

Aus der Universitätsklinik für Kinder-
und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung I
Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger
Sektion Pädiatrische Endokrinologie
Leiter: Professor Dr. M. B. Ranke

**Genotyp-Phänotyp-Korrelationen
beim Noonan-Syndrom**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
KIRA NEUER
aus Böblingen

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. G. Binder
2. Berichtersatter: Privatdozent Dr. B. Balletshofer

Teile dieser Dissertation wurden im folgenden Artikel veröffentlicht:

Binder, G., Neuer, K., Ranke, M.B., Wittekindt, N.E. (2005)

„PTPN11 mutations are associated with mild growth hormone resistance in individuals with Noonan syndrome.“

***Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(9): 5377-5381.**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis..... IV

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....VII

1. Einleitung..... 1

 1.1 Abgrenzung des Noonan-Syndroms..... 1

 1.1.1 Das Noonan-Syndrom..... 1

 1.1.2 Historischer Überblick.....2

 1.1.3 Differentialdiagnose Ullrich-Turner-Syndrom..... 4

 1.1.4 Dem Noonan-Syndrom ähnliche Syndrome..... 5

 1.2 Genetische Grundlagen..... 7

 1.2.1 Lokalisierung des Noonan-Syndroms..... 7

 1.2.2 Das *PTPN11*-Gen..... 8

 1.3 Endokrinologische Grundlagen..... 13

 1.3.1 Human Growth Hormone (hGH)..... 13

 1.3.2 Insulin-like Growth Factors (Insulinähnliche Wachstumsfaktoren,IGF) und die zugehörigen Bindungsproteine..... 14

 1.3.3 Rekombinantes human Growth Hormone (rhGH)..... 15

 1.4 Fragestellung und Vorgehensweise..... 15

2. Material und Methoden..... 17

 2.1 Materialien..... 17

 2.1.1 Patientendaten..... 17

 2.1.2 Reagenzien..... 18

 2.1.3 Enzyme..... 18

 2.1.4 Verwendete Primer..... 19

 2.1.5 Verbrauchsmaterialien..... 20

 2.1.6 Geräte.....20

 2.2 Methoden.....21

 2.2.1 Sichtung der Patienten..... 21

 2.2.2 DNA-Isolierung..... 21

 2.2.2.1 Reinigung der genomischen DNA..... 22

Inhaltsverzeichnis

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung der genomischen DNA..	23
2.2.3 Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction = PCR).....	24
2.2.3.1 Durchführung der PCR.....	27
2.2.3.2 Elektrophorese der PCR-Produkte.....	33
2.2.4 DNA-Sequenzierung.....	36
2.2.4.1 Zyklus-Sequenzierung.....	38
2.2.4.2 Durchführung der DNA-Sequenzierung.....	39
2.2.4.3 Vorbereitung der 96 well-Filterplatte.....	39
2.2.4.4 Reinigung der PCR-Produkte mit SDS und Sephadex.....	40
2.2.4.5 Sequenzier-Reaktion.....	40
2.2.4.6 Sequenzanalysen.....	41
2.2.5 Messung der Wachstumshormone (hGH).....	42
2.2.6 Statistische Methoden.....	43
3. Ergebnisse	44
3.1 Mutationsanalysen.....	44
3.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen als klinische Merkmale.....	45
3.3 Wachstumsstörungen.....	47
3.4 IGF-1- und IGFBP-3-Serumspiegel.....	48
3.5 Therapeutische Versuche mit rekombinantem Wachstumshormon (rhGH).....	48
4. Diskussion	50
4.1 Mutationsraten.....	50
4.2 Klärung bezüglich einer Assoziation zwischen Geno- und Phänotyp.....	50
4.3 Spezifika des Minderwuchses bei Patienten mit positivem oder negativem Mutationsergebnis.....	52
4.4 GH- IGF-1-Achsen.....	53
4.5 Auswirkungen der Wachstumshormontherapie bei Mut+ Patienten im Vergleich zu Mut-Patienten.....	54
5. Zusammenfassung	55

Inhaltsverzeichnis

6. Anhang	58
6.1 Literaturliste.....	58
6.2 Danksagung.....	74
6.3 Lebenslauf.....	75

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
AT	Adenin Thymin
C	Cytosin
CFC	Cardio-Facio-Cutane-Syndrom
C-SH2	carboxy-terminal src-homology 2
cM	centiMorgan
Cys	Cystein
D	dies (Tag)
ddNTP	Dideoxynukleotide
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotide
EGF	epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
G	Guanin
GC	Guanin Cystein
g	relative Zentrifugalkraft
GH	Growth Hormone (Wachstumshormon)
GHBP	Growth Hormone Binding Proteine
GHRH	Growth Hormone-Releasing Hormone (für die Freisetzung von Wachstumshormonen verantwortliches Hormon)
GHRH	Growth Hormone Release-Inhibiting Hormone (das die Wachstumshormonfreisetzung hemmendes Hormon)
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
hGH	human Growth Hormone (humanspezifisches Wachstumshormon)
IE	Internationale Einheit

Abkürzungsverzeichnis

IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1 (insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1)
IGF-2	Insulin-like Growth Factor-2 (insulinähnlicher Wachstumsfaktor-2)
IGFBP-3	Insulin-like Growth Factor binding protein-3 (Bindungsprotein-3 des insulinähnlichen Wachstumsfaktors)
Ile	Isoleucin
JAK	Januskinasen
kg	Kilogramm
Leu	Leucin
Lys	Lysin
MAP	Mitogen-Aktivierte Protein-Kinase
Met	Methionin
mg	Milligramm
NF-1-Gen	Neurofibromatose-1-Gen
NIBSC	National Institute for Biological Standardization
N-SH2	N-amino-terminal src-homology 2
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pro	Prolin
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatasen
rev	reverse
rhGH	rekombinantes human Growth Hormone
RIA	Radioimmunoassay
rpm	round(s) per minute (Umdrehung(en) pro Minute)
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS	Standard Deviation Score
Ser	Serin
SH2	src homology region-2
SHP-2	src homology region-2 phosphatase 2
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STH	Somatropin
T	Thymin

Abkürzungsverzeichnis

TBE	Tris-Borat/EDTA-Puffer
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
WH	Wachstumshormon

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: PTPN11-Gen..... 9
Abbildung 2: Modell über die Regulation der SHP-2-Aktivität..... 11
Abbildung 3: Elektrophorese-Bilder von Exon 2 und Exon 13..... 34
Abbildung 4: Der Molekulargewichtsmarker.....36
Abbildung 5: Eine Sequenzierreaktion von Exon 13..... 42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Von Tartaglia et al. identifizierte Mutationen.....12
Tabelle 2: Primer von Tartaglia et al.¹²² (veröffentlicht Mai 2002)..... 19
Tabelle 3: Zusätzliche Primer..... 19
Tabelle 4: Exon 1 PCR mit Primer PTPN11 5.1/PTPN11 3.1..... 28
Tabelle 5: Exon 2 PCR mit Primer PTPN11 5.2/PTPN11 3.2..... 28
Tabelle 6: Exon 3 PCR mit Primer Olexon 3/Olexon 3rev.....28
Tabelle 7: Exon 4 PCR mit Primer Olexon 4/Olexon 4rev..... 29
Tabelle 8: Exon 5 PCR mit Primer PTPN11 5.5/PTPN11 3.5..... 29
Tabelle 9: Exon 6 PCR mit Primer PTPN11 5.6/PTPN11 3.6.....29
Tabelle 10: Exon 7 PCR mit Primer PTPN11 5.7/Olexon 7rev..... 30
Tabelle 11: Exon 8 PCR mit Primer Olexon 8/Olexon 8rev..... 30
Tabelle 12: Exon 9 PCR mit Primer PTPN11 5.9/PTPN11 3.9..... 30
Tabelle 13: Exon 10 PCR mit Primer PTPN11 5.10/PTPN11 3.10.....31
Tabelle 14: Exon 11 PCR mit Primer PTPN11 5.11/PTPN11 3.11..... 31
Tabelle 15: Exon 12 PCR mit Primer PTPN11 5.12/PTPN11 3.12..... 31
Tabelle 16: Exon 13 PCR mit Primer Olexon 13/Olexon 13rev.....32
Tabelle 17: Exon 14 PCR mit Primer PTPN11 5.14/PTPN11 3.14..... 32
Tabelle 18: Exon 15 PCR mit Primer PTPN11 5.15/PTPN11 3.15..... 32
Tabelle 19: PCR-Ansatz zur Amplifizierung der jeweiligen Exons.....33
Tabelle 20: Zyklusprofil der Cycle-Sequenzierung.....41
Tabelle 21: PTPN11-Mutationen bei 16 Patienten mit Noonan-Syndrom...45

