindung von IGF1 an die α -Untereinheiten des IGF1-Rezeptors wird durch Reorganisation und Autophosphorylierung der β -Ketten eine Signalkaskade initiiert. Rezeptor-assoziierte Signalmoleküle, wie das Insulin-Rezeptor-Substrat oder *SHC transforming protein* werden an den Rezeptor gebunden und durch Phosphorylierung aktiviert. Sie geben das Signal weiter an nachgeschaltete Proteine. Eine Schlüsselrolle kommt der Proteinkinase B (PKB/AKT) und der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) zu, da über sie die wichtigsten Signalwege des IGF1-Rezeptors ablaufen, die für die Regulation von Zellproliferation, Differenzierung und Inhibition der Apoptose relevant sind (Marte and Downward, 1997; Pearson, 2001).

2.4 Formen des Kleinwuchses

Der Wachstumsprozess eines Kindes wird anhand von anthropometrischen, populationsspezifischen Perzentilenkurven evaluiert. Gemeinhin gilt, dass eine Abweichung von mehr als zwei Standardabweichungen (-2 SDS; z-score) von der durchschnittlichen alters- und geschlechtsspezifischen Körpergröße als Kleinwuchs zu bewerten ist (Clayton et al., 2007). Zur Abklärung einer Wachstumsstörung müssen mehrere Befunde erhoben werden, aus denen sich in der Zusammenschau die Diagnose ableiten lässt. Von Bedeutung für die Diagnostik sind die Eigen-, Familien- und Medikamentenanamnese, die Ermittlung der familiären Zielgröße ($[\text{Vatergröße} + \text{Muttergröße} \pm 13 \text{ cm}]/2$, (Ranke, 1996)) und Wachstumsgeschwindigkeit, die körperliche Untersuchung und Skeletalterbestimmung, sowie laborchemische Untersuchungen und endokrinologische Funktionstestungen (Wit et al., 2008).

Es gibt viele Ursachen, wieso ein Kind sein Wachstumspotential nicht voll ausschöpfen kann und Kleinwuchs entwickelt. Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal ist, ob die Wachstumsverzögerung bereits intrauterin vorlag oder sich erst postnatal entwickelte. Etwa 5 Prozent aller reifen Neugeborenen kommen mit einem Geburtsgewicht oder einer Geburtslänge unter der dritten Perzentile (ca. -2 SDS) auf die Welt. Die meisten dieser Kinder mit sogenanntem *small for gestational age* (SGA)-Phänotyp zeigen innerhalb der ersten zwei Lebensjahre ein kompensatorisches Aufholwachstum, sodass nur etwa 10 Prozent von diesen Kindern kleinwüchsig bleiben (Lee et al. 2014).

Bei manifestiertem, isoliertem Kleinwuchs gilt es weitere Differenzierungen zu machen. Diagnostisch hilfreiche Parameter sind das Knochenalter und die Wachstumsgeschwindigkeit. Im Normalfall erfolgt die Skelettreifung parallel zum Längenwachstum. Weicht das biologische deutlich von dem chronologischen Alter ab, handelt es sich möglicherweise um eine konstitutionelle Wachstums- und Entwicklungsverzögerung (Allen and Cuttler, 2013). Dies ist neben dem genetisch bedingten familiären Kleinwuchs die häufigste Form von Wachstumsabweichungen und ist als Normvariante zu werten. Falls die Wachstumsgeschwindigkeit, bezogen auf das biologische Alter, zusätzlich erniedrigt ist, könnte eine endokrinologische Störung, eine Mangel- oder Fehlernährung, eine chronische Krankheit oder ein Stoffwechseldefekt vorliegen (Allen and Cuttler, 2013). In äußerst seltenen Fällen ist eine psychosoziale Deprivation ursächlich für die Wachstumsretardierung eines Kindes.

Zur Abklärung genetischer Ursachen empfehlen Wit *et al.* folgenden Algorithmus: Ist der Kleinwuchs syndromal oder disproportioniert, sollte genetische Diagnostik entsprechend der pathognomonischen Zeichen erfolgen. Handelt es sich um eine isolierte, proportionierte Wachstumsretardierung, ist eine genetische Untersuchung der somatotropen Achse möglicherweise hilfreich. Bei eutroph zur Welt gekommenen Kindern mit einer postnatalen Wachstumsverzögerung sollte eine Defizienz oder Resistenz von *Growth Hormone* ausgeschlossen werden. War ein Kind mit Kleinwuchs bereits zur Geburt SGA, sollte untersucht werden, ob die Ursache in Veränderungen des *IGF1*-, *IGFALS*-, *IGF2*- oder *IGF1R*-Gens liegt (Wit et al., 2011). Seit 2008 werden genetische Aberrationen in der somatotropen Achse mit der jeweiligen Kasuistik in eine Datenbank eingespeist, um das Wissen dieser Gruppe von Wachstumsstörungen zu bündeln (Rosenfeld and von Stein, 2013).

Bei Patienten mit disproportioniertem Kleinwuchs kommen Skelettdysplasien, Gen- oder Chromosomenaberrationen in Betracht. Beispielsweise kann eine Mutation im *SHOX*-Gen als Kleinwuchs mit Mesomelie, Cubitus valgus oder veränderten Verhältnissen von Armspannweite und Sitzhöhe zur Körpergröße, imponieren (Binder, 2011). Kann keine eindeutige Ursache für den Kleinwuchs eines Kindes festgestellt werden, bleibt als Ausschlussdiagnose der Idiopathische Kleinwuchs.

2.5 *IGF1R*-Mutationen

Abuzzahab *et al.* veröffentlichten 2003 die erste Charakterisierung zweier funktionell relevanter *IGF1R*-Mutationen (Abuzzahab et al., 2003). Seither wurden weitere 16 Patienten mit Mutationen im *IGF1R* molekulargenetisch untersucht und die jeweiligen pathologischen Mechanismen, die zu der Wachstumsverzögerung führen, erforscht (Choi et al. 2011; Ester et al. 2009; Fang et al. 2009; Fang et al. 2012, Gannagé-Yared et al. 2013; Inagaki et al. 2007; Kawashima et al. 2005; Kawashima et al. 2012; Kawashima et al. 2013; Kruis et al. 2010, Labarta et al. 2013; Leal et al. 2012; Raile et al. 2006; Walenkamp et al. 2006; Walenkamp et al. 2008; Wallborn et al. 2010).

Je nach Art und Lokalisation der Mutation ist eine leichte Funktionseinschränkung des Rezeptors bis zu einem kompletten Funktionsverlust die Folge. Gemeinsam ist ihnen, dass durch eine *IGF1*-Resistenz das Wachstum verzögert ist. Trotz normaler oder erhöhter *IGF1*-Spiegel kommt es zu einer Wachstumsverzögerung, da das humorale Signal nicht adäquat in

das Zellinnere weitergeleitet wird. So sind Mutationen beschrieben, die durch Veränderung der DNA-Sequenz eine schwächere Ligandenbindung, gestörte Rezeptorreorganisation, verminderte Tyrosinkinase-Aktivität, vorzeitige Termination der Translation, veränderte posttranskriptionale Prozessierung, einen fehlerhaften Proteintransport oder einen vorzeitigen Abbau der mRNA zur Folge haben (Klammt et al., 2011). Neben dem Kleinwuchs präsentieren einige Mutationsträger weitere Stigmata, wie leichte bis starke mentale Retardierung, eine mäßige statomotorische Entwicklungsverzögerung oder dezente Dysmorphiezeichen. Darüberhinaus präsentieren manche Patienten mit partieller IGF1-Resistenz eine milde gestörte Glukose-Toleranz (Raile et al., 2006; Walenkamp et al., 2006) oder eine verspätet einsetzende Menarche (Walenkamp et al., 2006).

2.6 *SHOX*-Defizienz

Eine Mutation im Transkriptionsfaktor *SHOX* (*short stature homeobox*, MIM 312865) wird in 1,1 Prozent (Rao et al., 1997) bis 15 Prozent (Huber et al., 2006) bei Patienten mit idiopathischem Kleinwuchs festgestellt. Das *SHOX*-Gen befindet sich in der pseudo-autosomalen Region (PAR1) des X- und Y-Chromosoms. Gene dieser Region unterliegen nicht dem Mechanismus der X-Inaktivierung. Beide Allele müssen für eine regelrechte Funktion exprimiert werden. Sind eine oder beide Kopien des *SHOX*-Gens verändert, werden mit einer großen phänotypischen Variabilität vor allem Veränderungen im Skelett sichtbar (Clement-Jones et al., 2000). Neben Kleinwuchs präsentieren einige Patienten eine Mesomelie der Extremitäten, eine Madelung-Deformität des Handgelenks und einen Cubitus valgus im Rahmen der Léri-Weill- Dyschondrosteose (Marchini et al., 2007a). Die Skelettveränderungen und der Kleinwuchs von Turner-Syndrom-Patienten gehen auf den Verlust einer *SHOX*-Kopie (X0) zurück (Blaschke et al., 2003).

Das *SHOX*-Gen codiert für einen Transkriptionsfaktor, der in mehreren Isoformen vorliegt, aber zum größten Anteil in den Isoformen SHOXa und SHOXb, welche durch alternatives Splicing des Exon 6 generiert werden (Rao et al., 1997). Sowohl SHOXa als auch SHOXb sind aktiv, doch dadurch, dass die Transaktivierungs-Domäne bei SHOXb fehlt, geht man davon aus, dass es die Funktion von SHOXa moduliert (Rao et al., 2001). Das durch Phosphorylierung aktivierte SHOX reguliert Gene, die an der Ossifikation und der embryonalen Entwicklung der Extremitäten beteiligt sind. So wurden Interaktionen mit dem natriuretischen Peptid Typ B (BNP/NPPB) und dem *fibroblast growth factor receptor 3*

(FGFR3), jeweils Schlüsselproteine für die Knochenbildung, beschrieben (Decker et al., 2011; Marchini et al., 2006, 2007b).

Rappold et al. haben einen SHOX-Score zur Identifizierung von Patienten mit einer potentiellen SHOX-Mutation entwickelt. Hierin fließen das Verhältnis von Armspannweite zur Körpergröße (<96,5 %), die Relation von Sitzhöhe und Körpergröße (>55,5 %), der BMI (>50. Perzentile), das Vorhandensein eines Cubitus valgus, eines verkürzten Unterarms, einer verstärkten Krümmung des Unterarms, einer Dislokation der Ulna am Ellenbogen und Muskelhypertrophie ein (Rappold et al., 2007).

2.7 Der Nonsense-Mediated mRNA Decay

Zahlreiche Kontrollschritte stellen sicher, dass die in der DNA verschlüsselte Information des Erbguts korrekt umgesetzt wird. Sie überwachen die Transkription, Prozessierung von mRNA und anschließende Translation in ein Protein, dessen co- und posttranslationale Modifikation und schließlich die Degradation der mRNA oder Proteolyse. Der *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) ist ein bedeutender Qualitätssicherungsmechanismus, der verhindert, dass aus mutierter mRNA ein fehlerhaftes und damit potentiell toxisches Protein entsteht. Durch ihn wird mRNA eliminiert, die ein vorzeitiges Stoppkodon/ *premature termination codon* (PTC) in sich birgt (Maquat and Gong, 2009).

Die exakte Funktionsweise des NMD-Mechanismus ist noch nicht vollends aufgeklärt, sodass mehrere Erklärungsmodelle parallel existieren (Bhuvanagiri et al., 2010). Bei dem *exon junction complex* (EJC)-Modell geht man von Folgendem aus: Während des Spleißens werden die Exon-Exon-Grenzen auf der mRNA mit Proteinkomplexen (EJC) markiert. Vor dem eigentlichen Translationsprozess passiert die mRNA das Ribosom in einer sogenannten *pioneer round*, die ein mögliches vorzeitiges Stoppkodon offenlegt. Liegt ein Stoppcodon etwa 25 bis 30 Nukleotide *upstream* von dem letzten EJC bzw. 50 bis 55 von der eigentlichen Exon-Exon-Grenze entfernt, handelt es sich um ein vorzeitiges Stoppcodon, was die Aktivierung sämtlicher Terminierungsfaktoren nach sich zieht. Mehrere Proteine, im einem Komplex namens SURF organisiert, interagieren mit dem auf das PTC folgenden EJC und weitere Faktoren werden rekrutiert, sodass die mRNA vorzeitig abgebaut wird (Maquat and Gong, 2009; Nicholson et al., 2010).

Es wird angenommen, dass der NMD nicht nur bei pathologisch veränderter mRNA regulativ eingreift, sondern auch für eine maßvolle Expression von physiologischer mRNA von großer Bedeutung ist. So reguliert der NMD beispielweise die Expression von mRNA, die durch alternatives Speißen generiert wurde (Jaillon et al., 2008). Ein weiteres Beispiel ist, dass der NMD einen wichtigen Beitrag für ein abwehrstarkes Immunsystem leistet, indem er nur die Expression funktionstüchtiger Immunglobuline und T-Zell-Rezeptoren zulässt, aber die bis zu zwei Dritteln PTC-tragenden, funktionslosen mRNA-Moleküle eliminiert (Holbrook et al., 2004).

2.8 Alu-Elemente

Das Humangenom besteht aus zwei Prozent Protein-codierender, etwa 20 Prozent ausschließlich RNA-codierender Gene und aus über 50 Prozent repetitiver, nicht codierender Sequenzen (Hofmann 2006). Die Alu-Familie ist mit etwa einer Million Kopien im Genom die größte Gruppe der repetitiven Elemente (Smit, 1996). Aufgrund ihrer Länge von nur 300 Basenpaaren werden sie zu den *short interspersed elements* (SINEs) gezählt. Ihr Name leitet sich von der Restriktionsendonuklease Alu I ab, die im Jahre 1978 zur Entdeckung dieser DNA-Sequenz geführt hat (Houck et al. 1979).

Die frühere Annahme, dass die Alu-Elemente zur sogenannten „junk“-DNA gehören, ist mittlerweile widerlegt. Es hat sich gezeigt, dass diese Gruppe einen erheblichen Beitrag zur Evolution geleistet hat. Bis zum heutigen Tag werden neue Alu-Elemente in das menschliche Genom eingefügt und tragen zur wachsenden Diversität bei. Allerdings geschieht dies mit abnehmender Tendenz, mittlerweile findet nur noch jede zweihundertste Geburt eine neue Alu-Insertion statt. (Batzer and Deininger, 2002). Da die Gruppe der Alu-Elemente sich durch eine starke Homogenität auszeichnet, sie für das Genom von Primaten spezifisch ist und einige Sequenzen exklusiv für das menschliche Genom sind, eignen sie sich als Marker für die Erforschung der Evolution (Roy-Engel et al., 2001). Alu-Elemente sind ebenfalls von großer Bedeutung bei der Translation bezüglich alternativen Spleißens, des A-zu-I-RNA-Editing und der Bindung von Transkriptionsfaktoren (Häsler et al., 2007).

Eine zufällige Alu-Insertion oder -Rekombination kann allerdings auch eine Pathologie hervorrufen. Eine Insertion kann beispielsweise die Transkription oder die Promotoraktivität eines Gens verändern oder in einer kodierenden Region eine *frameshift*-Mutationen verursachen. Etwa 0,1 Prozent aller genetischen Erkrankungen, wie beispielsweise die

Neurofibromatose, Hämophilie oder familiärer Brustkrebs, werden auf so einen Hergang zurückgeführt (Deininger and Batzer, 1999). Die homologe Alu-Rekombination wird mit 0,3 Prozent der Erbkrankheiten wie beispielsweise die familiäre Hypercholesterinämie und Thalassämie, das Tay-Sachs- oder Lesch-Nyhan-Syndrom in Zusammenhang gebracht (Batzer and Deininger, 2002; Deininger and Batzer, 1999).

2.9 Überleitung

Das Forschungslabor der Universitätskinderklinik Leipzig hat unter anderem als Forschungsschwerpunkt die Diagnostik und die Erforschung funktioneller Zusammenhänge von IGF1R-Mutationen und Kleinwuchs.

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit erfolgte die Charakterisierung einer neu identifizierten IGF1R-Mutation eines Patienten mit Wachstumsretardierung. Durch eine Sequenzanalyse wurde die Mutation im *IGF1R*-Gen identifiziert. Experimentell konnte gezeigt werden, dass es infolge der Mutation zu einem Aminosäureaustausch kommt, der durch Generierung eines Stopcodons zu einem vorzeitigen Kettenabbruch und Abbau während der Translation führt. Die IGF1R-Mutation geht auf einen Rekombinations-Defekt verursacht durch zwei homologe Alu-Sequenzen, die das Exon 6 flankieren, zurück. Von besonderem Interesse war in der vorliegenden Arbeit die zellbiologische Funktion des IGF1R und des nachgeschalteten Signalweges im Vergleich von Patientenfibroblasten zu gesunden Kontrollfibroblasten. Zusätzlich wurde eine SHOX-Variante (p.Met240Ile) im Genom des Patienten beschrieben. Der Einfluss auf den Phänotyp des Patienten und eine mögliche Interaktion mit der IGF1R-Mutation wurde diskutiert.

Die folgende Arbeit möchte zum besseren Verständnis des Phänotyps des Patienten und des Krankheitsbildes bei Kindern mit IGF1R-Mutationen beitragen.

4 Originalpublikation

HORMONE
RESEARCH IN
PÆDIATRICSHorm Res Paediatr
DOI: 10.1159/000355410Received: April 1, 2013
Accepted: August 5, 2013
Published online: November 26, 2013

Alu-Mediated Recombination Defect in IGF1R: Haploinsufficiency in a Patient with Short Stature

Eva-Maria Harmel^a Gerhard Binder^b Anja Barnikol-Oettler^a Janina Calibe^c
Wieland Kiess^a Monique Losekoot^e Michael B. Ranke^b Gudrun A. Rappold^d
Marina Schlicke^a Heike Stobbe^a Jan M. Wit^f Roland Pfäffle^a Jürgen Klammt^a

^aUniversity Hospital for Children and Adolescents, Centre for Paediatric Research, Leipzig, ^bUniversity Children's Hospital, University Hospital Tübingen, Tübingen, ^cSLK Hospitals, Children's Hospital, Heilbronn, and ^dDepartment of Molecular Human Genetics, Ruprecht-Karls-University, Heidelberg, Germany; Departments of ^eClinical Genetics and ^fPediatrics, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

Key Words

Short stature · Insulin-like growth factor receptor type 1 · Mutation · Insulin-like growth factor resistance · Nonsense-mediated mRNA decay · Short stature homeobox gene

Abstract

Background: The insulin-like growth factor (IGF) receptor (IGF1R) is essential for normal development and growth. IGF1R mutations cause IGF-1 resistance resulting in intra-uterine and postnatal growth failure. The phenotypic spectrum related to IGF1R mutations remains to be fully understood. **Methods:** Auxological and endocrinological data of a patient identified previously were assessed. The patient's fibroblasts were studied to characterize the IGF1R deletion, mRNA fate, protein expression and signalling capabilities. **Results:** The boy, who carries a heterozygous *IGF1R* exon 6 deletion caused by Alu element-mediated recombination and a heterozygous *SHOX* variant (p.Met240Ile), was born appropriate for gestational age but developed proportionate short stature postnatally. IGF-1 levels were low-normal. None of the stigmata associated with *SHOX* deficiency or sporadically observed in IGF1R mutation carriers were pres-

ent. Nonsense-mediated mRNA decay led to a substantial decline of IGF1R dosage and IGF-1-dependent receptor autophosphorylation but not impaired downstream signalling.

Conclusion: We present the first detailed report of an intra-genic *IGF1R* deletion identified in a patient who, apart from short stature, deviates from all established markers that qualify a growth-retarded child for IGF1R analysis. Although such children will usually escape routine clinical mutation screenings, they can contribute to the understanding of factors and mechanisms that cooperate with the IGF1R.

© 2013 S. Karger AG, Basel

Introduction

Longitudinal growth is regulated by the tightly regulated interplay of a vast network of humoral and cellular molecules and thus represents a typical polygenic trait. A plethora of genetic and environmental influences diversify the human final height, ranging from 62.8 to 251 cm at the world's extremes [1]. Consequently, various genetic disturbances are described which lead to growth impairment such as mutations within genes of the somatotrophic axis that play a pivotal role in growth regulation

KARGER

© 2013 S. Karger AG, Basel
1663-2818/13/0000-0000\$38.00/0E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/hrpJürgen Klammt
University Hospital for Children and Adolescents
Liebigstraße 21
DE-04103 Leipzig (Germany)
E-Mail Juergen.Klammt@medizin.uni-leipzig.de

[2]. Basically, pre- and/or postnatal growth retardation is defined as height of ≤ -2 standard deviation score (SDS) below the gender- and age-corrected mean height. Ethnicity, population and secular trends may also be taken into account. Genome-wide association studies and the cumulative success gained in unravelling the monogenetic aetiology of severe growth disorders have led to models which suggest that much of the heritability for normal human stature is caused by variants of small-to-moderate effect, whereas growth deficits resulting in short stature at the extremes of the height spectrum are caused by rare, high-penetrance mendelian mutations [3, 4].

Among the genes of the somatotrophic axis that have been identified as leading to growth retardation if mutated, aberrant alleles of the insulin-like growth factor (IGF) receptor type 1 (*IGF1R*, MIM 147370) manifest as intrauterine growth restriction resulting in neonates born too small for their gestational age (SGA) who do not catch up on growth during infancy and childhood and typically present with non-syndromic proportionate short stature. Reports of around a dozen patients carrying *IGF1R* point mutations or small deletions or insertions have been published since 2003 of which some presented with minor comorbidities such as moderate mental retardation and developmental delay, impaired glucose homeostasis or mild facial dysmorphism [5–7]. Moreover, large deletions of chromosome 15q26, including the *IGF1R* locus, have been described whose carriers – depending on size and position of the deletion – may show additional complications [8]. Most of the patients bearing aberrant *IGF1R* alleles are heterozygous (or hemizygous) carriers of loss-of-function (loss of allele) mutations that demonstrate a compromised cellular response to IGF-1 in patients' fibroblasts or reconstitution experiments. Hypomorphic *IGF1R* mutations with residual activity have been shown to result in a more severe phenotype if occurring as compound heterozygotes [9] or homozygotes [7]. Some were also suggested to exert a moderate effect on stature if occurring as rare variants in the general population [10].

The *IGF1R* is a heterotetrameric ($\alpha_2\beta_2$) transmembrane glycoprotein with an intrinsic kinase moiety [11]. After high-affinity binding of IGF-1 or IGF-2 conformational changes lead to stimulation of the kinase activity, resulting in autophosphorylation, substrate recruitment and activation of signalling pathways of which the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the AKT pathways are regarded as most important [12].

In contrast to the rare reports of *IGF1R* mutations so far, the frequency of mutations or deletions affecting the transcription factor *SHOX* (*short stature homeobox*; MIM

312865) ranges from 1.1% [13] to 15% [14] in patients classified as idiopathic short stature. Phenotypic variability in *SHOX*-deficient patients is high and may include, in addition to the frequently disproportionate short stature, mesomelic shortening of the limbs, Madelung deformity and cubitus valgus presenting as Léry-Weill dyschondrosteosis. Furthermore, skeletal abnormalities and short stature in Turner syndrome are associated with the loss of *SHOX* [15]. The *SHOX* gene resides within the pseudoautosomal region (PAR1) of the sex chromosomes and genes within this region escape X-inactivation. Both copies are necessary for proper *SHOX* function and, as suggested for the *IGF1R*, severity of the height deficit depends on the *SHOX* gene dose since patients with biallelic loss of the *SHOX* gene (referred to as Langer mesomelic dysplasia) are shorter and more severely affected than those retaining one functional allele.

The *SHOX* gene encodes for a paired-like homeodomain nuclear protein transcribed as two major isoforms generated by alternative splicing of the last exon 6 [13]. Both *SHOXa* and *SHOXb* are transcriptionally active but *SHOXb* lacks the transactivation domain and has been predicted to modulate the function of *SHOXa* [16]. Serine phosphorylation turns the *SHOX* protein into an active state facilitating efficient regulation of genes involved in ossification and limb development such as the natriuretic peptide BNP (NPPB) and the fibroblast growth factor receptor *FGFR3* [17–19].

Here, we present for the first time a detailed clinical and molecular characterization of a patient who carries an intragenic *IGF1R* deletion. The boy, who in addition bears an unclassified *SHOX* variant, was identified within the framework of a genetic screening study on short stature [20] that, due to the study design, allowed his inclusion despite his phenotypic manifestations being atypical compared to *IGF1R* mutation carriers reported so far.

Patients and Methods

Index Case

The patient has been followed for short stature since the age of 6.2 years at the Paediatric Department, University Hospital Tübingen, Germany. The boy was included in a mutational screening project comprising the genes for *IGF1*, *IGF1R* and *SHOX* because his phenotypic characteristics matched the primary inclusion criterion of a scoring system for *IGF1R* analysis applied by the authors (birth weight or length below -1 SDS [20]). A heterozygous *IGF1R* deletion along with a heterozygous *SHOX* variant was identified (see below). Informed consent for all analysis was obtained from the parents. All investigations were performed after the approval of the Ethical Committees of the participating institutions.

Serum levels of IGF-1 and IGFBP-3 were measured by in-house RIAs as described by Blum et al. [21]. During the observation period of 20 years these two RIAs were not changed. The mean inter- and intra-assay variation coefficients of the IGF-1 and the IGFBP-3 assays were 9 and 7% and 10 and 6%, respectively. Data were transformed into age-related SDS values on the basis of a reference population of healthy German and Danish children with normal height [21].

Genetic Analyses

Initial genetic evaluation of the patient's *IGF1R* and *SHOX* genes is described by Caliebe et al. [20]. Briefly, the heterozygous exon 6 deletion within the *IGF1R* was identified by multiplex ligation-dependent probe amplification and the heterozygous *SHOX* variant was revealed by direct sequencing. To determine the exon 6 *IGF1R* deletion breakpoints, we purified DNA from dermal fibroblasts using QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Long-range PCR using Expand Long Range dNTPack Polymerase (Roche, Basel, Switzerland) was performed employing oligonucleotides AF (5'-cttaccacgaagtggacacag-3') and AR (5'-tgtcaacaagaatggcatcacc-3') (Biomers, Ulm, Germany) as primers located upstream of exon 5 and downstream of exon 7, respectively. Following gel purification (QIAquick PCR Purification Kit; QIAGEN) of a PCR product of approximately 7 kb, which is substantially smaller than the molecular weight of 12,048 bp expected from the wild-type allele, restriction endonuclease digestion using *EcoRV* and *XcmI* (New England BioLabs, Ipswich, Mass., USA) was performed to narrow down the deletion sites. Subsequently, the purified PCR product encompassing the suspected boundaries of the *IGF1R* deletion was re-amplified by nested PCR using Hot-StarTaq DNA Polymerase (QIAGEN) and primers BF (5'-tgggaatgaggggaactcttg-3') and BR (5'-tgaaccgaggtggaggttac-3') (Biomers). Due to the presence of extensive oligo(dT) stretches direct sequencing of the PCR product failed; therefore it was cloned into pGEM[®]-T Vector (Promega, Madison, Wisc., USA) by T/A ligation. After bacterial transformation and plasmid purification (PureYield Plasmid Miniprep System; Promega) the inserted *IGF1R* DNA was directly sequenced using T7 and SP6 primers (located at the vector backbone at either side of the insert) and the BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, Calif., USA). For mapping of the deletion breakpoints *IGF1R* GenBank entry NT_010274 served as reference. Mutational nomenclature refers to GenBank accession NM_000875 and UniProtKB accession P08069.

To determine *IGF1R* mRNA fate, total RNA was purified from fibroblasts using the RNeasy Kit (QIAGEN) followed by reverse transcription into cDNA according to the recommendations of the manufacturer (SuperScript III First-Strand Synthesis System; Life Technologies, Paisley, UK). In a subsequent PCR amplification 1 µl of reverse transcription reaction was applied using primers 5'-atgccttggtctcctgtcc-3' and 5'-gcatcctgccatcatactc-3' (Biomers) complementary to sequences in exon 5 and exon 8 of the *IGF1R*, respectively.

Cell Culture

Fibroblasts of patient and mother obtained from forearm skin biopsy were cultured at 37°C under humidified conditions with 5% CO₂ in DMEM:F12 (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% FCS, 1% glutamine and penicillin/streptomycin (PAA Laboratories, Pasching, Austria). Age- and sex-matched control

fibroblasts (CP, patient's control; CM, mother's control) were maintained under conditions as described for the patients. For 3 independent experiments we used comparable cell passages (patient 17;15;15 and control 16;17;18, respectively; mother 16;18;20 and control 17;18;19, respectively). For nonsense-mediated decay (NMD) assay fibroblasts were rinsed once with PBS and incubated for 4 h in medium containing 100 µg/ml cycloheximide in dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, Mich., USA) or containing DMSO as vehicle control.

IGF-1 Stimulation, Immunoblotting and ELISA

IGF1R protein expression as well as IGF-1-dependent phosphorylation of the IGF1R and the downstream signalling protein AKT were measured by immunoblotting using the antibodies anti-phospho-Tyr^{1135/1136}-IGF1Rβ #3024, anti-IGF1Rβ #3027, anti-phospho-Ser⁴⁷³-Akt #9271, anti-Akt #9272 (New England BioLabs) and an anti-β-actin antibody (Sigma-Aldrich) as loading control. Patient and control fibroblasts were seeded into 175-cm² flasks in culture medium. After cells were grown to subconfluence, they were rinsed once with Hank's Balanced Salt Solution (Lonza) and starved in a serum-free medium supplemented with 0.2% BSA (Bovine Albumin Fraction V Solution; Life Technologies). The next day, fibroblasts were incubated for 15 min with fresh serum-free medium/0.2% BSA just before stimulation with graded amounts of recombinant human IGF-1 from 0 to 20 nM for 15 min (rhIGF-1; Biozol, Eching, Germany). Fibroblasts were washed and harvested in ice-cold PBS supplemented with 50 mM NaF (Sigma-Aldrich) followed by lysate preparation and immunodetection as described previously [22].