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 22: Charakteristische klinische Merkmale bei Kindern mit Noonan-Syndrom.....	46
Tabelle 23: Auflistung der audiologischen Daten und der Hormonspiegel bezüglich der GH-IGF-1-Achse, sowie das Ansprechen auf rhGH.....	49

1. Einleitung

1.1 Abgrenzung des Noonan-Syndroms

1.1.1 Das Noonan-Syndrom

Das Noonan-Syndrom (OMIM 163950) ist eine vielschichtige Entwicklungsstörung, die durch Auffälligkeiten im Bereich des Gesichts, Herzfehler, Minderwuchs, verspäteten Eintritt in die Pubertät sowie geringerer mentaler Retardierung charakterisiert ist.^{3,4,27,72,79} Die auffälligen Gesichtsmerkmale beziehen sich auf den Hypertelorismus (erweiterter Augenabstand), die Ptosis (Herabhängen des Lides), die tief sitzende, große und nach hinten rotierte Ohren, eine breite Stirn, einen inversen Haaransatz und einen hohen spitzwinklig zulaufenden Gaumen.³²

Einige dieser phänotypischen Merkmale sind auch bei Patientinnen mit dem Ullrich-Turner-Syndrom zu sehen, worauf in den folgenden Kapiteln noch näher eingegangen wird.

Das Noonan-Syndrom führt in signifikanter Art und Weise zu kongenitalen Herzfehlern.^{58,88} Zu den typischen Herzfehlern zählen beim Noonan-Syndrom die Pulmonalstenose und die hypertrophe Kardiomyopathie.¹³³ Des Weiteren wurden auch andere Läsionen wie atrioventrikuläre Septumdefekte, die Aortenisthmusstenose oder Defekte im Bereich der Mitralklappe beobachtet.^{31,71} Nach dem Down-Syndrom ist das Noonan-Syndrom die zweithäufigste genetisch bedingte Ursache für Fehlbildungen im Bereich des Herzens.

Die Symptomatik des Noonan-Syndroms äußert sich in einer hohen Variabilität. Dementsprechend liegt die Inzidenz der Erkrankung zwischen 1:1000 und 1:2500 bei Lebendgeburten,⁸³ da die variable Symptomatik oft Schwierigkeiten bei der Diagnosesicherung bereitet.

Zur Erleichterung des diagnostischen Prozesses beim Noonan-Syndrom wurden einige Scores eingeführt.^{32,59,108} Anhand der dort erreichten Punkte konnte dann auf die Wahrscheinlichkeit eines Noonan-Syndroms geschlossen werden.

Einleitung

Minderwuchs wird bei nur 50 % der Patienten mit Noonan-Syndrom identifiziert, mit einer Durchschnittsendgröße unterhalb der dritten Perzentile liegend. Dabei beträgt die adulte Größe für den Mann im Durchschnitt 162,5 cm und für die Frau 152,7 cm.^{95,96} Neugeborene hingegen zeigen meist eine der Norm entsprechende Geburtslänge auf, während das Wachstum in der Pubertät nur langsam erfolgt und der pubertale Wachstumsschub verzögert und weniger ausgeprägt ist.^{95,129} Zu den weiteren Merkmalen, die auch beim Noonan-Syndrom zu finden sind, zählen der Kryptorchismus, Blutungsneigungen verschiedenen Ursprungs, ein breiter kurzer Nacken mit Nackenfalte und Brustkorb- und Wirbelsäulendeformierungen.^{22,126}

1.1.2 Historischer Überblick

Eine retrospektive Sichtung der Literatur zeigt, dass die ersten Studien über das Noonan-Syndrom bis in das Jahr 1883 zurück zu verfolgen sind. Damals beschrieb der Medizinstudent Kobylinski⁶⁵ an der Russischen Universität von Dorpat, einen 20-jährigen, an Tuberkulose erkrankten jüdischen Mann mit einigen bemerkenswerten klinischen Erscheinungen: breite Stirn, tiefe Haargrenze, Flügelfell am Hals, krauses Kopfhaar, Hypertelorismus, Zahnfehlstellungen und eine starke Pigmentierung. Dieser Fall wurde dann von Opitz und Pallister im Jahre 1979 veröffentlicht.^{72,86} Die herausstechende Erscheinung war das Flügelfell am Hals. Dieses Pterygium colli war daraufhin Thema vieler Publikationen über Patienten, in denen auch heute einige Fälle des Noonan-Syndroms zu erkennen sind.^{35,40,47,103}

Im Jahre 1930 wurde dann das Ullrich-Turner-Syndrom erstmals vom Pädiater Otto Ullrich beschrieben, der damals Merkmale wie Minderwuchs, ein Pterygium colli und ein Cubitus valgus bei einem 8-jährigen Mädchen beobachtete.

Der amerikanische Arzt Turner untersuchte unabhängig von Ullrich im Jahre 1938 sieben 15- bis 23-jährige Frauen mit solchen Stigmata. Neben den oben genannten Körpermerkmalen wiesen diese Frauen zusätzlich eine fehlende Pubertät mit primärer Amenorrhoe und Infertilität auf. Diese charakteristischen

Einleitung

Merkmale werden heute unter dem Symptomenkomplex des Ullrich-Turner-Syndroms zusammengefasst.

Das Ullrich-Turner-Syndrom tritt mit einer Häufigkeit von 1:2500 weiblicher Lebendgeburten auf und stellt somit eine relativ häufige Störung dar.^{34,74}

Gekennzeichnet ist dieses Symptom durch eine komplette oder partielle Monosomie des X-Chromosoms und ist somit nur beim weiblichen Geschlecht vorzufinden. Dies bedeutet, dass die Patientinnen meistens einen Karyotyp 45, X0 aufweisen und dadurch X-Chromatin-negativ sind. Als Kardinalsymptome sind hier der Kleinwuchs und die Gonadendysgenese zu sehen. Zu den fakultativ vorhandenen Körpermerkmalen gehören das Pterygium colli, ein kurzer Hals, ein hoher „gothischer“ Gaumen, ein tiefer inverser Haaransatz, ein Cubitus valgus, Zahnfehlstellungen, Ohrmuscheldysplasien, Naevi, eine Mikrognathie und Augendysplasien. Des Weiteren zeigt sich meist ein Schildthorax, teilweise liegt eine Trichterbrust vor. Die Mamillen haben häufig einen großen Abstand und sind manchmal nach innen gerichtet.

An Veränderungen im Bereich der inneren Organe finden sich die Aortenisthmusstenose, die Pulmonalstenose oder die für das Turner-Syndrom charakteristische Hufeisenniere.

Das Noonan-Syndrom weist phänotypische Parallelen zum Ullrich-Turner-Syndrom auf. Aus diesem Grund stellt das Ullrich-Turner-Syndrom auch eine Differentialdiagnose dar und muss infolgedessen abgegrenzt werden.

Wie oben schon erwähnt, haben Opitz und Pallister im Jahre 1979 über den männlichen Patienten berichtet, der schon Kobylinski aufgefallen war, da er phänotypische Ähnlichkeiten zum Ullrich-Turner-Syndrom aufwies. So kam es, dass der Begriff „male Turner syndrome“, eingeführt von Flavell im Jahre 1943^{37,39,42,52,115}, immer häufiger in der Literatur zu finden war, obwohl das Ullrich-Turner-Syndrom sonst nur bei Frauen anzutreffen war. Des Weiteren waren auch Patientinnen aufgefallen, die zwar Ähnlichkeiten zum Ullrich-Turner-Syndrom zeigten, aber einen normalen Karyotyp hatten.

1963 untersuchten Noonan und Ehmke 835 Kinder mit angeborenen Herzfehlern. Dabei fiel ihnen eine kleine Subpopulation von neun Kindern (sechs Jungen und drei Mädchen) auf, die eine Kombination von

Einleitung

supravalvulärer Pulmonalstenose, Minderwuchs und dysmorphen Stigmata zeigten, wie Hypertelorismus, Ptosis, geringe mentale Retardierung, nicht deszendierte Hoden und Skelettanomalien.⁸⁰ Damals sprachen sie von einem „neuen Syndrom“, das nicht nur männliche Patienten, sondern auch weibliche Patientinnen betreffe. Des Weiteren wiesen sie darauf hin, dass sich dieses Syndrom klinisch und ätiologisch vom echten Turner Syndrom unterschiede. 1968 veröffentlichte Noonan eine weitere Arbeit mit neunzehn Patienten (zwölf Männer und sieben Frauen), in der sie deutlich machte, dass die charakteristischen ähnlichen Gesichtsmerkmale in Kombination mit Minderwuchs und Herzfehlern ein eigenes Syndrom darstellten, das sowohl bei Männern als auch bei Frauen auftreten könnte.⁷⁹ Unter diesen Patienten wiesen 17 eine Pulmonalstenose und zwei einen persistierenden Ductus Botalliauf.

Auf Vorschlag von Mendez und Opitz⁷² und Summitt et al.¹¹⁸ wurde schließlich 1965 der Name „Noonan-Syndrom“ eingeführt, um weitere Missverständnisse zu vermeiden, und um Noonan's Erkenntnis zu würdigen, das Syndrom vom Turner-Syndrom zu unterscheiden.

Im Rahmen dieser Entdeckung realisierte man, dass manchen Patientinnen mit normalem Karyotyp fälschlicherweise dem Turner- Syndrom zugeschrieben wurden, in Wirklichkeit aber das Noonan-Syndrom aufwiesen.

1.1.3 Differentialdiagnose Ullrich-Turner-Syndrom

Wie in vorangehenden Kapiteln schon erwähnt, stellt das Ullrich-Turner-Syndrom bezüglich seiner phänotypischen Ähnlichkeiten, welche insbesondere im Pterygium colli, dem tiefen Haaransatz und dem Kleinwuchs zu sehen sind, eine Differentialdiagnose zum Noonan-Syndrom dar.

Der grundlegende Unterschied ist im Karyotyp zu sehen. Beim Noonan Syndrom ist ein normaler Chromosomensatz (46, XX oder 46, XY) vorhanden, wohingegen das Ullrich-Turner-Syndrom in 60% der Fälle einen Karyotyp von

Einleitung

45, X0 aufweist, welcher 1959 von Ford et al. bei Patientinnen mit Ullrich-Turner-Syndrom entdeckt wurde.³⁸

Dieser typische Karyotyp entsteht durch den frühzeitigen Verlust eines X-Chromosoms bei einer normalen Zygote, welches beispielsweise durch „non-disjunctions“ (Nichtauseinanderweichen zweier homologer Chromosomenpaare in der Anaphase der ersten oder zweiten meiotischen Teilung) verursacht werden kann. Dem hinzuzufügen ist, dass variable Mosaik mit einer Häufigkeit von 34% bei Patientinnen mit Ullrich-Turner-Syndrom auftreten können.⁹⁶ Des Weiteren ist das Noonan-Syndrom sowohl beim männlichen als auch beim weiblichen Geschlecht vorzufinden, beim Ullrich-Turner-Syndrom ist jedoch aufgrund des Karyotyps nur das weibliche Geschlecht betroffen. Einen weiteren Aspekt stellt die Gonadendysgenese dar, die nur beim Ullrich-Turner-Syndrom vorhanden ist. Darüber hinaus ist das Noonan-Syndrom oft mit einem Herzfehler, der Pulmonalstenose, verbunden. Beim Ullrich-Turner-Syndrom gehören die Herzfehler zu den eher seltenen Symptomen und stellen dann typischerweise Aortenisthmusstenosen dar.

Auffallend ist, dass der Kleinwuchs bei Patientinnen mit dem Ullrich-Turner-Syndrom weitaus ausgeprägter ist, denn nur 50% der Noonan-Patienten weisen einen echten Kleinwuchs mit Körpergrößen unterhalb der dritten Perzentile auf. Auch im Rahmen der Sexualentwicklung zeigen sich Unterschiede. Beim Noonan-Syndrom ist die Pubertät verzögert. Das Ullrich-Turner-Syndrom weist demgegenüber eine ausbleibende Pubertät bei Gonadendysgenese auf.

1.1.4 Dem Noonan-Syndrom ähnliche Syndrome

Über die bereits beschriebenen Ähnlichkeiten zum Ullrich-Turner-Syndrom hinaus gibt es noch weitere Erkrankungen, die sich oft nicht einfach vom Noonan-Syndrom abgrenzen lassen. Hierbei bestehen Assoziationen des *PTPN11*-Gens zu mehreren, dem Noonan-Syndrom ähnlichen Syndromen. Dazu gehört unter anderem das Leopard-Syndrom, das ein Akronym für folgende Symptome in Kombination darstellt, die Gorlin et al.⁴⁵ auflisten:

Einleitung

„lentigenes, electrocardiographic conduction abnormalities, ocular hypertelorism, pulmonary stenosis, abnormal genitalia, retardation of growth, sensorineural deafness“ (OMIM 151100). Bei diesem Syndrom liegt eine autosomal-dominante Vererbung vor. Die Hauptkennzeichen dieses Syndrom sind in der Kombination von multiplen Lentigenes und kongenitalen Herzfehlern zu sehen. Darüber hinaus stellte Digilio et al.³⁰ 2002 fest, dass die Ursachen vom Leopard-Syndrom ebenfalls in Mutationen im *PTPN11*-Gen zu sehen sind und somit nicht nur phänotypische, sondern auch genotypische Parallelen zum Noonan-Syndrom vorhanden sind.