For ELISA assays protein lysates were basically prepared from fibroblasts as described for immunoblotting experiments but using the PathScan[®] Cell Growth Multi-Target Sandwich ELISA (Cell Signalling Technology, Danvers, Mass., USA) specific lysis buffer. Equivalent protein concentrations were assayed by the DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif., USA). Subsequently, we followed the protocol provided by the ELISA manufacturer. Absorbance was measured at 450 nm with FLUOstar Optima (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany).

Statistical Analyses

For densitometric analysis of specific protein bands we used ImageJ software (NIH). Plotting and statistics were performed with GraphPad Prism 4.0 software (GraphPad Software, La Jolla, Calif., USA) applying the two-tailed unpaired Student's t test.

Results

Case Report

The 6.2-year-old male patient was presented for paediatric endocrine evaluation due to severe short stature that had evolved during infancy and childhood. The patient was born appropriate for gestational age (AGA) to healthy non-consanguineous Caucasian parents after 40 weeks of an uneventful pregnancy: birth length 49 cm (-0.92 SDS), birth weight 2,880 g (-1.64 SDS) and head circumference -0.36 SDS were in the low-normal range.

Fig. 1. Patient's characteristics. **a** Growth chart: solid lines display the 97th, 50th and 3rd percentile. Patient's target height calculated from parents' height is shown as shaded grey area and his calculated final height is indicated with a black bar; the father's and mother's final height are labelled with a grey triangle and a white square, respectively. The patient's bone age in relation to his actual height at a given age is shown by a black diamond. **b** Pedigree of the index case and his family. Asterisks indicate individuals for whom genetic analyses of IGF1R and SHOX genes were performed. The index patient is marked by an arrow. Black symbols highlight subjects carrying the IGF1R deletion, grey shaded symbols indicate carriers of the SHOX mutation. Last reported or final height (SDS) is specified below the symbols.

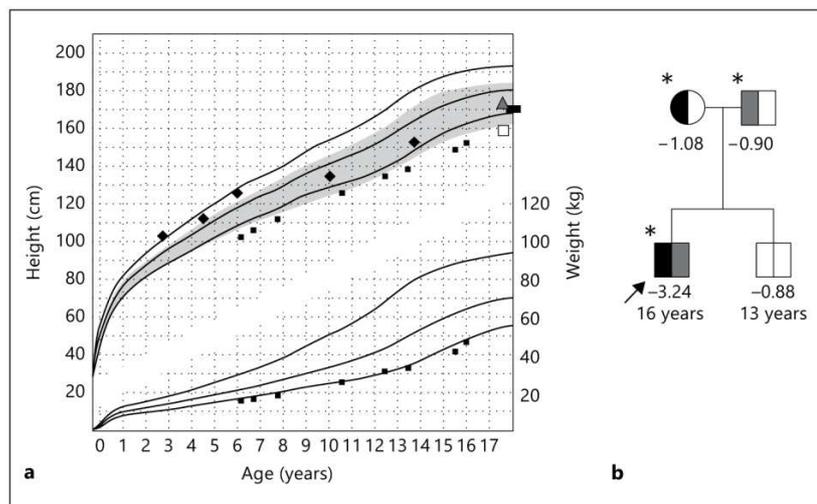


Table 1. Endocrine parameters of the patient

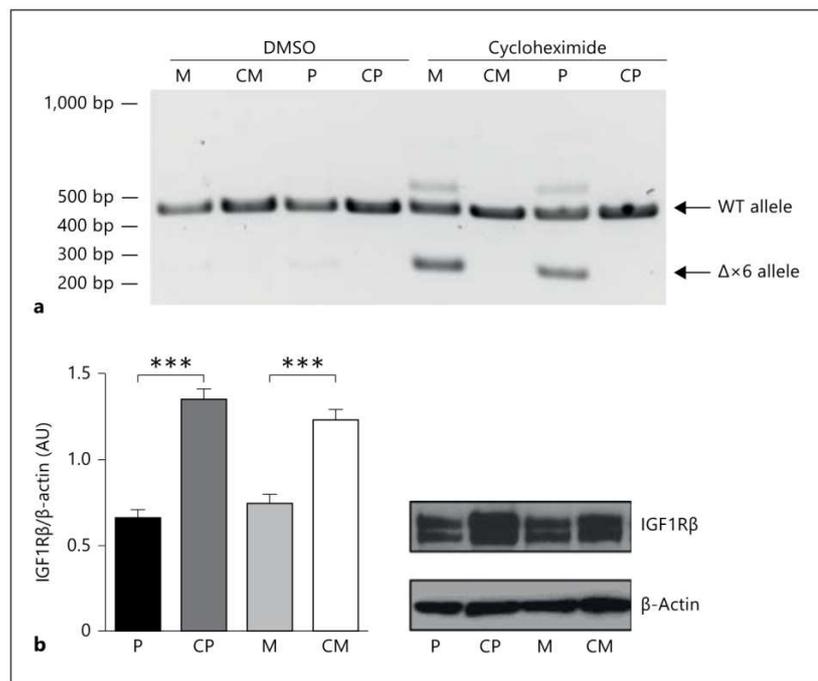
Age, years	6.15	12.44	14.62	15.51	16.02
Bone age GP ¹ , years	2.7	9.5	–	–	13.0
Tanner, genital	–	I	II	III	IV
Tanner, pubic hair	–	I	I	II–III	II–III
Testes (left/right), ml	–	2.5/2.0	5.0/6.0	7.0	10.0
IGF-1, ng/ml (SDS)	128 (–0.13)	211 (–0.67)	286 (–0.06)	351 (0.54)	353 (0.64)
IGFBP-3, ng/ml (SDS)	2,887 (–0.76)	2,965 (–1.28)	2,893 (–1.39)	3,294 (–0.91)	2,818 (–1.46)
fT4, pmol/l	–	13	–	12	11
TSH, mU/l	–	2.4	–	1.5	2.2
LH, IU/l	–	0.2	–	0.5	0.6
FSH, IU/l	–	0.6	–	0.9	0.9
Testosterone, ng/ml	–	–	–	45	106
DHEAS, ng/ml	–	377	–	1,157	901

¹ Greulich and Pyle.

The Apgar score was 10/10, and during the patient's perinatal period, infancy and early childhood no illness was reported besides an allergic rhinitis. Since birth, the patient's growth had been poor and height deviated increasingly from the mean corrected for age (fig. 1a). At initial presentation the 6.2-year-old boy had a height of 102.5 cm (–3.30 SDS), a weight of 15.9 kg (–2.61 SDS) and a head circumference of 49.8 cm (–1.84 SDS). At the age of 9 the patient's height was –2.94 SDS with a head circumference of –1.88 SDS and a weight of –2.39 SDS. BMI (–0.12 SDS), sitting height to height ratio (0.523; –0.93 SDS), and arm span to height ratio (1.00) were in the normal range. Radiological examination of the hand revealed

a bone age retarded by 3 years according to Greulich and Pyle's male standards. However, radiological abnormalities and dysmorphic signs typically observed in SHOX haploinsufficient patients were absent. He performed well in secondary school. Laboratory examination did not unveil any pathological findings: thyroid function as well as adrenal androgens were normal (table 1). IGF-1 and IGFBP-3 levels determined at several occasions were within the normal to low-normal range, suggesting that the patient's GH release and function was unimpaired. Thus, at the time of diagnosis GH stimulation tests had been assumed to be of limited clinical value and therefore were not performed. Onset of puberty was delayed (G2P1

Fig. 2. NMD of mutant IGF1R mRNA results in reduced receptor protein dosage. M = Mother; P = patient; WT = wild-type. **a** PCR amplification of reverse-transcribed IGF1R mRNAs isolated from fibroblast cultures pretreated with DMSO or cycloheximide for 4 h. In heterozygous mutation carriers, mother and patient, aberrant cDNA band appears only if NMD is blocked by cycloheximide. The respective controls (CP, CM) show only the wild-type IGF1R cDNA band. **b** Immunoblot and densitometric quantification. IGF1R protein expression was confirmed by immunoblotting as described in Patients and Methods. Due to NMD, IGF1R protein is expressed only from the wild-type allele in fibroblast of mutation carriers. Data are shown as means \pm SEM calculated from 3 independent experiments. *** $p < 0.001$.



at the age of 14.6 years; table 1). Because he showed no evidence of any other stigmata or clinical manifestations suggestive of a growth-related disease or a particular growth failure syndrome the diagnosis of idiopathic short stature was made. His younger brother's growth was normal, measuring 154 cm (-0.88 SDS) at the age of 13.3 years. The proband's mother was born at term, with birth length of -0.51 SDS and birth weight of -1.16 SDS. Her head circumference was not available. The mother at present has a height of 158.2 cm (-1.08 SDS), a weight of -0.2 SDS and a BMI of -0.34 SDS. Birth data of the father were not available. He reached a final height of 171.5 cm (-0.9 SDS) with a BMI of 0.33 SDS (fig. 1b).

Genetic Analyses

As reported by Caliebe et al. [20] a heterozygous IGF1R exon 6 deletion was identified in the patient, which was inherited from his mother. IGF1 sequencing was without finding as was SNP array analysis. We confirmed the heterozygous IGF1R exon 6 deletion by agarose gel electrophoresis and direct sequencing of the RT-PCR product generated from patient fibroblast's mRNA (fig. 2a and data not shown). Mapping of the deletion breakpoints using genomic DNA was performed as described in Patients and Methods (fig. 3a). Direct se-

quencing of the resulting, cloned PCR product disclosed that the deletion comprises 5,211 bp in total (c.1247+4448_1462+380del). Deletion breakpoints are localized within poly(dA) stretches belonging to homologous AluY and AluSx1 elements in intron 5 and intron 6, respectively, that show an overall identity of 80% (URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (fig. 3a, b). The IGF1R exon 6 deletion is deduced to result in a frame shift with introduction of a premature termination codon (PTC) at the first codon after the exon 5–exon 7 fusion site at position 417 (p.Asn417X). SHOX sequencing revealed an additional variant (c.720G>A) in exon 6a (isoform SHOXa, GenBank accession NM_000451) that was also found in the patient's father. This nucleotide transition has not been reported previously (SHOX database, www.shox.uni-hd.de; dbSNP, through UCSC genome browser, <http://genome.ucsc.edu/>; 1,000 Genomes, <http://www.1000genomes.org/>; Exome Sequencing Project, <http://evs.gs.washington.edu/EVS/> – all accessed February 2013) nor was it found in 200 control chromosomes [20]. Substitution of the ATG codon to ATA is considered to result in the replacement of the highly conserved methionine at position 240 by isoleucine (p.Met240Ile). The conservative exchange affects a residue that resides N-terminal of the putative SH3-binding

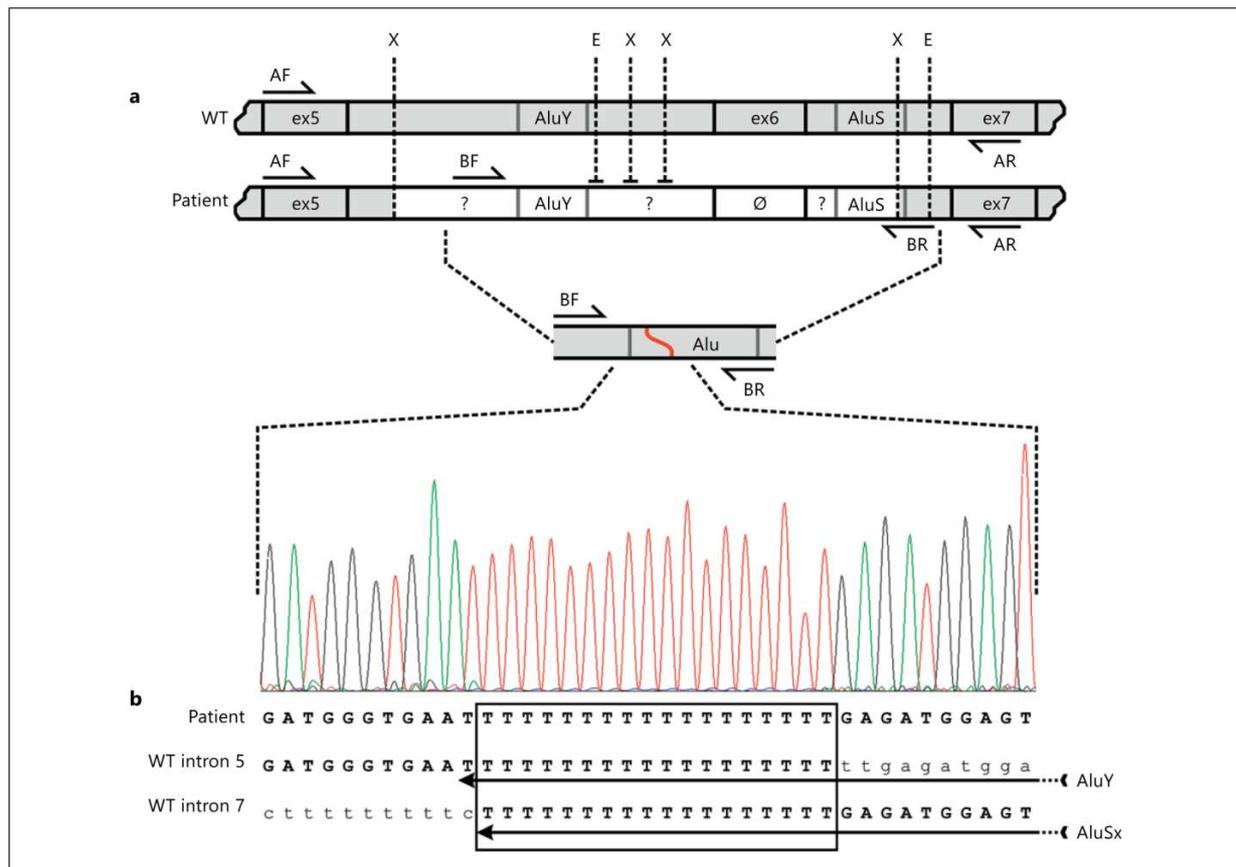


Fig. 3. Overview of the heterozygous IGF1R exon 6 deletion. WT = Wild-type; ex5 = exon 5; ex7 = exon 7. **a** Schematic depiction of the IGF1R locus (exon 5–exon 7, not drawn to scale) and the strategy applied to identify the deletion boundaries. A detailed description is given in Patients and Methods. AF, AR and BF, BR: primer binding sites; X, E: restriction enzyme recognition sites for XcmI

and EcoRV, respectively; AluY, AluS: Alu elements AluY and AluSx1, respectively. **b** Electropherogram of the IGF1R deletion fusion site (black frame) obtained by direct sequencing of the BF/BR PCR fragment cloned into pGEM[®]-T vector. Orientation of the Alu elements on the (–) strand is indicated by arrows.

domain separated by one amino acid. However, PolyPhen-2 and SIFT online tools (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>; <http://sift.jcvi.org/> – both accessed February 2013) predict p.Met240Ile to be tolerated.