Die speziellen Pigmentstörungen der Haut wurden schon bei beiden Syndromen beschrieben. Hierbei weist das Noonan-Syndrom pigmentierte Naevi und Café-au-lait-Flecken auf, wohingegen sich das Leopard-Syndrom anfangs mit Café-au-lait-Flecken manifestiert und im Alter von fünf bis sechs Jahren generalisierte multiple Lentigenes auftreten.⁴⁴ Dabei zeigten die Autoren eine spezifische, häufig mit diesem Phänotyp auftretende Mutation (Y279C) im *PTPN11*-Gen auf, die bisher noch bei keinem Noonan-Patienten nachgewiesen wurde und wahrscheinlich die Pigmentstörungen bedingt.³⁰

Darüber hinaus besteht eine klinische Überlappung des Noonan-Syndroms mit der Neurofibromatose Typ I, die unter anderem von Allanson et al. berichtet wurden.⁵ Allanson et al. untersuchten vier Patienten, die die Diagnose der Neurofibromatose aufwiesen und klinische Merkmale des Noonan-Syndroms einschließlich Minderwuchs, Ptosis, Auffälligkeiten im Bereich des Gesichts, Pterygium colli, Lernschwierigkeiten und Muskelschwäche zeigten. Die Untersuchung der Chromosomen zeigte bei drei Patienten keine Auffälligkeiten, so dass die Autoren vermuteten, dass es sich um ein eigenständiges Syndrom handle.

Es existiert auch die Bezeichnung Neurofibromatose-Noonan-Syndrom, wobei noch unklar ist, ob es sich hierbei um ein eigenes Syndrom (Watson-Syndrom OMIM 193520) handelt oder ein besonderer Teilaspekt des Noonan-Syndroms vorliegt. Bisherige Untersuchungen konnten jedoch keine Mutationen im Bereich des *PTPN11*-Gens bei Patienten mit Neurofibromatose und klinischen Merkmalen des Noonan-Syndroms aufzeigen, sondern nur Mutationen im

Einleitung

Neurofibromatose-1-Gen (NF-1-Gen). Eine Kopplung mit dem Noonan-Phänotyp wurde ausgeschlossen.¹⁰⁹

Das Leopard-Syndrom weist hierbei sowohl ähnliche Merkmale zum Noonan-Syndrom, als auch zur Neurofibromatose auf. Dies betrifft insbesondere die Hauterscheinungen der Neurofibromatose, einer autosomal-dominanten Tumorerkrankung, welche sich in erster Linie durch gutartige Tumore auf der Haut und /oder am Nervensystem äußert. Bei der Neurofibromatose vom Typ I liegt ein Defekt am Chromosom 17 vor. Hierbei wird der Defekt durch eine Mutation des NF-1-Gens, einem Tumorsuppressorgen, verursacht, welches auf dem langen Arm von Chromosom 17 (17q11.2) lokalisiert ist. Das Genprodukt vom NF-1-Gen ist Neurofibromin, das regulatorische Funktionen bei der Differenzierung neuroektodermaler und mesenchymaler Zellen hat.

Die Kardinalsymptome der Neurofibromatose Typ I sind in den Café-au-lait-Flecken, den Neurofibromen, der Skoliose und in den Optikusgliomen zu sehen. Schließlich gibt es noch das Cardio-Facio-Cutane-Syndrom (CFC-Syndrom), welches 1986 erstmals von Reynolds et al.¹⁰⁰ bei acht Patienten beschrieben wurde.

Dieses Syndrom weist starke phänotypische Ähnlichkeiten zum Noonan-Syndrom auf, unterscheidet sich aber durch die vorhandenen ektodermalen Auffälligkeiten (trockene Haut, Alopezie, hyperkeratotische Läsionen) und der schweren mentalen Retardierung. Darüber hinaus weist das CFC-Syndrom kongenitale Herzfehler, wie die Pulmonalstenose und Vorhofseptumdefekte auf, und zeigt auch einen Minderwuchs.

Dennoch konnten bis jetzt keine Mutationen im *PTPN11*-Gen bei Patienten mit dem CFC-Syndrom nachgewiesen werden.^{57,77}

1.2 Genetische Grundlagen

1.2.1 Lokalisierung des Noonan-Syndroms

Die meisten Fälle des Noonan-Syndroms treten sporadisch auf, das heißt die Eltern weisen keinerlei Hinweise auf Symptome des Noonan-Syndroms auf. Liegt eine familiäre Häufung vor, so unterliegt diese in der Mehrheit der Fälle

Einleitung

einem autosomal-dominanten Erbgang mit einem Vorherrschen der mütterlichen Übertragung.^{9,27,59,80,124} Dennoch findet man in der Literatur auch Beispiele für einen autosomal-rezessiven Erbgang^{22,127}, was die Annahme einer genetischen Heterogenität bestätigt. Diese Annahme wird auch durch das Vorhandensein von Patienten autosomal-dominanter Herkunft ohne Verbindung zur 12q24-Region betont.⁵⁹

Jamieson et al.⁵⁹ und Brady et al.²² stellten mit Kopplungsanalyse einer über drei Generationen hinweg gehenden holländischen Familie, einen Locus für das Noonan-Syndrom verursachende Gen auf dem langen Arm von Chromosom 12 fest. Der Locus wurde dann weiter auf eine 5 centiMorgan (cM) Region auf Chromosom 12q24.1 (Locus 24 auf dem kurzen Arm (q) von Chromosom 12) eingeschränkt.

Im November 2001 publizierten Tartaglia et al.¹²³, dass die Ursache des Noonan-Syndroms in Mutationen auf der *PTPN11* (OMIM 176876), einem Gen, welches die zytosolische Phosphotyrosin-Phosphatase SHP-2 (src homology region-2 domain phosphatase 2) codiert, zu suchen ist. Sie zeigten auf, dass Mutationen in diesem Bereich bei 40 bis 50% der untersuchten Fälle vorhanden sind.

1.2.2 Das *PTPN11*- Gen

Allgemein betrachtet bilden die Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPasen) in hohem Maße pleomorphe Proteine, die an Regulationsprozessen zellulärer Antworten auf extrazelluläre Signale beteiligt ist.^{23,90}

Die PTPasen wurden aufgrund ihrer charakteristischen und ähnlichen katalytischen Domänen-Sequenzen zusammengruppiert, die diese Gruppe definieren. Darüber hinaus werden die PTPasen in zwei Kategorien aufgeteilt: in die transmembranöse Rezeptor-PTPase und in die intrazelluläre PTPase.²⁹

Die erste „src homology 2“ (SH2)-Domäne bei Säugetieren, die eine PTPase enthielt, wurde als PTP1C definiert, für die dann das Gensymbol *PTPN6* (OMIM 176883) eingeführt wurde.¹¹⁰ Die zweite SH2-Domäne wurde dann mit dem

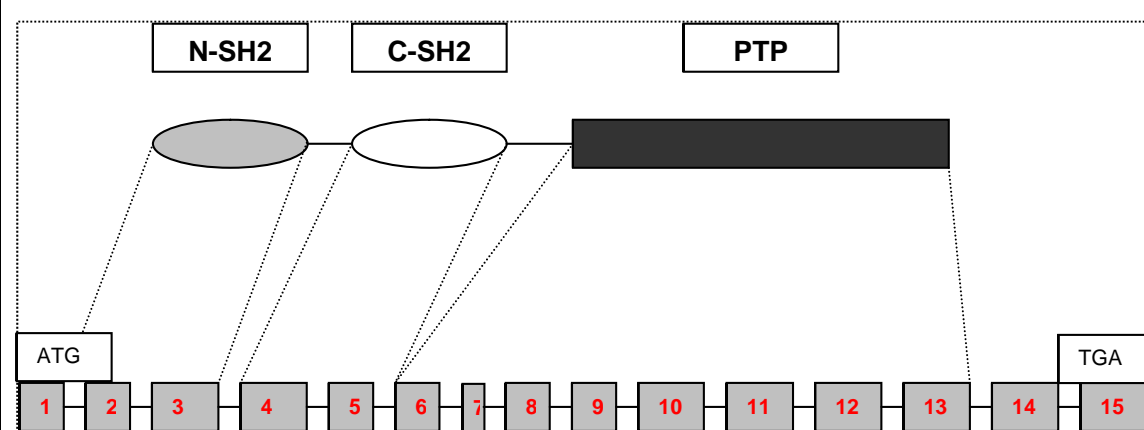
Einleitung

Symbol *PTPN11* versehen und auf dem Chromosomenbereich 12q24.1-24.3 nachgewiesen.²⁹

Das *PTPN11*-Gen (Protein-Tyrosin-Phosphatase Non-Rezeptor-Typ11) ist auf dem Chromosom 12q24.1 lokalisiert und umfasst 15 Exons. Es wird im menschlichen Gewebe exprimiert, insbesondere im Herzen, Gehirn und Skelettmuskel.^{1,11} Des Weiteren codiert es für die zytosolische Phosphotyrosin-Phosphatase (SHP-2).

Die drei charakteristischen Domänen der SHP-2 erstrecken sich über N-SH2 (amino-terminal src-homology 2), C-SH2 (carboxy-terminal src-homology 2) und PTP (phosphotyrosin phosphatase) (Abbildung 1). Somit enthält dieses Gen zwei „Src homology 2“ (SH2) Domänen und eine enzymatisch aktive Phosphorylase-Domäne. Diese SH2-Domänen sind in der Lage, an Phosphotyrosingruppen anderer Proteine zu binden.

Abbildung 1: *PTPN11*-Gen



modifiziert nach Tartaglia et al., 2001¹²³

Dieses Bild stellt den Aufbau des *PTPN11*-Gens dar. Darüber hinaus werden auch die charakteristischen Domänen N-SH2, C-SH2 und PTP aufgezeigt, sowie die entsprechenden 15 Exons aus denen das *PTPN11*-Gen besteht. ATG ist das Startcodon und TGA stellt das Stoppcodon dar.

Die Funktion von SHP-2 liegt in der Beteiligung an der zellulären Antwort bei einer Reihe von Wachstumsfaktoren, Hormonen, Zelladhäsions-Molekülen und Zytokinen.^{116,119} Darüber hinaus ist sie auch an der semilunaren Klappengeneese beteiligt.^{24,29,36} Des Weiteren spielt SHP-2 auch eine Rolle bei

Einleitung

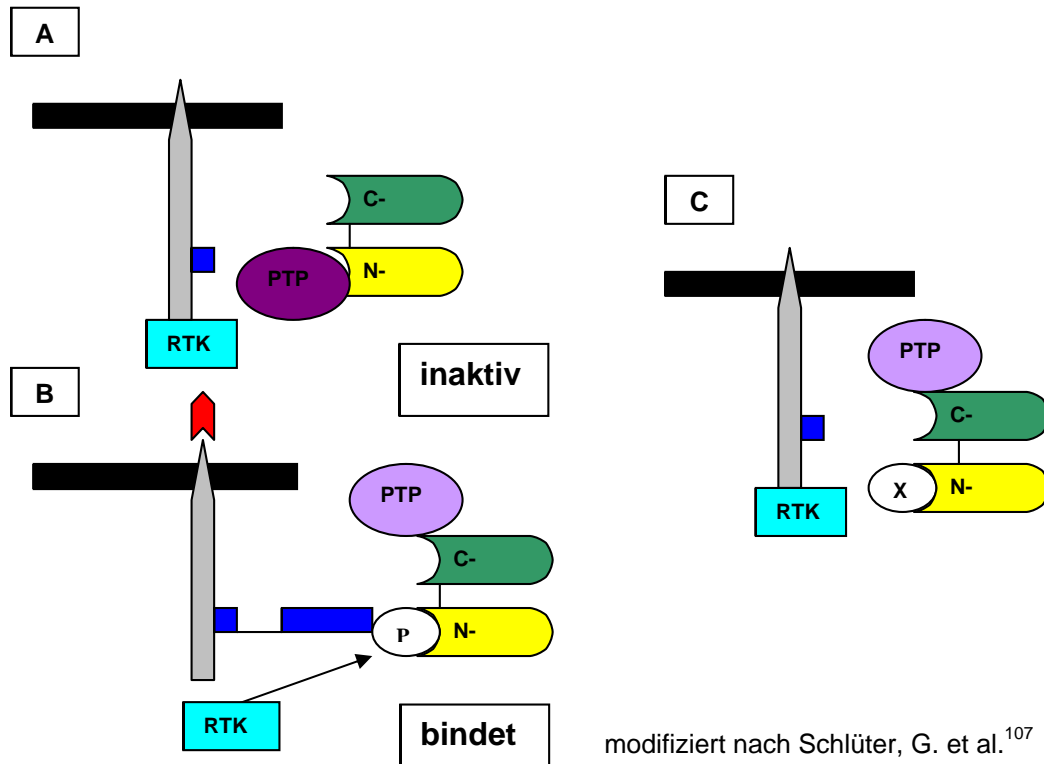
der Bildung des Mesoderms,¹²¹ bei der Gliedmaßenentwicklung¹⁰⁶ und bei der hämatopoetischen Zelldifferenzierung.^{92,93}

Eine wichtige Rolle spielt die JAK-STAT-Signalkaskade, welche als intrazellulärer Signalweg von einer Vielzahl von Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren genutzt wird. Als Beispiele sind hier die Wachstumshormone,⁴⁹ Interferone⁷³ und Prolaktin¹²⁸ zu nennen.

Bindet ein Ligand an den Wachstumshormonrezeptor, wird dadurch eine Homobeziehungsweise Heterodimerisierung des Rezeptorkomplexes ausgelöst. Dies hat eine Autophosphorylierung der Janus Kinase 2 (JAK2: eine GH-Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinase) zur Folge, die wiederum zu dessen Aktivierung führt. Die aktivierte JAK2 bedingt dann eine Phosphorylierung von Tyrosinresten der zytoplasmatischen Rezeptordomänen und unter anderem des Signal Transducer and Activator of Transcription 5-Proteins (STAT5).¹³⁰ Diese phosphorylierten Tyrosine bilden dann Bindungsstellen für diverse Phosphotyrosinbindungsdomänen, die Signalmoleküle einschließlich SHP-2 besitzen.⁸

Die Grundfunktion von SHP-2 wird sichergestellt durch die Interaktion von der N-SH2- und der PTP-Domäne, indem sie das katalytische Zentrum blockieren, welches durch Bindung eines Phosphotyrosyl-Restes an die N-SH2-Domäne aktiviert wird⁵⁵ (Abbildung 2). Im aktiven Zustand dephosphoryliert SHP-2 dann in der Signalkaskade distal liegende Faktoren, wie zum Beispiel die Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAP-Kinasen) oder STAT-Proteine (Signal-Transducers-and-Activators-of-Transcription). Auf diese Weise wirkt die N-SH2-Domäne wie ein molekularer Schalter, indem sie SHP-2 aktivieren und inaktivieren kann.

Abbildung 2: Modell über die Regulation der SHP-2-Aktivität



A: Hier ist das SHP-2-Molekül abgebildet, das aus zwei SH2-Domänen besteht: C-SH2 (grün) und N-SH2 (gelb). Des Weiteren sieht man die Phosphorylase-Domäne PTP (dunkellila). Im Grundzustand ist eine Inaktivierung der PTP-Domäne vorhanden, da sie an die N-SH2-Domäne gebunden ist. In Grau ist hier der membranständige Rezeptor dargestellt, der ohne Ligandenbindung nicht phosphoryliert ist. RTK: Rezeptor-Tyrosin-Kinase.