Mutant IGF1R mRNA Decay Results in IGF1R Haploinsufficiency

To investigate if the frame shift and introduction of a PTC induced by the loss of exon 6 results in NMD, we analysed IGF1R mRNA from fibroblasts of the patient, his mother and matched controls. In untreated fibroblasts from mutation carriers or controls, only mRNA of the wild-type IGF1R allele was unveiled by RT-PCR

(fig. 2a). When cells were incubated with cycloheximide, a translation inhibitor blocking the NMD pathway, mutant mRNA was detectable in the patient's and mother's fibroblasts, suggesting that primary mRNAs are transcribed from both the mutant and the wild-type allele but the mutated transcript becomes degraded due to NMD (fig. 2a). Consistent with the mutant mRNA decay a truncated IGF1R protein (calculated molecular weight 46.5 kDa) could not be detected by Western blotting using an antibody directed against the N-terminus of the IGF1R α -subunit (data not shown). Expression of the IGF1R only from the wild-type allele was paralleled by a substantial reduction in IGF1R protein concentration (fig. 2b).

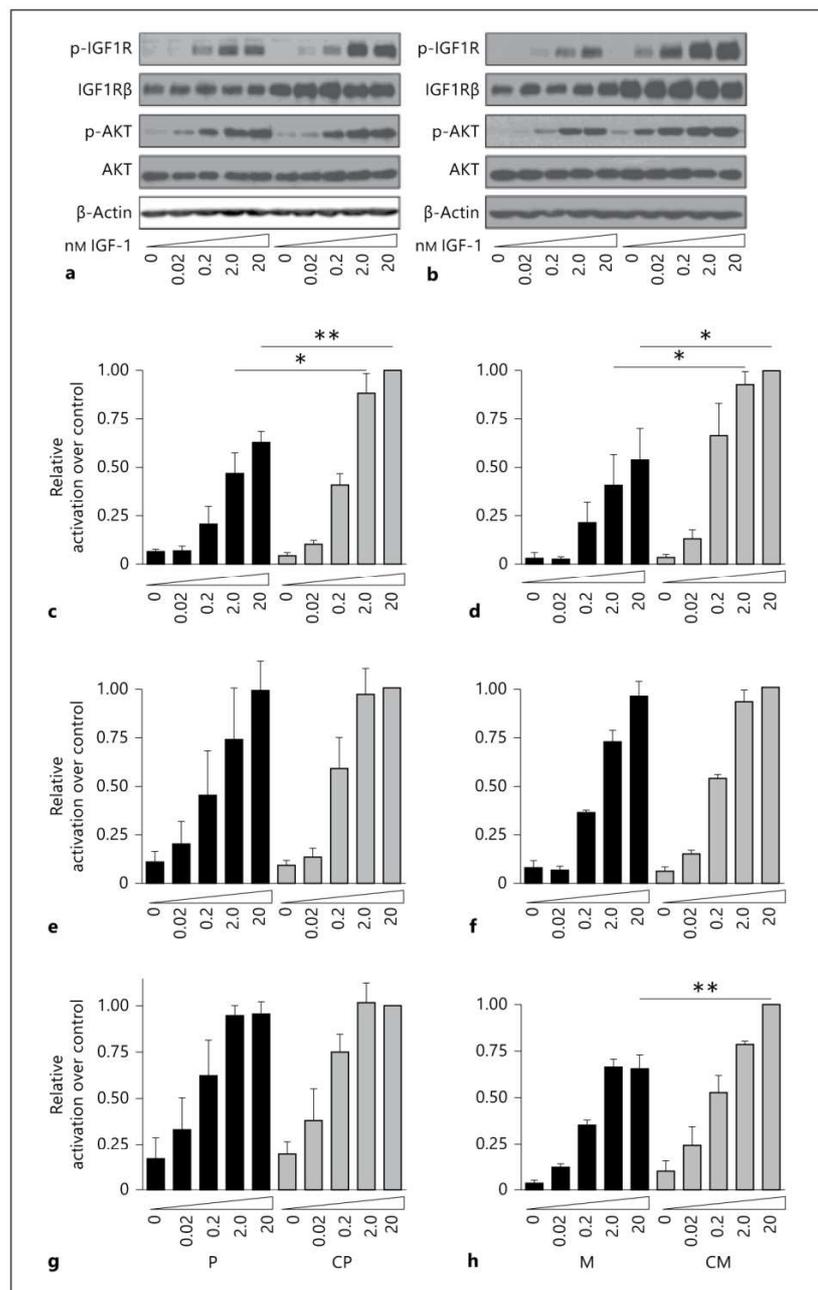


Fig. 4. IGF-1-dependent IGF1R autophosphorylation and downstream signalling in fibroblasts. P = Patient; M = mother. **a, b** The immunoblots shown are representative for 3 independent experiments. Cells were stimulated with increasing concentrations of rhIGF-1 as indicated. After blotting total protein lysates of the patient, the mother and the respective controls (CP, CM) immunoblots were incubated with antibodies specific for the phosphorylated Tyr1135/1136-IGF1R β , IGF1R β , phosphorylated Ser473-AKT, AKT and β -actin. **c-f** Densitometric quantification of IGF1R phosphorylation normalized to the total protein using β -actin as loading control (**c, d**) or normalized to IGF1R β (**e, f**). Results (mean \pm SEM) are presented as relative activation compared to control fibroblasts at 20 nM IGF-1 that were set to 1. **g, h** Densitometric quantification of AKT phosphorylation in response to IGF-1 stimulation. Densitometric values were normalized to total levels of AKT and the p-AKT/AKT ratios at 20 nM IGF-1 of CP and CM were set to 1. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

IGF1R Activation and Signalling

To study whether or not the reduced IGF1R dosage in our patient modifies IGF1R signalling, IGF-1 dose-dependent activation of IGF1R and of downstream pathway molecules was investigated (fig. 4a, b). Immu-

noblotting following IGF-1 stimulation revealed a substantial decrease of total IGF1R autophosphorylation in fibroblasts of mutation carriers compared to wild-type controls (fig. 4c, d). As expected, when receptor phosphorylation was normalized to IGF1R content, muta-

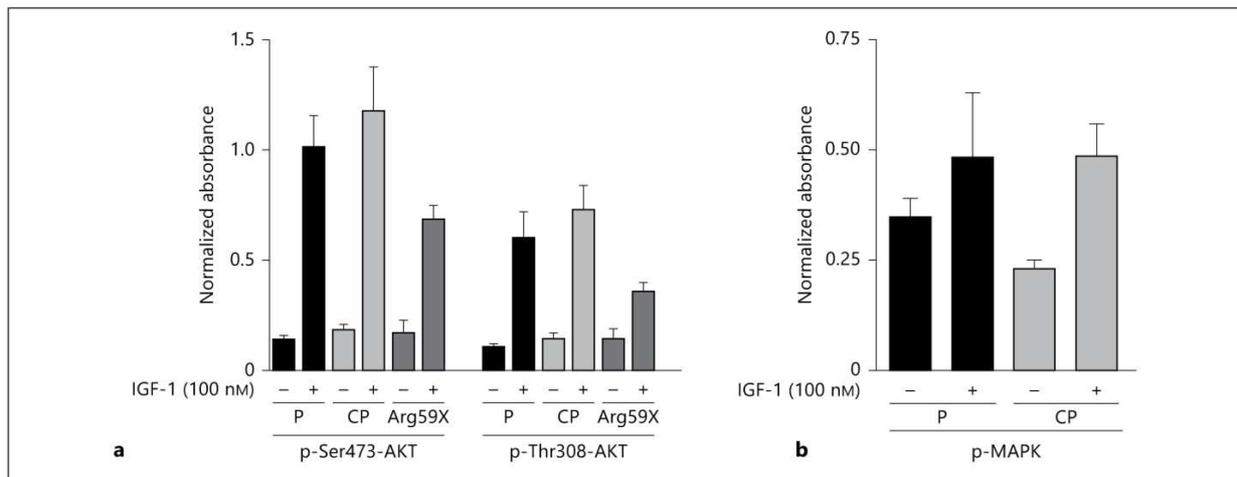


Fig. 5. a Confirmation of AKT Western blotting results by ELISA. After stimulation with 0 or 100 nM IGF-1 for 15 min, whole protein lysates from fibroblasts were incubated with specific antibodies for phospho-AKT as indicated. Cell lysates of the haploinsufficient p.Arg59X patient [23] served as control for impaired AKT activation. The absorbance data measured at 450 nm of 2 independent experiments (mean \pm SEM) were normalized to total AKT1 expres-

sion. **b** ELISA evaluation of MAPK pathway in patient and control fibroblasts after incubation with specific antibodies [capture: phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204); detection: p44/42 MAPK]. Absorbance data measured at 450 nm were normalized to total AKT1 expression. Data (mean \pm SEM) of 2 independent experiments are shown.

tion carrier fibroblasts did not differ from controls, suggesting unchanged biochemical characteristics of membrane-bound receptors (fig. 4e, f). Consistently, activation of Ser⁴⁷³-AKT, a major effector within the IGF1R pathway, was significantly reduced in the mother's fibroblasts compared to the wild-type control (fig. 4h). Surprisingly, IGF-1-dependent AKT phosphorylation was not impaired in fibroblasts of the patient compared to the wild-type control (fig. 4g). Failure to demonstrate any significant derogation of AKT activation by immunoblotting was validated by ELISA, making use of antibodies that detect the phosphorylation state of both residues (Ser⁴⁷³ and Thr³⁰⁸) that are known targets for AKT activation (fig. 5a). AKT phosphorylation in control fibroblasts of a previously reported patient bearing a haploinsufficient IGF1R mutation (p.Arg59X [23]) was diminished as expected. Determination of p44/42 MAPK (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) phosphorylation by ELISA confirmed the results of the AKT ELISA in that no difference was observed between patient and control fibroblasts (fig. 5b). Thus, in vitro the patient's lowered IGF1R dose attenuates total IGF1R phosphorylation but the IGF-1 response seems to be sufficient for achieving similar AKT and MAPK activation levels to those observed in wild-type control cells.

Discussion

In this study, we report on a patient with isolated and proportionate short stature carrying a combined heterozygous *IGF1R* mutation and an unclassified *SHOX* variant. The patient's postnatal short stature ranging from -2.45 to -3.38 SDS is associated with partial insensitivity to IGF-1 resulting from the decreased IGF1R dosage. *IGF1R* exon 6 deletion introduces a PTC at the first codon within exon 7, which is deduced to result in a truncated protein (p.Asn417X) if translation of the aberrant allele occurs. Since this hypothetical protein lacks not only the transmembrane but also the L2-FnIII1-FnIII2 domain (the latter of which is known to harbour major determinants for IGF binding), it is not likely that the mutant IGF1R remnant enters the circulation and there exerts potentially harmful effects by IGF-binding protein-like properties [24].

Mapping of the deletion disclosed the breakpoints to be located within the poly(A) tracts of two highly homologues Alu elements belonging to the AluY (intron 5) and AluX (intron 6) subfamilies arranged in the same orientation on the minus strand (relative to the chromosome and *IGF1R* gene). Inter-Alu subfamily mode of unequal recombination has been found to be a major mechanism

contributing to primate evolution and human genome diversity, but the present study also provides further evidence that the highly repetitive Alu elements constitute a hotspot for pathogenic recombination events as the underlying mechanism for a significant portion of genetic diseases [25, 26].

Analyses of fibroblasts of the patient and his mother, who transmitted the mutation to her son, revealed the absence of a truncated IGF1R protein. The resulting reduction of detectable IGF1R by nearly 50% is caused by the elimination of the aberrant *IGF1R* allele through the NMD pathway, which ensures mRNA quality by down-regulating PTC-containing mRNAs to protect cells from the accumulation of potentially toxic peptides [27]. NMD as the underlying aetiological mechanism with a profound effect on IGF1R dosage has been described previously in 1 family carrying a small duplication in exon 18 of the *IGF1R* (c.3348_3366dup19) [28]. In vitro analyses to examine the IGF-1 signalling capabilities in fibroblasts of these patients demonstrated a more than 2-fold reduction in AKT phosphorylation. Impaired AKT activation has been confirmed by additional reports of IGF1R mutations resulting in a PTC [29, 30]. In contrast, in our family only fibroblasts of the mother and only at the highest IGF-1 concentration (but not of the index patient) showed a significantly reduced IGF-1-dependent AKT response compared to wild-type cells, despite a significant decrease of total IGF1R expression and activation in both individuals. Whether this seemingly unimpaired part of the IGF-1-dependent signalling pathway accounts for the only slightly reduced length and weight at birth remains an interesting point to be clarified.

Such a lack of concordance between genetic findings and the otherwise consistently observed impairment of the cellular in vitro IGF-1 response (nonsense, missense, frame-shift IGF1R mutations [31]) has been frequently reported for patients with hemizygous IGF1R expression due to 15q26→qter deletions [32–35]. The higher variability observed in distinct in vitro assays in carriers of large 15q26 chromosomal aberrations has been attributed to the fibroblasts being a suboptimal model system [33]. The loss of neighbouring gene loci in these contiguous gene syndromes may also contribute to the varying molecular and cell physiological manifestations. However, in the 15q deletion syndromes results from in vitro investigations cannot be easily reconciled with the phenotypic manifestations of the patients. In contrast, in our proband failure to detect profound disturbances in the downstream signalling response is at least in part associated with a milder expression of specific phenotypic fea-

tures typically observed in haploinsufficient IGF1R mutation carriers. Particularly, the boy was not born SGA albeit his birth weight was in the lower part of the normal range (−1.64 SDS). Moreover, none of the clinical manifestations observed sporadically in carriers of IGF1R mutations such as developmental delay, moderate mental impairment or mild facial dysmorphisms were noticed in our patient. However, we were not able to demonstrate which pathways that mediate the IGF-1 growth stimulus in the developing skeleton were disturbed in our patient and eventually led to the apparent short stature. Tissue-specific activation modes of the AKT isoforms and/or disturbances within additional pathways may provide an explanation, although we did not detect any substantial change in MAP kinase activation. Since MAPK activation is extraordinarily time dependent we cannot completely exclude that subtle differences in the time course of MAPK phosphorylation exist between patient and control cells that do not become obvious under the conditions tested. Similarly, S6 ribosomal protein (a target of the mTOR pathway) phosphorylation was unchanged (data not shown).

Phenotypic heterogeneity among IGF1R mutation carriers has been reported previously to some extent, also with respect to the auxological birth parameters. Kruis et al. ([36] and unpublished data) described a girl born AGA that fell below the −2.0 SDS threshold within the first 3 weeks after birth, which is similar to a patient reported by Kawashima et al. [37]. However, the apparent variability among IGF1R patients, i.e. birth length or weight smaller or greater than −2.0 SDS, is the reflection of the fact that IGF1R haploinsufficiency manifests as retarded intrauterine growth in a continuum around the arbitrary −2.0 SDS threshold rather than a unequivocal difference as is implied by the terms AGA or SGA.