B: Durch die Bindung eines Liganden, der hier rot dargestellt ist, erfolgt eine Phosphorylierung des Rezeptors durch die RTK. Danach kann eine Bindung der Phosphor-Tyrosinreste (blau) an die SH2-Domänen von SHP-2 erfolgen und über eine Aktivierung der eigenen PTP-Domäne (helllila) der Rezeptor wieder dephosphoryliert werden.

C: Sind Mutationen, als X symbolisiert, im N-terminalen Teil der SH2-Domäne vorhanden, verhindern diese eine Interaktion mit der PTP-Domäne, wobei das Protein konstitutiv aktiv ist.

Als pathologischer Mechanismus fungiert eine konstitutionelle SHP-2 Aktivität in Abwesenheit eines Bindungpartners.

Auffallend bei Tartaglia et al.¹²³ war, dass sich die Mutationen des *PTPN11*-Gens im interagierenden N-SH2-Bereich und im Bereich der Phosphotyrosin-Phosphatase sammelten, welche sozusagen die Änderung der Konformation vom inaktiven in den aktiven Zustand favorisieren. Dabei hatten Tartaglia et al.

Einleitung

herausgefunden, dass beispielsweise im Exon 3 eine G→T-Transversion bei Position 214 erfolgt ist, was den Austausch der Aminosäure Alanin72 zu Serin (Ala72Ser) in der N-SH2-Region bedingt. Weitere Mutationen, die von Tartaglia et al. identifiziert wurden, sind wie folgt in der Tabelle 1 festgehalten.

Tabelle 1: Von Tartaglia et al. identifizierte Mutationen

Basenaustausch	betreffendes Exon	Aminosäurewechsel	funktionelle Domäne
A182G	3	Asp61Gly	N-SH2
A188G	3	Tyr63Cys	N-SH2
G214T	3	Ala72Ser	N-SH2
C215G	3	Ala72Gly	N-SH2
G223C	3	Glu76Asp	N-SH2
A236G	3	Gln79Arg	N-SH2
A844G	7	Ile282Val	PTP
A922G	8	Asn308Asp	PTP
A1510G	10	Met504Val	PTP

modifiziert nach Tartaglia et al.,2001¹²²

Von weiterer Bedeutung ist die Tatsache, dass die aktivierte SHP-2 eine Rolle bei der Down-Regulierung der Signaltransduktionswege von Wachstumshormonen spielt und somit als negativer Regulator fungiert.¹¹⁷ Stofega et al. zeigten, dass die C –und N-Bereiche der SH2-Domäne der SHP-2 direkt mit dem tyrosylphosphorylierten Wachstumshormonrezeptor (GHR) von wachstumshormonaktivierten Zellen verbunden sind und Mutationen im Bereich von SHP-2 eine Verlängerung der Tyrosyl-Phosphorylierung von SHP-2 bedingen, die dann eine negative Regulierung im Bereich der Signaltransduktionen von Wachstumshormonen zur Folge haben.¹¹⁷

1.3 Endokrinologische Grundlagen

1.3.1 Human Growth Hormone (hGH)

Für die Diagnostik von Wachstumshormonstörungen hat sich in der Endokrinologie die routinemäßige Messung der IGF-1 –und IGFBP-3-Serumspiegel als Screening-Methode durchgesetzt.^{19,50} Darüber hinaus können Stimulationstests wie beispielsweise Arginin- und Insulintoleranztests zur Messung der stimulierten Wachstumshormonsekretion die Diagnose eines WH-Mangels erhärten.^{2,48,94} Das menschliche Wachstumshormon, das unter anderem auch die Bezeichnung human Growth Hormone (hGH) oder Somatotropin (STH) trägt, besteht aus 191 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 21500 Dalton und ist artspezifisch.⁶⁴ Bildung und Speicherung der Wachstumshormone vollziehen sich in den azidophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens, während die Elimination in der Niere, Leber und in den peripheren Geweben stattfindet.⁷⁶ Hierbei handelt es sich um eine pulsatile Ausschüttung der Wachstumshormone, welche einer zirkadianen Rhythmik unterliegt und ihr Maximum während des Tiefschlafes hat.

Die Gene für die Wachstumshormone sind auf Chromosom 17 zu finden.⁷⁶ Ein weiterer Aspekt ist, dass die Sekretion der Wachstumshormone unter dem Einfluss der im Hypothalamus gebildeten Hormone Somatoliberin (Growth Hormone-Releasing Hormone, GHRH) und Somatostatin (Growth Hormone Release-Inhibiting Hormone, GHRH) steht. Dabei wirkt GHRH stimulierend und GHRH hemmend auf die Freisetzung der im Hypophysenvorderlappen gebildeten Wachstumshormone. Im Blut ist GH an einem spezifischen Bindungsprotein (Growth Hormone Binding Proteine, GHBP) gebunden, das die extrazelluläre Domäne des membranständigen GH-Rezeptors darstellt. Letzendlich liegen aber nur ungefähr 50% der im Blut zirkulierenden Wachstumshormone in gebundenem Zustand vor.^{12,13,89}

Die direkte Wirkung der menschlichen Wachstumshormone auf das Längenwachstum erfolgt durch die Stimulierung der Prächondrozyten-Proliferation im Bereich der Wachstumsfugen.^{84,131} Dabe wirken vor allem die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren auf das Längenwachstum.¹³¹

1.3.2 Insulinähnliche Wachstumsfaktoren (Insulin-like Growth Factors) und die zugehörigen Bindungsproteine

Innerhalb der Wachstumsfaktoren gibt es Polypeptide, die direkt fördernd auf das Wachstum einwirken. Dies sind im Speziellen die Insulin-like Growth Factors IGF-1 und IGF-2, die bisher beim Menschen nachgewiesen wurden. Man nennt sie auch Somatomedine. Dabei sind diese Peptide in ihrer Struktur dem Proinsulin sehr ähnlich.

IGF-1 setzt sich aus 70 und IGF-2 aus 67 Aminosäuren zusammen¹⁰¹ und darüber hinaus entspricht IGF-1 dem Somatomedin C.^{17,63}

IGF-1 ist auf dem Chromosom 12 lokalisiert und bezüglich der Anregung zur Transkription von IGF-1 ist die Wirkung des Wachstumshormons verantwortlich. Außerdem besteht heutzutage die Möglichkeit der gentechnischen Herstellung von IGF-1.

IGF-2 ist auf Chromosom 11¹⁷ codiert, hat aber in Bezug auf das Längenwachstum eine geringere Bedeutung als IGF-1.

Die Stimulierung zur Bildung der Insulin-like Growth Factors erfolgt durch die Wachstumshormone und hat ein relativ konstantes zirkadianes Sekretionsprofil, dennoch besteht in den frühen Morgenstunden eine erniedrigte Konzentration.¹²⁵

Die meisten IGFs sind an spezifische Proteine (Insulin-like growth factor binding proteins, IGFbps) gebunden.⁵³ Bisher gibt es sechs verschiedenen IGF-Bindungsproteine^{85,111} mit der Bezeichnung IGFBP-1 bis IGFBP-6.¹⁰ Sie schützen vor einem enzymatischen Abbau der IGFs und verlängern somit die Wirkungsdauer der IGFs.