Heterogeneity in the extent of growth-related parameters in IGF1R haploinsufficient patients is likely to be influenced by the genetic background encoding for hormonal and non-hormonal factors acting on the growth plate of the bones. Among the latter the SHOX transcription factor causes, if mutated, distinct conditions of short stature including isolated, proportionate short stature [38]. Whether the novel p.Met240Ile variant identified in the index patient potentially contributes to the profound postnatal growth retardation remains to be elucidated by experimental means. In silico analysis and genotyping in unaffected individuals did not give conclusive hints. The marked growth deficit of the patient, who after initial presentation at the age of 6 years grew constantly at a height of about −3.0 SDS, always remained below the calculated

parent-specific lower height limit of -2.34 SDS [39]. Such a non-familial growth retardation might point to intergenic compound heterozygosity in which the SHOX variant might act synergistically with the IGF1R deletion to provoke the substantial growth deficit in the child but not in the father and the mother, who might bear either variant on a more favourable genetic background. Digenic or oligogenic inheritance patterns in the context of growth deficits have been recently suggested in a patient with IGF-1 deficiency due to a combined *STAT5B* and *IGFALS* mutation, although definite final evidence for the pathogenicity of either variant is lacking [40, 41]. In contrast, the phenotype of a girl with a combined pericentrin (*PCNT*) and *IGF1R* mutation was shown to be merely attributable to the compound pericentrin mutations [42], emphasizing the need for thorough genetic and molecular evaluation.

In addition to the uncertain functional relevance of the p.Met240Ile amino acid substitution, the patient does not reach any point in the scoring system developed by Rappold et al. [38] to identify patients with SHOX mutations. Again, heterogeneity is common to SHOX mutation carriers [43]. Even within 1 family, phenotype of the members can vary and male subjects tend to have less pronounced manifestations of SHOX characteristics than females [44].

The overlapping expression pattern of IGF1R and SHOX and the fact that both proteins have been shown to be critically involved in cell cycle control and apoptosis in the growth plate [14, 45, 46] inevitably requires crosstalk between SHOX and IGF1R pathways to warrant the balance between proliferation, differentiation and maturation within the epiphysis during endochondral ossification. Preliminary studies in U2OS osteosarcoma cells overexpressing SHOX support our hypothesis that the IGF1R signalling system and the SHOX pathway might interact (data not shown).

The identification of an IGF1R mutation that completely silences one allele in a patient who does not meet the paediatric criteria of intrauterine growth restriction and the increasingly recognized general variability in growth parameters of IGF1R mutation carriers raises once more the question about the frequency of IGF1R loss-of-function mutations in the general population. As inferred from the available data (patients and their adult relatives), it appears likely that heterozygous IGF1R mutations – even if they result in a loss of function – manifest with high but incomplete penetrance with respect to pre- and postnatal growth. However, like other heterozygous variants in numerous developmental genes that are detri-

mental to growth control (e.g. *INSR*, *LHX4*, *SHOX*, *GH*, *GHR*, *GLI2* and others) and manifest with incomplete penetrance, an intermediate-to-large effect can be assumed (effect size in epidemiological/statistical terms). Therefore, it appears advisable to regard them as pathogenic in a given patient even if their expressivity is alleviated in related or unrelated carriers of the same or a comparable mutation due to the action of modifier genes (or a favourable environment). Although final evidence is lacking for most of these genes an in-depth diagnostic work-up is advisable, not least because most of these variants are expected to be perinatally lethal or to cause disease with a poor prognosis if occurring in a homozygous state.

In summary, we report on a novel loss-of-function mutation within the *IGF1R* combined with an unspecified SHOX variant identified in a patient with less pronounced intrauterine growth retardation but persistent and proportionate short stature that had developed postnatally. Phosphorylation studies performed in the patient's fibroblasts mirrored only in part the apparent IGF-1 resistance and underlines the heterogeneity found in IGF1R haploinsufficient patients not only in the clinical manifestations but also at the molecular level. Whether the SHOX variant contributes to the molecular and phenotypic characteristics of the patient remains elusive.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Leipzig University Medical Centre, IFB Adiposity Diseases, BMBF (FKZ: 01EO1001 to E.M.H.), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Bonn, Germany; project PF 225/3 to J.K., W.K. and R.P.) and an unrestricted research grant from Pfizer to J.M.W.

Disclosure Statement

W.K. has been contracted by or received research funding from Pfizer, Serono, Novo Nordisk and Ipsen. He has participated in advisory committees/research panels for Pfizer and Novo Nordisk. He has received consulting fees/honoraria from Pfizer and Novo Nordisk. J.M.W. has served on an advisory boards for Tercica, Ipsen, Pfizer, Prolor, Teva and Biopartners, and has received speaker honoraria from Pfizer, Lilly, Ipsen and Ferring. R.P. has been contracted by or received research funding from Genesis DNA Lab and Eli Lilly. He has acted as a speaker/teacher for Serono and Eli Lilly. He has participated in advisory committees/research panels for Eli Lilly. He has been an investigator for sponsored clinical trials by Pfizer and Serono. He has received consulting fees/honoraria from Eli Lilly, Serono and Pfizer. E.M.H., G.B., A.B.-O., J.C., M.L., M.B.R., G.A.R., M.S. and J.K. have nothing to disclose.

References

- Durand C, Rappold GA: Height matters – from monogenic disorders to normal variation. *Nat Rev Endocrinol* 2013;9:171–177.
- Wit JM, Kiess W, Mullis P: Genetic evaluation of short stature. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25:1–17.
- Gibson G: Rare and common variants: twenty arguments. *Nat Rev Genet* 2011;13:135–145.
- Kemper KE, Visscher PM, Goddard ME: Genetic architecture of body size in mammals. *Genome Biol* 2012;13:244.
- Pfäffle R, Kiess W, Klammt J: Downstream insulin-like growth factor. *Endocr Dev* 2012;23:42–51.
- Labarta JJ, Barrio E, Audi L, Fernandez-Cancio M, Andaluz P, de Arriba A, Puga B, Calvo MT, Mayayo E, Carrascosa A, Ferrandez-Longas A: Familial short stature and intrauterine growth retardation associated with a novel mutation in the IGF-1 receptor (IGF1R) gene. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013;78:255–262.
- Gannage-Yared MH, Klammt J, Chouery E, Corbani S, Megarbane H, Abou GJ, Choucair N, Pfäffle R, Megarbane A: Homozygous mutation of the IGF1 receptor gene in a patient with severe pre- and postnatal growth failure and congenital malformations. *Eur J Endocrinol* 2013;168:K1–K7.
- Rudaks LI, Nicholl JK, Bratkovic D, Barnett CP: Short stature due to 15q26 microdeletion involving IGF1R: report of an additional case and review of the literature. *Am J Med Genet* 2011;155:3139–3143.
- Fang P, Cho YH, Derr MA, Rosenfeld RG, Hwa V, Cowell CT: Severe short stature caused by novel compound heterozygous mutations of the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R). *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:E243–E247.
- Kansra AR, Dolan LM, Martin LJ, Deka R, Chernausek SD: IGF receptor gene variants in normal adolescents: effect on stature. *Eur J Endocrinol* 2012;167:777–781.
- LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr: Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 1995;16:143–163.
- Laviola L, Natalicchio A, Giorgino F: The IGF-1 signaling pathway. *Curr Pharm Des* 2007;13:663–669.
- Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, Muroya K, Binder G, Kirsch S, Winkelmann M, Nordsiek G, Heinrich U, Breuning MH, Ranke MB, Rosenthal A, Ogata T, Rappold GA: Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet* 1997;16:54–63.
- Huber C, Rosilio M, Munnich A, Cormier-Daire V: French SHOX GeNeSIS Module. High incidence of SHOX anomalies in individuals with short stature. *J Med Genet* 2006;43:735–739.
- Marchini A, Rappold G, Schneider KU: SHOX at a glance: from gene to protein. *Arch Physiol Biochem* 2007;113:116–123.
- Rao E, Blaschke RJ, Marchini A, Niesler B, Burnett M, Rappold GA: The Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX encodes a cell-type specific transcriptional activator. *Hum Mol Genet* 2001;10:3083–3091.
- Marchini A, Daeffler L, Marttila T, Schneider KU, Blaschke RJ, Schnölzer M, Rommelaere J, Rappold G: Phosphorylation on Ser106 modulates the cellular functions of the SHOX homeodomain protein. *J Mol Biol* 2006;355:590–603.
- Marchini A, Hacker B, Marttila T, Hesse V, Emons J, Weiss B, Karperien M, Rappold G: BNP is a transcriptional target of the short stature homeobox gene SHOX. *Hum Mol Genet* 2007;16:3081–3087.
- Decker E, Durand C, Bender S, Rodelsperger C, Glaser A, Hecht J, Schneider KU, Rappold G: FGFR3 is a target of the homeobox transcription factor SHOX in limb development. *Hum Mol Genet* 2011;20:1524–1535.
- Caliebe J, Broekman S, Boogaard M, Bosch CA, Ruivenkamp CA, Oostdijk W, Kant SG, Binder G, Ranke MB, Wit JM, Losekoot M: IGF1, IGF1R and SHOX mutation analysis in short children born small for gestational age and short children with normal birth size (idiopathic short stature). *Horm Res Paediatr* 2012;77:250–260.
- Blum WF, Albertsson-Wikland K, Rosberg S, Ranke MB: Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:1610–1616.
- Wallborn T, Wuller S, Klammt J, Kruijs T, Kratzsch J, Schmidt G, Schlicke M, Muller E, van de Leur HS, Kiess W, Pfäffle R: A heterozygous mutation of the insulin-like growth factor-I receptor causes retention of the nascent protein in the endoplasmic reticulum and results in intrauterine and postnatal growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2316–2324.
- Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, Griorescu F, Lautier C, Keller E, Kiess W, Klammt J, Kratzsch J, Osgood D, Pfäffle R, Raile K, Seidel B, Smith RJ, Chernausek SD: IGF-1 receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Engl J Med* 2003;349:2211–2222.
- Vashisth H, Abrams CF: All-atom structural models for complexes of insulin-like growth factors IGF1 and IGF2 with their cognate receptor. *J Mol Biol* 2010;400:645–658.
- Deininger PL, Batzer MA: Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab* 1999;67:183–193.
- Sen SK, Han K, Wang J, Lee J, Wang H, Callinan PA, Dyer M, Cordaux R, Liang P, Batzer MA: Human genomic deletions mediated by recombination between Alu elements. *Am J Hum Genet* 2006;79:41–53.
- Maquat LE: Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. *J Cell Sci* 2005;118:1773–1776.
- Fang P, Schwartz ID, Johnson BD, Derr MA, Roberts CT Jr, Hwa V, Rosenfeld RG: Familial short stature caused by haploinsufficiency of the insulin-like growth factor I receptor due to nonsense-mediated messenger ribonucleic acid decay. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:1740–1747.
- Raile K, Klammt J, Schneider A, Keller A, Laue S, Smith R, Pfäffle R, Kratzsch J, Keller E, Kiess W: Clinical and functional characteristics of the human Arg59Ter insulin-like growth factor I receptor (IGF1R) mutation: implications for a gene dosage effect of the human IGF1R. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2264–2271.
- Choi JH, Kang M, Kim GH, Hong M, Jin HY, Lee BH, Park JY, Lee SM, Seo EJ, Yoo HW: Clinical and functional characteristics of a novel heterozygous mutation of the IGF1R gene and IGF1R haploinsufficiency due to terminal 15q26.2-qter deletion in patients with intrauterine growth retardation and postnatal catch-up growth failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E130–E134.
- Klammt J, Kiess W, Pfäffle R: IGF1R mutations as cause of SGA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25:191–206.
- Siebler T, Lopaczynski W, Terry CL, Casella SJ, Munson P, De LDD, Phang L, Blakemore KJ, McEvoy RC, Kelley RI, et al: Insulin-like growth factor I receptor expression and function in fibroblasts from two patients with deletion of the distal long arm of chromosome 15. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3447–3457.
- Walenkamp MJ, de Muinck Keiser-Schrama SM, de Mos M, Kalf ME, van Duyvenvoorde HA, Boot AM, Kant SG, White SJ, Losekoot M, Den Dunnen JT, Karperien M, Wit JM: Successful long-term growth hormone therapy in a girl with haploinsufficiency of the insulin-like growth factor-I receptor due to a terminal 15q26.2-qter deletion detected by multiplex ligation probe amplification. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2421–2425.
- Ester WA, van Duyvenvoorde HA, de Wit CC, Broekman AJ, Ruivenkamp CA, Goverts LC, Wit JM, Hokken-Koelega AC, Losekoot M: Two short children born small for gestational age with insulin-like growth factor I receptor haploinsufficiency illustrate the heterogeneity of its phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:4717–4727.
- Okubo Y, Siddle K, Firth H, O’Rahilly S, Wilson LC, Willatt L, Fukushima T, Takahashi S, Petry CJ, Saukkonen T, Stanhope R, Dunger DB: Cell proliferation activities on skin fibroblasts from a short child with absence of one copy of the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) gene and a tall child with three copies of the IGF1R gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5981–5988.

- 36 Kruis T, Klammt J, Galli-Tsinopoulou A, Wallborn T, Schlicke M, Muller E, Kratzsch J, Korner A, Odeh R, Kiess W, Pfaffle R: Heterozygous mutation within a kinase-conserved motif of the insulin-like growth factor I receptor causes intrauterine and postnatal growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:1137–1142.
- 37 Kawashima Y, Kanzaki S, Yang F, Kinoshita T, Hanaki K, Nagaishi J, Ohtsuka Y, Hisatome I, Ninomoya H, Nanba E, Fukushima T, Takahashi S: Mutation at cleavage site of insulin-like growth factor receptor in a short-stature child born with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4679–4687.
- 38 Rappold G, Blum WF, Shavrikova EP, Crowe BJ, Roeth R, Quigley CA, Ross JL, Niesler B: Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. *J Med Genet* 2007;44:306–313.
- 39 Ranke MB: Towards a consensus on the definition of idiopathic short stature. *Horm Res* 1996;45(suppl 2):64–66.
- 40 Wit JM, Oostdijk W, Losekoot M: Spectrum of insulin-like growth factor deficiency. *Endocr Dev* 2012;23:30–41.
- 41 Wit JM, van Duyvenvoorde HA, Scheltinga SA, de Bruin S, Hafkenscheid L, Kant SG, Ruivenkamp CAL, Gijsbers ACJ, van Doorn J, Feigerlova E, Noordam C, Walenkamp MJ, Claahsen-van de Grinten H, Stouthart P, Bonapart IE, Pereira AM, Gosen J, Delemarre-van de Waal HA, Hwa V, Breuning MH, Domené HM, Oostdijk W, Losekoot M: Genetic analysis of short children with apparent growth hormone insensitivity. *Horm Res Paediatr* 2012;77:320–333.
- 42 Muller E, Dunstheimer D, Klammt J, Friebe D, Kiess W, Kratzsch J, Kruis T, Laue S, Pfaffle R, Wallborn T, Heidemann PH: Clinical and functional characterization of a patient carrying a compound heterozygous pericentrin mutation and a heterozygous IGF1 receptor mutation. *PLoS One* 2012;7:e38220.
- 43 Musebeck J, Mohnike K, Beye P, Tonnies H, Neitzel H, Schnabel D, Gruters A, Wieacker PF, Stumm M: Short stature homeobox-containing gene deletion screening by fluorescence in situ hybridisation in patients with short stature. *Eur J Pediatr* 2001;160:561–565.
- 44 Schiller S, Spranger S, Schechinger B, Fukami M, Merker S, Drop SL, Troger J, Knoblauch H, Kunze J, Seidel J, Rappold GA: Phenotypic variation and genetic heterogeneity in Leri-Weill syndrome. *Eur J Hum Genet* 2000;8:54–62.
- 45 Marchini A, Marttila T, Winter A, Caldeira S, Malanchi I, Blaschke RJ, Hacker B, Rao E, Karperien M, Wit JM, Richter W, Tommasino M, Rappold GA: The short stature homeodomain protein SHOX induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *J Biol Chem* 2004;279:37103–37114.
- 46 Wang Y, Cheng Z, Elalieh HZ, Nakamura E, Nguyen MT, Mackem S, Clemens TL, Bikle DD, Chang W: IGF-1R signaling in chondrocytes modulates growth plate development by interacting with the PTHrP/Ihh pathway. *J Bone Miner Res* 2011;26:1437–1446.