Der Hauptbildungsort der Insulin-like growth factor binding proteins ist die Leber, daneben findet auch eine Bildung in anderen Geweben statt.^{6,113} Nach der Geburt stellt IGFBP-3 das wichtigste Bindungsprotein für IGF-1 und IGF-2 dar.^{20,50} Dabei besteht eine nicht lineare Korrelation des IGFBP-3-Serumspiegels zur IGF-1-Konzentration.⁷ Darüber hinaus eignet sich IGFBP-3 als Parameter zur Kontrolle der GH-Substitution.¹⁹

1.3.3 Rekombinantes human Growth Hormone (rhGH)

Heutzutage ist man in der Lage Wachstumshormone gentechnologisch herzustellen. Dadurch kann man das rekombinante Wachstumshormon, das die gleiche biologische Aktivität wie hGH hat und unter der Verwendung des Bakteriums *Escherichia coli*⁴³ im Rahmen eines Gentransfers hergestellt wird, als Substitutionstherapie in physiologischer Dosierung bei kleinwüchsigen Kindern einsetzen.^{16,97} Die Methode der biosynthetischen Herstellung von Wachstumshormonen ist seit 1987 in Deutschland zugelassen.⁹⁸

Die subkutane Applikation der Wachstumshormone sollte aufgrund des zirkadianen physiologischen Sekretionsprofils abends erfolgen.^{54,61} Die maximale Plasmakonzentration wird zwei bis sechs Stunden nach der Applikation erreicht, wobei tatsächlich nur 60-75% des applizierten rekombinanten Wachstumshormons resorbiert werden.¹⁴ Das Vorliegen einer Wachstumshormonresistenz, die ihre Ursache in der Rezeptorinsuffizienz für das Wachstumshormon^{46,67} oder in Störungen der IGFs und der Bindungsproteine¹⁰² haben könnte, führt zu einer Beeinträchtigung der Therapie. Des Weiteren gibt es auch Fälle von Antikörperbildungen gegen bestimmte Wachstumshormonpräparate.¹⁵

Als mögliche Nebenwirkung ist ein diabetogener Effekt mit relativer Insulinresistenz und einem sekundären Hyperinsulinismus beschrieben, der sich aber innerhalb eines halben Jahres wieder normalisiert und somit als gering einzuschätzen ist.^{26,28,41}

1.4 Fragestellung und Vorgehensweise

Die Entdeckung des PTPN11-Gens als Ursache für das Noonan-Syndrom bei ungefähr der Hälfte aller Patienten, ermöglicht nun die molekulargenetische Untersuchung bei einem bestehenden Verdacht auf das Noonan-Syndrom.

In dieser Arbeit soll das Noonan-Syndrom bei Patienten an der Universitäts-Kinderklinik Tübingen im Hinblick auf eine Genotyp-Phänotyp Korrelation untersucht und diskutiert werden. Die Untersuchung des Genotyps erfolgt über

Einleitung

eine vorangehende PCR-Etablierung und anschließende Sequenzierung der Patienten-DNA. Dabei steht insbesondere die nähere Untersuchung des PTPN11-Gens auf Mutationen in den einzelnen Exons im Fokus. Der Phänotyp wird retrospektiv anhand der vorhandenen Akten bearbeitet und anschließend mit den vorhandenen Ergebnissen des Genotyps in Zusammenhang gesetzt. Dabei werden die klinischen Merkmale, die auxologischen Daten und die GH-IGF-1-Achse der mutationspositiven und mutationsnegativen Patienten miteinander verglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Patientendaten

Für diese Studie wurden die Daten aller Kinder, die sich in den letzten fünf Jahren mit Kleinwuchs und mindestens drei für das Noonan-Syndrom typischen Anomalien oder einer Pulmonalstenose vorstellten, miteinbezogen.^{32,59} Bei der untersuchten Gruppe handelte es sich um 29 Kinder. Darunter waren zwei Geschwisterpaare und zehn weibliche Patientinnen.

Zu den typischen Anomalien zählen der Hypertelorismus, die Ptosis und die tief angesetzten, malrotierten Ohren.

Alle Anomalien wurden systemisch beobachtet und nach Duncan et al. aufgezeichnet.³²

Die Untersuchung des Herzen erfolgte mittels EKG und Echokardiographie. Die Körpergröße wurde unter Verwendung eines Stadiometers ermittelt und in einem Höhen Standard-Deviation-Score (SDS) nach Prader et al.⁹¹ ausgedrückt. Der SDS gibt eine Relation zwischen der tatsächlichen und der zu erwartenden Größe des Parameters Körpergröße als Vielfaches der zugehörigen Standardabweichung an. Die Geburtslänge und das Geburtsgewicht wurden in Standard-Deviation-Scores entsprechend Niklasson et al.⁷⁸ abgebildet.

Des Weiteren wurde die Größe aller Eltern aufgenommen, wobei ein Patient adoptiert war. Es muss erwähnt werden, dass die DNA und die Syndromatologie der Eltern nicht systematisch untersucht wurde. Eine Einverständniserklärung lag von allen Eltern, Erziehungsberechtigten und allen untersuchten Patienten vor.

Zufällig wurden vier Patienten unabhängig auch von Zenker et al. untersucht und in ihre Studie aufgenommen.¹³³

2.1.2 Reagenzien

- Ampuwa Fresenius AG, Bad Homburg, D
- Agarose SERVA, Heidelberg, D
- Bidest
- Desoxynukleotidtrisphosphate Promega Madison, USA
- Ethanol 70 % Carl Roth, Karlsruhe, D
- Ethidiumbromid Merck, Darmstadt, D
- Ethylendiamintetracetat (EDTA) Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
- Ladepuffer peQLab, Erlangen, D
- MgCl peQLab, Erlangen, D
- MilliQ-Wasser Millipore, Schwalbach, D
- Molekulargewichtsmarker peQLab, Erlangen, D
- Proteinase K-Lösung Macherey-Nagel, Düren, D
- Puffer BQ1 Macherey-Nagel, Düren, D
- Puffer BQ2 Macherey-Nagel, Düren, D
- Puffer BE Macherey-Nagel, Düren, D
- Q-Solution peQLab, Erlangen, D
- Reaktionspuffer Quiagen, Venlo, Niederlande
- SephadexG 50 Amersham, Cleveland, USA
- SDS (Sodiumdodecylsulfat) 1,1%
- TBE-Puffer (108 g TRIS,
70,9 g Borsäure, 7,44 g EDTA-Dinatrium)

2.1.3 Enzyme

- Taq-Polymerase peQLab, Erlangen, D

2.1.4 Verwendete Primer

Für die PCR-Amplifikation und die direkte Sequenzierung von allen Exons wurden Primer verwendet, die kürzlich von Tartaglia et al.¹²² veröffentlicht wurden.