5 Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Klinisches Erscheinungsbild und funktionelle Charakterisierung eines Patienten mit einer heterozygoten Exon 6 Deletion im IGF1R

eingereicht von: Eva-Maria Sophia Harmel

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

betreut von Dr. rer. nat. Jürgen Klammt
Prof. Dr. med. Wieland Kiess

Monat und Jahr (der Einreichung)

5.1 Patientenbeschreibung

Unser Patient stellte sich im Alter von 6,2 Jahren mit dem Bild eines isolierten, proportionierten Kleinwuchses am Uniklinikum Tübingen vor. Er maß zu diesem Zeitpunkt 102 cm, was, bezogen auf die alters- und geschlechtsspezifische Durchschnittsgröße, einer Abweichung von $-3,30$ SDS entspricht.

Der Junge war nach einer unauffällig verlaufenden Schwangerschaft nach 40 Wochen gesund auf die Welt gekommen (Apgar 10/10). Das Geburtsgewicht betrug 2.880 g ($-1,64$ SDS), die Geburtsgröße 49 cm ($-0,92$ SDS) und sein Kopfumfang $-0,36$ SDS. Zum Zeitpunkt der Geburt lag unser Patient mit seinen Werten im unteren Normbereich (*appropriate for gestational age* (AGA)). Dennoch entfernte sich die Wachstumskurve des Patienten im Verlauf des ersten Lebensjahres zunehmend von den normwertigen Perzentilenscharen. Mit Erreichen des ersten Lebensjahrs kreuzte der Junge die dritte Perzentile und seine Wachstumskurve verlief seitdem zwar perzentilenparallel, aber unterhalb der dritten Perzentile. Er ist der Sohn zweier gesunder, nicht blutsverwandter Eltern, die mit ihrer Körpergröße (Mutter: 158,2 cm/ $-1,08$ SDS; Vater: 171,5 cm/ $-0,90$ SDS) im Normbereich liegen und eine regelrechte Entwicklung in der Eigenanamnese angaben. Die Familienanamnese ergab keine Hinweise auf eine familiäre konstitutionelle Entwicklungsverzögerung und die Eigenanamnese nicht auf eine Grunderkrankung, die die Wachstumsretardierung des Patienten hätte erklären können. Daher wurden weiterführende Untersuchungen angeordnet.

Laborchemisch zeigten sich keine Auffälligkeiten. Ein Hormonmangel wurde ebenfalls nicht diagnostiziert: die Schilddrüsen- und Kortisol-Werte waren normwertig und ein GH-Mangel konnte durch dreifache Bestimmung des IGF1-Wertes im Referenzbereich nahezu ausgeschlossen werden. In der radiologischen Bildgebung wurde eine stark verzögerte Knochenreifung offenbar: im Alter von 6,2 Jahren betrug das Knochenalter nach Greulich und Pyle lediglich 2,7 Jahre. Somit stimmten chronologisches Alter und biologisches nicht überein. Zur Differenzierung, ob es sich in diesem Fall um eine genetische Ursache für Kleinwuchs handelt, wurde der Patient in ein Screeningprogramm für Mutationen im *IGF1*-, *IGF1R*- und *SHOX*-Gen eingeschlossen, da er mit seinen Charakteristika den Einschlusskriterien entsprach (Geburtsgewicht oder -länge ≤ -1 SDS) (Caliebe and Broekman, 2012). Die DNA der Eltern wurde ebenfalls auf Mutationen in den genannten Genen hin untersucht.

Eine Suche nach Veränderungen in der Genkopienzahl des *IGF1R*-Gens mittels *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* ergab, dass im Genom des Patienten und der Mutter je eine Kopie des Exon 6 deletiert ist. Durch die Sequenzierung des *SHOX*-Gens wurde zudem eine bisher unklassifizierte Variante (c.720G>A) sowohl beim Vater als auch beim Sohn identifiziert. Da an der Universitätskinderklinik Leipzig seit einigen Jahren molekulare Ursachen für idiopathischen Kleinwuchs erforscht werden, wurden – nach Einverständniserklärung der Eltern – mittels Stanzbiopsie gewonnene Fibroblasten des Unterarms vom Patienten und seiner Mutter zur weiteren genetischen und funktionellen Untersuchung der detektierten *IGF1R*-Mutation an das Forschungslabor der Kinderklinik überstellt.

Der Patient war weiterhin an die Kleinwuchssprechstunde in Tübingen angebunden. Die Pubertät begann verspätet mit 14,6 Jahren (G2P1 nach Tanner) konkordant zu dem verminderten biologischen Alter um ca. 3 Jahre nach Greulich und Pyle. Von weiteren Erkrankungen, wie einer gestörten Glukosetoleranz (Mohn et al., 2011) oder mentalen Retardierung (Abuzzahab et al., 2003; Kawashima et al., 2005; Wallborn et al., 2010), wie sie bei vergleichbaren anderen Mutationsträgern beschrieben wurde, ist unser Patient nicht betroffen. In der Schule erzielte der Patient gute Leistungen und wies eine altersgerechte Entwicklung auf. Die zuletzt berichtete Größe des Patienten lag bei 152,6 cm (–3.24 SDS) mit 16,0 Jahren. Da die IGF1-Werte stets normwertig waren, wurde auf eine GH-Therapie bei unserem Patienten nach einer Risiko-Nutzen-Abwägung durch die behandelnden Ärzte und Eltern verzichtet.

5.2 Experimentelle Untersuchungen

Erste Analysen am Genom des Patienten und seinen Eltern wurden in Leiden, Niederlande, durchgeführt und von Caliebe *et al.* beschrieben (Caliebe and Broekman, 2012). Wir bestätigten das Ergebnis der in Leiden durchgeführten MLPA-Untersuchung durch Sequenzierung von cDNA, die wir durch reverse Transkription von RNA aus Fibroblasten gewannen: sowohl bei der Mutter als auch beim Sohn ist in einem Allel des *IGF1*-Rezeptors das Exon 6 deletiert. Durch eine Verschiebung des offenen Leserahmens kommt es bei der Transkription zur Einführung eines vorzeitigen Stoppcodons (PTC). Daraus resultiert theoretisch das stark verkürzte Protein p.Asn417X.

Um die genauen Deletionsbruchstellen der Mutation in dem *IGF1R*-Gen zu bestimmen, führten wir eine *Long Range PCR* durch, die neben dem Wildtyp-PCR-Produkt von 12.048 bp ein verkürztes Amplifikat von etwa 7 kb lieferte. Mit einem anschließenden Restriktionsverdau grenzten wir die Deletionsbruchstellen ein. Da die direkte Sequenzierung der zwei Alu-Elemente, die die Deletion flankieren, aufgrund von langstreckigen oligo(dT)-Passagen technisch nicht möglich war, bedienten wir uns der Klonierung des PCR-Produkts in den Vektor pGEMT als Zwischenschritt. Durch die direkte Plasmidsequenzierung konnten wir eine neue heterozygote *IGF1R*-Deletion (c.1247+4448_1462+380del) definieren, die 5.211 bp umfasst und neben Anteilen des Intron 5 und 6 das Exon 6 beinhaltet.

Ob das PTC-tragende Transkript dem *Nonsense Mediated Decay* (NMD) unterliegt, untersuchten wir anhand von IGF1R-mRNA. Nicht unter physiologischen Bedingungen, aber durch Inhibition der Translation und somit des NMD mittels Cycloheximid, war neben Wildtyp-mRNA auch die mutierte IGF1R-mRNA detektierbar. Das bedeutet, dass die veränderte mRNA vom NMD-Mechanismus erkannt und abgebaut wird. Da der IGF1R ein von beiden Allelen zu gleichen Teilen exprimiertes Protein ist, erwarteten wir, dass es zu einer Verringerung der IGF1-Rezeptordosis kommt und kein mutiertes Rezeptorprotein gebildet wird. Wir konnten im *Western Blot* zeigen, dass die Gesamtzahl der Rezeptoren um etwa die Hälfte reduziert ist, das verbleibende IGF1R-Protein vom Wildtypallel stammt und das bereits durch den NMD eliminierte, mutierte Protein nicht nachweisbar ist.

Ob die IGF1-abhängige Aktivität des IGF1R verändert ist, untersuchten wir anhand der Patientenfibroblasten im Vergleich zu alters- und geschlechtsspezifischen Kontrollfibroblasten, die mit IGF1 in physiologischer bis supraphysiologischer Dosis stimuliert wurden. Anhand der densitometrischen Quantifizierung des Phosphorylierungssignals im Immunoblot konnten wir Aussagen über das Autophosphorylierungsverhalten des Rezeptors und über die Signaltransduktion treffen. Mittels spezifischer primärer Antikörper und Chemolumineszenz-katalysierender sekundärer Antikörper wurde die IGF1-abhängige Aktivität des IGF1R-Proteins und der nachgeschalteten Signalmoleküle AKT und MAPK bestimmt. Quantifiziert man die Aktivität der Rezeptoren, ist beim Patienten der Grad der Autophosphorylierung des Rezeptormoleküls, bezogen auf die IGF1-Rezeptormenge, vergleichbar mit dem der Kontrolle. Im Bezug auf das Gesamtprotein der Zellen zeigt sich allerdings ein vermindertes Phosphor-Signal des IGF1R-Phosphotyrosinkinase, was sich durch die annähernde Halbierung der Rezeptordichte erklärt. Somit resultiert die Mutation des Patienten in einer Haploinsuffizienz des IGF1R.

Konsequenterweise müsste auch die Aktivität der IGF1R-Signalkaskade abgeschwächt sein. Doch sowohl Untersuchungen im Immunoblot als auch im ELISA konnten dies nicht ausreichend bestätigen. Allein bei der höchsten Stimulation durch IGF1 zeigten die Fibroblasten der Mutter eine geringere Aktivierung im Vergleich zu der Kontrolle. Da die Signalkaskaden des IGF1-Rezeptors redundant angesteuert und reguliert werden, scheint in dem vorliegenden Fall eine geringe Phosphorylierung der Rezeptoren auszureichen, um im Vergleich zur Kontrolle eine etwa ähnlich starke Aktivierung der Signalmoleküle AKT und MAPK zu bewirken.

5.3 Interpretation

In unserer Arbeit haben wir einen kleinwüchsigen Patienten beschrieben der von einer partiellen IGF1-Resistenz betroffen ist. Wir haben den zugrundeliegenden Mechanismus untersucht. Eine 5 kb umfassende Deletion führt bei der Transkription zum Verlust des Exon 6 und durch die damit einhergehende Leserasterverschiebung zur Einführung eines vorzeitigen Stoppcodons. Bei der Translation wird dies von den Zellen erkannt und die mutierte mRNA eliminiert, sodass das im Patienten detektierbare IGF1R-Protein von dem Wildtypallel stammt. Die IGF1-Rezeptoren haben eine normale Funktion, sind aber in ihrer Anzahl vermindert, was zu einer Haploinsuffizienz führt und die partielle IGF1-Resistenz unseres Patienten erklärt.

Auch wenn *in vitro* die verminderte Rezeptor-Aktivierung keine signifikanten Signalwegveränderungen beim Patienten nach sich ziehen, ist davon auszugehen, dass die IGF1R-Haploinsuffizienz den Kleinwuchs unseres Patienten bedingt, wie es bereits bei anderen IGF1R-Mutationsträgern beschrieben wurde. Die Gruppe der IGF1R-Mutationsträger ist, bedingt durch die unterschiedlichen Mutationen, eine recht heterogene Gruppe. Auch die *in vitro* Studien fallen unterschiedlich aus. So wurde beispielsweise bei Raile *et al.* und Choi *et al.* jeweils eine IGF1R-Mutation charakterisiert, die ebenfalls zu einem vorzeitigen Stoppcodon führt und eine verminderte AKT-Aktivierung nach sich zieht (Choi *et al.*, 2011; Raile *et al.*, 2006). Dagegen wurde in verschiedenen Studien eine Diskrepanz zwischen genetischen und proteinbiochemischen Ergebnissen bei 15q26→qter Deletionen beschrieben (Ester *et al.*, 2009; Okubo *et al.*, 2003; Siebler, 2014; Walenkamp *et al.*, 2006).

Zudem bleibt offen, in wie weit die SHOX-Variante, die durch den Vater vererbt wurde, mit der IGF1R-Mutation interagiert. Zwar legen *in silico* Analysen und der klinische SHOX-Score nahe, dass die SHOX-Variante wenig Einfluss auf den Phänotyp des Patienten haben sollte, doch betrachtet man die Körpergröße der Eltern, liegt der Patient unter der elternkorrelierten Zielgröße und es scheint als hätten die SHOX-Variante und die Rezeptor-Mutation einen additiven Effekt. Noch konnte keine direkt funktionelle Interaktion von SHOX und IGF1R oder seinem Signalweg gezeigt werden, aber die Vermutung liegt nahe, dass ihre Signalwege während des Wachstumsprozesses miteinander kommunizieren. Ein Hinweis könnte sein, dass auch SHOX-Patienten von einer GH-Therapie profitieren (Blum et al., 2013). Nach wie vor sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Signaltransduktion von der Zelloberfläche bis zum Nukleus bzw. zu anderen zellulären Effektoren nicht vollständig aufgeklärt. Neben den verschiedenen Funktionen als Protein erhärtet sich der Verdacht, dass nukleäre IGF1-Rezeptoren als Transkriptionsfaktoren agieren (Sarfstain and Werner, 2013).

Bei anderen IGF1R-Mutationsträgern kam es neben dem Kleinwuchs sporadisch zu weiteren Einschränkungen, sei es in der geistigen und motorischen Entwicklung oder in dem Glucosestoffwechsel (Klammt et al., 2011). Erfreulicherweise weist unser Patient keines dieser Stigmata auf. Ob unser Patient im Erwachsenenalter eine Prädisposition für gewisse Erkrankungen hat, bleibt spekulativ. Bekannt ist lediglich, dass Kleinwuchs ein erhöhtes Risiko für kardiologische Erkrankungen, wie ischämischer Herzinfarkt oder plötzlicher Herztod, mit sich bringt (Schmidt et al., 2014). Diskutiert wird, ob IGF1R-Mutationsträger mit einer höheren Wahrscheinlichkeit im Laufe ihres Lebens eine gestörte Glucosetoleranz entwickeln. Diese Vermutung leitet sich unter anderem aus der Tatsache ab, dass es IGF1- und Insulinrezeptoren durch ihre starke Homologie möglich ist, Hybride zu bilden (Baillyes et al., 1997). Die Vorstellung ist, dass sich die Insulinsensitivität je nach Anteil der Hemirezeptoren verändern könnte.

Zudem ergeben sich aus dem Kleinwuchs gegebenenfalls psychosoziale Probleme. Eine Studie, durchgeführt in Großbritannien und den USA, zeigte, dass das Einkommen mit der Körpergröße korreliert und somit Kleinwüchsige benachteiligt sind (Case and Paxson, 2009). Zu der Lebensqualität ist die Studienlage allerdings strittig und es bleibt ungeklärt, ob die Lebensqualität in jedem Fall durch eine Wachstumsretardierung eingeschränkt ist (Sandberg, 2011).

Tatsache ist, dass für die Patienten mit einer IGF1R-Mutation bisher keine spezifische Therapie zu Verfügung steht, und es bedarf weiterer Forschung um eine IGF1-Resistenz eines Tages behandeln zu können.

5.4 Ausblick

Der IGF1R ist im Zusammenspiel mit den anderen Faktoren der somatotropen Achse essentiell für das Wachstum unseres Körpers. Auf zellulärer Ebene gibt er die Effekte von IGF1 weiter und vermag es Zellen vor dem programmierten Zelltod zu bewahren. Unter dem Einfluss von Mitose-stimulierenden Faktoren, vermittelt der IGF1R die Zellzyklusprogression und den Eintritt in die S-Phase. Ist die IGF1R-Funktion gestört, kommt zu vermindertem Wachstum einer Zelle einhergehend mit einem abgeschwächten Potential, maligne zu entarten. Anhand von Fibroblasten-Zelllinien, gewonnen aus igf-1r knock-out Mäusen, wurde bereits 1993 gezeigt, dass das *Simian Virus 40 Large Tumor Antigene* im Gegensatz zu WT-Zellen keine maligne Entartung induzierte (Sell et al., 1993). Die Aktivierung weiterer viraler und zellulärer Onkogene zog ebenfalls keine neoplastische Transformation nach sich (Yakar et al., 2005). Seit dieser Erkenntnis wird der IGF1R nicht nur unter dem Aspekt, die Funktion der somatotropen Achse aufzuklären, erforscht, sondern stellt ein Kandidatengem für eine Therapie gegen Krebs dar. Ein Ansatz in der Krebstherapie ist das Targeting des IGF1R und seines Signalweges, um ungehemmte Zellproliferation einzudämmen (Pollak et al., 2004). Einige Antikörper gegen den IGF1R finden sich bereits in Phase-III-Studien, doch vorläufige Ergebnisse haben bis jetzt mangelnde Effizienz gezeigt (Pollak, 2012). Somit ist für eine spezifische Krebstherapie die weitere Erforschung des IGF1-Rezeptors und seiner Funktion, die Einschätzung der Relevanz verschiedener Abschnitte des Rezeptorproteins und der durch ihn stimulierten Signalwege von außerordentlicher Bedeutung.

Ein weiteres großes Forschungsgebiet bezüglich des IGF1R ist die Altersforschung. Mehrere Theorien versuchen zu erfassen, was während des Prozesses des Alterns geschieht, der schließlich im Tod endet. Genomweite Assoziationsstudien haben gezeigt, dass dem Insulin- und IGF1-Signalweg dabei eine besondere Bedeutung zukommt (Deelen et al., 2013). Anhand von Modellorganismen wurde demonstriert, dass verschiedene Mutationen in Genen des Insulin- und IGF1-Signalweges in einer längeren Überlebenszeit resultieren (Longo and Finch, 2003). Auch die gezielte Downregulation solcher Gene führt in Organismen mit hoher Mitoserate zu einer bis zu 50 % gesteigerten Lebenszeit (Holzenberger, 2011). Beim

Menschen scheinen polymorphe Genvarianten im IGF1R und seinem Signalweg einen Effekt auf die Lebenspanne zu haben (Bonafè et al., 2003; Ziv and Hu, 2011). Besonders häufig traten IGF1R-Mutationen, die mit einem überdurchschnittlich langen Leben assoziiert sind bei Aschkenase-Juden auf (Suh et al., 2008).

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden die Ergebnisse der Charakterisierung einer neu identifizierten IGF1R-Mutation vorgestellt. Sie möchte zum besseren Verständnis der durch IGF1R-Mutationen verursachten IGF1-Resistenz beitragen. Die Erforschung des IGF1R ist nicht nur Teil der Wachstumsforschung sondern bildet einen essentiellen Part in der Krebs-, Alters- und Glukosestoffwechselforschung.

6 Literaturverzeichnis

Abuzzahab, M.J., Schneider, A., Goddard, A., Grigorescu, F., Lautier, C., Keller, E., Kiess, W., Klammt, J., Kratzsch, J., Osgood, D., et al. (2003). IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N. Engl. J. Med.* *349*, 2211–2222.

Adams, T.E., Epa, V.C., Garrett, T.P.J., and Ward, C.W. (2000). Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell. Mol. Life Sci. C.* *57*, 1050–1093.

Allen, D.B., and Cuttler, L. (2013). Clinical practice. Short stature in childhood--challenges and choices. *N. Engl. J. Med.* *368*, 1220–1228.

Baillyes, E.M., Navé, B.T., Soos, M.A., Orr, S.R., Hayward, A.C., and Siddle, K. (1997). Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. *Biochem. J.* *327*, 209–215.

Baker, J., Liu, J., Robertson, E., and Efstratiadis, A. (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 73–82.

Batzer, M.A., and Deininger, P.L. (2002). Alu repeats and human genomic diversity. *Nat. Rev. Genet.* *3*, 370–379.

Bhuvanagiri, M., Schlitter, A.M., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2010). NMD: RNA biology meets human genetic medicine. *Biochem. J.* *430*, 365–377.

Bideci, A., and Camurdan, O. (2009). Physiology of Growth Hormone Secretion. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* *1*, 1–7.

Binder, G. (2011). Short stature due to SHOX deficiency: genotype, phenotype, and therapy. *Horm. Res. Pædiatrics* *75*, 81–89.

Blaschke, R.J., Töpfer, C., Marchini, A., Steinbeisser, H., Janssen, J.W.G., and Rappold, G.A. (2003). Transcriptional and translational regulation of the Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX. *J. Biol. Chem.* *278*, 47820–47826.

Blum, W.F., Ross, J.L., Zimmermann, A.G., Quigley, C.A., Child, C.J., Kalifa, G., Deal, C., Drop, S.L.S., Rappold, G.A., and Cutler, G.B. (2013). GH treatment to final height produces similar height gains in

patients with SHOX deficiency and Turner syndrome: results of a multicenter trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *98*, E1383–92.

Bonafè, M., Barbieri, M., Marchegiani, F., Olivieri, F., Ragno, E., Giampieri, C., Mugianesi, E., Centurelli, M., Franceschi, C., and Paolisso, G. (2003). Polymorphic variants of insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor and phosphoinositide 3-kinase genes affect IGF-I plasma levels and human longevity: cues for an evolutionarily conserved mechanism of life span control. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *88*, 3299–3304.

Butler, A.A., and LeRoith, D. (2001). CONTROL OF GROWTH BY THE SOMATROPIC AXIS: Growth Hormone and the Insulin-Like Growth Factors Have Related and Independent Roles 1. *Annu. Rev. Physiol.* *63*, 141–164.

Butler, A.A., Yakar, S., Gewolb, I.H., Karas, M., Okubo, Y., and LeRoith, D. (1998). Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* *121*, 19–26.

Butler, A.A., Yakar, S., and LeRoith, D. (2002). Insulin-like growth factor-I: compartmentalization within the somatotropic axis? *News Physiol. Sci.* *17*, 82–85.

Caliebe, J., and Broekman, S. (2012). IGF1, IGF1R and SHOX mutation analysis in short children born small for gestational age and short children with normal birth size (idiopathic short stature). *Horm. Res.* *77*, 250–260.

Case, A., and Paxson, C. (2009). Stature and Status: Height, Ability and Labor Market Outcome, *J. Polit. Econ.* *116*, 1–31.

Choi, J.-H., Kang, M., Kim, G.-H., Hong, M., Jin, H.Y., Lee, B.-H., Park, J.-Y., Lee, S.-M., Seo, E.-J., and Yoo, H.-W. (2011). Clinical and functional characteristics of a novel heterozygous mutation of the IGF1R gene and IGF1R haploinsufficiency due to terminal 15q26.2->qter deletion in patients with intrauterine growth retardation and postnatal catch-up growth failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *96*, E130–4.

Clayton, P.E., Cianfarani, S., Czernichow, P., Johannsson, G., Rapaport, R., and Rogol, a (2007). Management of the child born small for gestational age through to adulthood: a consensus statement of the International Societies of Pediatric Endocrinology and the Growth Hormone Research Society. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *92*, 804–810.

Clement-Jones, M., Schiller, S., Rao, E., Blaschke, R.J., Zuniga, A., Zeller, R., Robson, S.C., Binder, G., Glass, I., Strachan, T., et al. (2000). The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 695–702.

Decker, E., Durand, C., Bender, S., Rödelsperger, C., Glaser, A., Hecht, J., Schneider, K.U., and Rappold, G. (2011). FGFR3 is a target of the homeobox transcription factor SHOX in limb development. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 1524–1535.

Deelen, J., Uh, H.-W., Monajemi, R., van Heemst, D., Thijssen, P.E., Böhringer, S., van den Akker, E.B., de Craen, A.J.M., Rivadeneira, F., Uitterlinden, A.G., et al. (2013). Gene set analysis of GWAS data for human longevity highlights the relevance of the insulin/IGF-1 signaling and telomere maintenance pathways. *Age (Dordr)*. *35*, 235–249.

Deininger, P.L., and Batzer, M. a (1999). Alu repeats and human disease. *Mol. Genet. Metab.* *67*, 183–193.

Dupont, J., and Holzenberger, M. (2003). Biology of insulin-like growth factors in development. *Birth Defects Res. C. Embryo Today* *69*, 257–271.

Durand, C., and Rappold, G.A. (2013). Height matters- from monogenic disorders to normal variation. *Nat. Rev. Endocrinol.* 1–7.

Efstratiadis, A. (1998). Genetics of mouse growth. *Int. J. Dev. Biol.* *42*, 955–976.

Ester, W.A., van Duyvenvoorde, H.A., de Wit, C.C., Broekman, A.J., Ruivenkamp, C.A.L., Govaerts, L.C.P., Wit, J.M., Hokken-Koelega, A.C.S., and Losekoot, M. (2009). Two short children born small for gestational age with insulin-like growth factor 1 receptor haploinsufficiency illustrate the heterogeneity of its phenotype. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *94*, 4717–4727.

Fang, P., Schwartz, I.D., Johnson, B.D., Derr, M.A., Roberts, C.T., Hwa, V., and Rosenfeld, R.G. (2009). Familial short stature caused by haploinsufficiency of the insulin-like growth factor 1 receptor due to nonsense-mediated messenger ribonucleic acid decay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *94*, 1740–1747.

Fang, P., Cho, Y.H., Derr, M.A., Rosenfeld, R.G., Hwa, V., and Cowell, C.T. (2012). Severe short stature caused by novel compound heterozygous mutations of the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *97*, E243–7.

Gannagé-Yared, M.-H., Klammt, J., Chouery, E., Corbani, S., Mégarbané, H., Abou Ghoch, J., Choucair, N., Pfäffle, R., and Mégarbané, A. (2013). Homozygous mutation of the IGF1 receptor gene in a

patient with severe pre- and postnatal growth failure and congenital malformations. *Eur. J. Endocrinol.* *168*, K1–7.

Goldenberg, N., and Barkan, A. (2007). Factors regulating growth hormone secretion in humans. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* *36*, 37–55.

Häsler, J., Samuelsson, T., and Strub, K. (2007). Useful “junk”: Alu RNAs in the human transcriptome. *Cell. Mol. Life Sci.* *64*, 1793–1800.

Hofmann, E., 2006. *Medizinische Biochemie systematisch. UNI-MED-Verlag, Bremen, 4.Auflage*

Hokken-Koelega, A., and Ridder, M. De (1995). Children Born Small for Gestational Age: Do They Catch Up? *Pediatr.* *38*, 8–12.

Holbrook, J. a, Neu-Yilik, G., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2004). Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat. Genet.* *36*, 801–808.

Holzenberger, M. (2011). Igf-I signaling and effects on longevity. *Nestle Nutr. Workshop Ser. Pediatr. Program.* *68*, 237–45; discussion 246–9.

Houck, C.M. et al., 1979. A ubiquitous family of repeated DNA sequences in the human genome. *Journal of Molecular Biology*, *132*, 289–306.

Huber, C., Rosilio, M., Munnich, A., and Cormier-Daire, V. (2006). High incidence of SHOX anomalies in individuals with short stature. *J. Med. Genet.* *43*, 735–739.

Inagaki, K., Tiulpakov, A., Rubtsov, P., Sverdlova, P., Peterkova, V., Yakar, S., Terekhov, S., and LeRoith, D. (2007). A familial insulin-like growth factor-I receptor mutant leads to short stature: clinical and biochemical characterization. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *92*, 1542–1548.

Jaillon, O., Bouhouche, K., Gout, J.-F., Aury, J.-M., Noel, B., Saudemont, B., Nowacki, M., Serrano, V., Porcel, B.M., Ségurens, B., et al. (2008). Translational control of intron splicing in eukaryotes. *Nature* *451*, 359–362.

Kawashima, Y., Kanzaki, S., Yang, F., Kinoshita, T., Hanaki, K., Nagaishi, J.-I., Ohtsuka, Y., Hisatome, I., Ninomoya, H., Nanba, E., et al. (2005). Mutation at cleavage site of insulin-like growth factor receptor in a short-stature child born with intrauterine growth retardation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *90*, 4679–4687.

Kawashima, Y., Higaki, K., Fukushima, T., Hakuno, F., Nagaishi, J.-I., Hanaki, K., Nanba, E., Takahashi, S.-I., and Kanzaki, S. (2012). Novel missense mutation in the IGF-I receptor L2 domain results in intrauterine and postnatal growth retardation. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. *77*, 246–254.

Kawashima, Y., Hakuno, F., Okada, S.-I., Hotsubo, T., Kinoshita, T., Fujimoto, M., Nishimura, R., Fukushima, T., Hanaki, K., Takahashi, S.-I., et al. (2013). Familial short stature is associated with a novel dominant-negative heterozygous insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) mutation. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. *20*, 4–6.

Klammt, J., Kiess, W., and Pfäffle, R. (2011). IGF1R mutations as cause of SGA. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *25*, 191–206.

Kruis, T., Klammt, J., Galli-Tsinopoulou, A., Wallborn, T., Schlicke, M., Müller, E., Kratzsch, J., Körner, A., Odeh, R., Kiess, W., et al. (2010). Heterozygous mutation within a kinase-conserved motif of the insulin-like growth factor I receptor causes intrauterine and postnatal growth retardation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *95*, 1137–1142.

Labarta, J.I., Barrio, E., Audí, L., Fernández-Cancio, M., Andaluz, P., de Arriba, A., Puga, B., Calvo, M.T., Mayayo, E., Carrascosa, A., et al. (2013). Familial short stature and intrauterine growth retardation associated with a novel mutation in the IGF-I receptor (IGF1R) gene. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. *78*, 255–262.

Leal, A.C., Montenegro, L.R., Saito, R.F., Ribeiro, T.C., Coutinho, D.C., Mendonca, B.B., Arnhold, I.J.P., and Jorge, A. a L. (2012). Analysis of the insulin-like growth factor 1 receptor gene (IGF1R) in children born small for gestational age: in vitro characterization of a novel mutation (p.Arg511Trp). *Clin. Endocrinol. (Oxf)*.

Lee, P.A., Chernausk, S.D., and Hokken-Koelega, A.C.S. (2014). International Small for Gestational Age Advisory Board Consensus.

Leroith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D., and Roberts, a. T. (1995). Molecular and Cellular Aspects of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor. *Endocr. Rev.* *16*, 143–163.

Longo, V.D., and Finch, C.E. (2003). Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? *Science* *299*, 1342–1346.

Maquat, L.E., and Gong, C. (2009). Gene expression networks: competing mRNA decay pathways in mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.* *37*, 1287–1292.

Marchini, A., Daeffler, L., Marttila, T., Schneider, K.U., Blaschke, R.J., Schnölzer, M., Rommelaere, J., and Rappold, G.A. (2006). Phosphorylation on Ser106 modulates the cellular functions of the SHOX homeodomain protein. *J. Mol. Biol.* *355*, 590–603.

Marchini, A., Rappold, G.A., and Schneider, K.U. (2007a). SHOX at a glance: from gene to protein. *Arch. Physiol. Biochem.* *113*, 116–123.

Marchini, A., Häcker, B., Marttila, T., Hesse, V., Emons, J., Weiss, B., Karperien, M., and Rappold, G.A. (2007b). BNP is a transcriptional target of the short stature homeobox gene SHOX. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 3081–3087.

Marte, B., and Downward, J. (1997). PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem. Sci.* *0004*, 355–358.

Mohn, A., Marcovecchio, M.L., de Giorgis, T., Pfaeffle, R., Chiarelli, F., and Kiess, W. (2011). An insulin-like growth factor-I receptor defect associated with short stature and impaired carbohydrate homeostasis in an Italian pedigree. *Horm. Res. Pædiatrics* *76*, 136–143.

Muntau, A.C., 2009. Intensivkurs Pädiatrie. *Urban & Fischer in Elsevier*, München, 5. Auflage

Nicholson, P., Yepiskoposyan, H., Metze, S., Zamudio Orozco, R., Kleinschmidt, N., and Mühlemann, O. (2010). Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. *Cell. Mol. Life Sci.* *67*, 677–700.

Okubo, Y., Siddle, K., Firth, H., O’Rahilly, S., Wilson, L.C., Willatt, L., Fukushima, T., Takahashi, S., Petry, C.J., Saukkonen, T., et al. (2003). Cell proliferation activities on skin fibroblasts from a short child with absence of one copy of the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) gene and a tall child with three copies of the IGF1R gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *88*, 5981–5988.

Pearson, G. (2001). Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocr. Rev.* *22*, 153–183.

Pollak, M. (2012). The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 159–169.

Pollak, M.N., Schernhammer, E.S., and Hankinson, S.E. (2004). Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 505–518.

Raile, K., Klammt, J., Schneider, a, Keller, a, Laue, S., Smith, R., Pfäffle, R., Kratzsch, J., Keller, E., and Kiess, W. (2006). Clinical and functional characteristics of the human Arg59Ter insulin-like growth factor i receptor (IGF1R) mutation: implications for a gene dosage effect of the human IGF1R. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *91*, 2264–2271.

Ranke, M. (1996). Towards a consensus on the definition of idiopathic short stature. *Horm. Res. Paediatr.* *45*, 64–66.

Rao, E., Weiss, B., Fukami, M., and Rump, A. (1997). Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat. Genet.* *16*, 54–63.

Rao, E., Blaschke, R.J., Marchini, a, Niesler, B., Burnett, M., and Rappold, G. a (2001). The Leri-Weill and Turner syndrome homeobox gene SHOX encodes a cell-type specific transcriptional activator. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 3083–3091.

Rappold, G., Blum, W.F., Shavrikova, E.P., Crowe, B.J., Roeth, R., Quigley, C. a, Ross, J.L., and Niesler, B. (2007). Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. *J. Med. Genet.* *44*, 306–313.

Rogol, A.D. (2010). Sex steroids, growth hormone, leptin and the pubertal growth spurt. *Endocr. Dev.* *17*, 77–85.

Rogol, A., Roemmich, J., and Clark, P. (2002). Growth at puberty. *J. Adolesc. Heal.* 192–200.

Rosenfeld, R.G. (2003). Insulin-like growth factors and the basis of growth. *N. Engl. J. Med.* *349*, 2184–2186.

Rosenfeld, R.G., and Hwa, V. (2009). The growth hormone cascade and its role in mammalian growth. *Horm. Res. 71 Suppl 2*, 36–40.

Rosenfeld, R.G., and von Stein, T. (2013). A database and website for molecular defects of the GH-IGF axis: www.growthgenetics.com. *Horm. Res. Pædiatrics* *80*, 443–448.

Roy-Engel, A.M., Carroll, M.L., Vogel, E., Garber, R.K., Nguyen, S.V., Salem, A.H., Batzer, M.A., and Deininger, P.L. (2001). Alu insertion polymorphisms for the study of human genomic diversity. *Genetics* *159*, 279–290.

Saenger, P., Czernichow, P., Hughes, I., and Reiter, E.O. (2007). Small for gestational age: short stature and beyond. *Endocr. Rev.* *28*, 219–251.

Salmon, W.D. Jr, Daughaday, WH. 1957. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 49(6), pp.825–36

Sandberg, D.E. (2011). Psychosocial aspects of short stature and its management: good deeds require good science. *Horm. Res. Pædiatrics* *76 Suppl 3*, 37–39.

Sarfstein, R., and Werner, H. (2013). Minireview: nuclear insulin and insulin-like growth factor-1 receptors: a novel paradigm in signal transduction. *Endocrinology* *154*, 1672–1679.

Schmidt, M., Bøtker, H., Pedersen, L., and Sørensen, H. (2014). Adult height and risk of ischemic heart disease, atrial fibrillation, stroke, venous thromboembolism, and premature death: a population based 36-year follow-up study. *Eur. J. Epidemiol.* *29*, 111–118.

Sell, C., Rubini, M., Rubin, R., Liu, J.P., Efstratiadis, A., and Baserga, R. (1993). Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 11217–11221.

Siebler, T. (2014). Insulin-Like in Fibroblasts from Two Patients with Deletion of the Distal Long Arm of Chromosome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *80*, 3447–3457.

Smit, A.F.A. (1996). The origin of interspersed repeats in the human genome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *6*, 743–748.

Suh, Y., Atzmon, G., Cho, M.-O., Hwang, D., Liu, B., Leahy, D.J., Barzilai, N., and Cohen, P. (2008). Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 3438–3442.

Tanner, J.M. et al., 1956. Aberdeen growth study: I. The prediction of adult body measurement from measurements taken each year from birth to five years. *Archives of Disease in Childhood*, 31, pp.372–381.

Touwslager, R.N.H., Gielen, M., Derom, C., Mulder, A.L.M., Gerver, W.-J.M., Zimmermann, L.J., Houben, A.J.H.M., Stehouwer, C.D.A., Vlietinck, R., Loos, R.J.F., et al. (2011). Determinants of infant growth in four age windows: a twin study. *J. Pediatr.* *158*, 566–572.e2.

Walenkamp, M.J.E., van der Kamp, H.J., Pereira, A.M., Kant, S.G., van Duyvenvoorde, H.A., Kruijthof, M.F., Breuning, M.H., Romijn, J.A., Karperien, M., and Wit, J.M. (2006). A variable degree of intrauterine and postnatal growth retardation in a family with a missense mutation in the insulin-like growth factor I receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *91*, 3062–3070.

Walenkamp, M.J.E., de Muinck Keizer-Schrama, S.M.P.F., de Mos, M., Kalf, M.E., van Duyvenvoorde, H.A., Boot, A.M., Kant, S.G., White, S.J., Losekoot, M., Den Dunnen, J.T., et al. (2008). Successful long-term growth hormone therapy in a girl with haploinsufficiency of the insulin-like growth factor-I receptor due to a terminal 15q26.2->qter deletion detected by multiplex ligation probe amplification. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *93*, 2421–2425.

Wallborn, T., Wüller, S., Klammt, J., Kruis, T., Kratzsch, J., Schmidt, G., Schlicke, M., Müller, E., van de Leur, H.S., Kiess, W., et al. (2010). A heterozygous mutation of the insulin-like growth factor-I receptor causes retention of the nascent protein in the endoplasmic reticulum and results in intrauterine and postnatal growth retardation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *95*, 2316–2324.

Werner, H., Weinstein, D., and Bentov, I. (2008). Similarities and differences between insulin and IGF-I: structures, receptors, and signalling pathways. *Arch. Physiol. Biochem.* *114*, 17–22.

Wit, J.M., Clayton, P.E., Rogol, A.D., Savage, M.O., Saenger, P.H., and Cohen, P. (2008). Idiopathic short stature: definition, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Growth Horm. IGF Res.* *18*, 89–110.

Wit, J.M., Kiess, W., and Mullis, P. (2011). Genetic evaluation of short stature. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *25*, 1–17.

Yakar, S., Leroith, D., and Brodt, P. (2005). The role of the growth hormone/insulin-like growth factor axis in tumor growth and progression: Lessons from animal models. *Cytokine Growth Factor Rev.* *16*, 407–420.

Zhou, Y., Xu, B.C., Maheshwari, H.G., He, L., Reed, M., Lozykowski, M., Okada, S., Cataldo, L., Coschigamo, K., Wagner, T.E., et al. (1997). A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 13215–13220.

Ziv, E., and Hu, D. (2011). Genetic variation in insulin/IGF-1 signaling pathways and longevity. *Ageing Res. Rev.* *10*, 201–204.



II 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.

.....

Datum

.....

Unterschrift

III Curriculum vitae

Eva-Maria Sophia Harmel, (geb. Radermacher), geboren am 04.05.1988 in Berlin

Dissertation

- | | |
|--|---|
| Seit 07/2010 | Arbeiten zur experimentellen Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. med. Wieland Kiess |
| 10/2010 - 09/2011 und
06/2011 - 12/2011 | Promotionsförderung (<i>Medical Doctoral Programme_1</i> und <i>Medical Doctoral Programme_2</i>) durch das Integrierte Forschungs- und Behandlungszentrum <i>AdipositasErkrankungen</i> (BMBF) |

Ausbildung/Präsentation

- | | |
|---------------------------------|--|
| 08/2013 – 07/2014 | Praktisches Jahr (Herzzentrum: Kardiologie; Uniklinikum Leipzig: Endokrinologie, Visceralchirurgie, Pädiatrie; Li Ka Shing Faculty of Medicine of Hongkong: Chirurgie) |
| 06/2012 und 09/2012 | Posterpräsentation auf der ENDO (Houston) und ESPE (Leipzig) |
| 12/2011 | Posterpräsentation beim Researchfestival der Universität Leipzig |
| 11/2011 | Vortrag „Charakterisierung einer IGF1R-Mutation“ auf der JA-PED (Jahrestagung der Pädiatrischen Endokrinologie und Diabetologie) |
| 08/2011 | Forschungsfamulatur Pädiatrische Endokrinologie im Hôpital Armand Trousseau (Paris) |
| 10/2010, 05/2011 und
04/2012 | Posterpräsentation bei Tagungen des Integrierten Forschungs- und Behandlungszentrum <i>AdipositasErkrankungen</i> |
| 2009-10 und 2011-12 | Leitung der Fachschaft Medizin der Studienstiftung Cusanuswerks (‚Reproduktionsmedizin‘ und ‚Global Health‘) |

08/2009	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „gut“ (2,5)
Seit 04/2009	Stipendium der Studienstiftung Cusanuswerk
Seit 10/2007	Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig
1998-2007	Gymnasium Canisius-Kolleg in Berlin, Abitur-Note „sehr gut“ (1,1)

.....
Datum

.....
Unterschrift

IV Danksagung

Ich möchte Prof. Dr. med. Wieland Kiess für die Vergabe des Promotionsthemas, die Begleitung und großzügige Unterstützung meiner Arbeit danken. Für die persönliche Förderung und Mentorenschaft bin ich sehr dankbar. Mein Dank gilt ebenso Prof. Dr. med. Roland Pfäffle für die uneingeschränkte Unterstützung, gewissenhafte Beratung und die freundschaftliche Verbundenheit mit seiner Familie. Durch die ermöglichte Teilnahme an endokrinologischen Kongressen und internationalen Meetings, war es mir vergönnt, einen vielseitigen Einblick in die Forschung zu bekommen.

Dr. rer. nat. Jürgen Klammt danke ich von ganzem Herzen für die tagtägliche Unterstützung bei der Konzeption und Durchführung der Experimente. Seine sorgfältige Betreuung hat den Nährboden für eine Ertrag bringende Arbeit ermöglicht. Für die freundschaftliche Art der Betreuung bin ich sehr dankbar.

Für die Einarbeitung in verschiedene Methoden möchte ich vor allem Anja Barnikol-Oettler aus der Arbeitsgruppe von Prof. Kiess danken. Aus der Arbeitsgruppe von Prof. Pfäffle sei vor allem Heike Stobbe für die Unterstützung bei der Sequenzierung gedankt. Für die vielen Ratschläge und Hilfestellungen spreche ich allen weiteren Mitarbeitern des Forschungslabors meinen Dank aus.

Für klinische Betreuung des Patienten danke ich Prof. Dr. med. Gerhard Binder und Prof. Dr. med. Michael Ranke. Bezüglich der Publikation danke ich neben den schon genannten Co-Autoren Dr. med. Janina Caliebe, Prof. Dr. med. Monique Losekoot, Prof. Dr. med. Gudrun A. Rappold und Prof. Dr. med. Jan-Maarten Wit für die freundliche Zusammenarbeit. Ich danke dem Patienten und seiner Familie, dass sie ihre Daten und Fibroblasten für die Forschung zur Verfügung gestellt haben.

Für die Vergabe der Promotionsförderung und Projektförderung MDPro 1 und 2 danke ich herzlich dem Integrierten Forschungs- und Behandlungszentrum *AdipositasErkrankungen* Leipzig. Meinen Dank möchte ich schließlich an meine wunderbare Familie, Peter, Lucas und meine Eltern, richten, dass sie mich in meinem Vorhaben, diese Promotion anzufertigen, bestärkt und darin begleitet haben.