Tabelle 2: Primer von Tartaglia et al.¹²²(veröffentlicht Mai 2002)

Exon	Vorwärts (5'→3'-Richtung)	Rückwärts (3' →5'-Richtung)
1	GCTGACGGGAAGCAGGAAGTGG	CTGGCACCCGTGGTTCCCTC
2	ACTGAATCCCAGGTCTCTACCAAG	CAGCAAGCTATCCAAGCATGGT
3	CGACGTGGAAGATGAGATCTGA	CAGTCACAAGCCTTTGGAGTCAG
4	AGGAGAGCTGACTGTATACAGTAG	CATCTGTAGGTGATAGAGCAAGA
5	CTGCAGTGAACATGAGAGTGCTTG	GTTAAGCTGCAATGGGTACATG
6	TGCATTAACACCGTTTTCTGT	GTCAGTTTCAAGTCTCTCAGGTC
7	GAACATTTCTAGGATGAATTCC	GGTACAGAGGTGCTAGGAATCA
8	GACATCAGGCAGTGTTACGTTAC	CCTTAAAGTTACTTTCAGGACATG
9	GTAAGCTTTGCTTTTCACAGTC	CTAAACATGGCCAATCTGACATGTC
10	GCAAGACTTGAACATTTGTTTGTTC	GACCCTGAATTCCTACACACCATC
11	CAAAGGAGACGAGTTCTGGGAAC	GCAGTTGCTCTATGCCTCAAACAG
12	GCTCCAAAGAGTAGACATTGTTTC	GACTGTTTTCGTGAGCACTTTC
13	CAACACTGTAGCCATTGCAACA	CGTATCCAAGAGGCCTAGCAAG
14	ACCATTGTCCCTCACATGTGC	CAGTGAAAGGCATGTGCTACAAAC
15	CAGGTCCTAGGCACAGGAAGTGC	ACATTCCCAAATTGCTTGCCT

modifiziert nach Tartaglia et al.¹²²

Zusätzlich wurden folgende Primer herangezogen:

Tabelle 3: Zusätzliche Primer

Exon	Vorwärts (5'→3'-Richtung)
2	5'-TCTACTCTGCTCATAATGCGTCT-3'
3	5'-GGTAAATTCGTTCCCTTGGG-3' 5'-ATAACTGGTCGAGAGCCACC-3' 5'-CAGTCACAAGCCTTTGGAGTCAG-3'
4	5'-GTCATTCTTACCATCTTTGTG-3' 5'-CTTTGAATGTAATGGTGTTC-3'
7	5'-CAAGAGCACACGACCCTGAG-3'

Material und Methoden

8	5'-GAATTTTCTTGACCTTCTCTGAG-3' 5'-GGGCTTTGAATTGTTGCAC-3'
13	5'-CTGCCACTTCGTTATTTATG-3' 5'-CAGTTGTCTATCAGAGCCT-3'

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

- ABI Big Dye Sequencing Kit Applied Biosystems, Foster City
- 96 well – Filterplatten Millipore, Schwalbach, D
- 96 well Platten Abgene, Hamburg, D
- Kit Nucleo Spin® Blood XL Macherey-Nagel, Düren, D
- Micro-AMP-Caps Applied Biosystems, Foster City, USA
- Micro-AMP-Tubes Applied Biosystems, Foster City, USA
- PCR tubes Roche, Mannheim, D
- Pipettenspitzen Eppendorf, Hamburg, D

2.1.6 Geräte

- ABI 3100 Capillary Sequencer Applied Biosystems, Foster City, USA
- Gelkammer Bio-Rad, München, D
- PCR System 9700 Applied Biosystems, Foster City, USA
- Pipetten Eppendorf, Hamburg, D
- Pipettierhilfe Tecuomeora, Zürich, CH
- Photometer RNA/DNA Kalkulator Amersham Biosciences, New Jersey, USA
- Quarzpräzisionsküvetten Hellma, Müllheim, D
- Schüttler Bühler, Düsseldorf, D
- Spannungsgeber Powerpac 200 Bio-Rad, München, D

Material und Methoden

- | | |
|---------------------------|------------------------|
| • Thermocycler | Biometra, Göttingen, D |
| • Thermomixer 5436 | Eppendorf, Hamburg, D |
| • UV-Platte | Saur |
| • Vortexgerät | Bohemia, New York, USA |
| • Wasserbad | Memmert, Schwabach, D |
| • Zentrifuge Rotixa 50 RS | Hettich, Tuttlingen, D |

2.2. Methoden

2.2.1 Sichtung der Patienten

Den Patienten wurde im Rahmen einer Routinekontrolle peripher Blut abgenommen, welches dann bei -20°C aufbewahrt wurde. Nach dem Wiederauftauen des Blutes wurde die genomische DNA zur näheren Untersuchung initial unter Verwendung des NucleoSpin® Blood XL-Kits aus den Leukozyten isoliert. Die Konzentration der DNA wurde photospektrometrisch bestimmt. Unter Anwendung der PCR-Methode wurde zum einen für jedes einzelne Exon die optimale PCR-Bedingung geschaffen und zum anderen die einzelnen Bereiche des Genes für die anschließende Sequenzierung der Exons vervielfältigt. Das Ziel der Sequenzierung war die nähere Untersuchung des PTPN11-Gens auf Mutationen im Bereich der einzelnen Exons. Die Auswertung der Sequenzierreaktionen erfolgte unter Anwendung des Sequenzers 4.1, Software der Firma Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA.

Die einzelnen Untersuchungsschritte werden in den folgenden Kapiteln ausführlich dargestellt.

2.2.2 DNA-Isolierung

Bevor die nähere Untersuchung der genomischen DNA erfolgen konnte, wurde sie zuerst von Lymphozyten isoliert unter Nutzung des NucleoSpin® Blood XL-Kits von der Firma Machery-Nagel (Düren, D). Damit Kontaminationen durch

andere DNA vermieden werden konnte, stand hier das sterile Arbeiten im Vordergrund.

2.2.2.1 Reinigung der genomischen DNA

Vorab musste der Inkubator oder das Wasserbad auf 56°C erwärmt werden. Des Weiteren musste der BE Elutionspuffer gleichmäßig auf 70°C im Vorfeld erwärmt werden. Im nächsten Schritt wurden der BQ2 Puffer und die Proteinase Lösung K vorbereitet. Hierbei wurde zur BQ2-Pufferlösung 200 ml Ethanol hinzugefügt und die Proteinase K Lösung in 5,75 ml Proteinase Puffer gelöst.

Zur Lösung der Blutbestandteile wurden jeweils 5 ml Blut und 500 µl der Proteinase K Lösung in eine 50 ml Tube pipettiert. Anschließend wurden 5 ml des BQ1 Lysepuffers hinzugefügt und zehn Sekunden lang in einer Vortexmaschine gemischt. Danach wurden die Lösungen für 15 min bei 56°C inkubiert. Als Nächstes wurde durch das Hinzufügen von 5 ml Ethanol, welches wieder 10 Sekunden lang in einer Vortexmaschine gemischt wurde, die Bedingung dafür geschaffen die DNA bindungsfähig zu machen. Bevor die Lysate auf die NucleoSpin®Blood XL Säulen aufgetragen wurden, musste gewährleistet sein, dass die Lysate Raumtemperatur hatten, denn das Auftragen eines zu heißen Lysats kann zur Verminderung der Resultate führen. Für jede einzelne vorbereitete Lösung wurde eine NucleoSpin® Blood XL Säule verwendet, welche in eine 50 ml Zentrifugentube platziert wurde. Wichtig hierbei war, den Rand der Säule nicht zu berühren. Anschließend wurden die Tuben mit Deckeln versehen und bei 4000 x g fünf Minuten lang zentrifugiert.

Nach dieser Zentrifugierung erfolgte das erste Waschen der Lösungen. Dazu wurden 7,5 ml an BQ2-Puffer, das den Waschpuffer darstellt, in die NucleoSpin® Blood XL Säulen hinzugefügt und vier Minuten lang bei 4000 x g zentrifugiert. Zur zweiten Waschung wurden wieder 7,5 ml BQ2-Puffer hinzugefügt und zehn Minuten lang bei 4000 x g zentrifugiert. Danach mussten die Säulen vorsichtig aus der Zentrifuge entnommen werden, damit kein Kontakt zwischen der gefilterten Substanz und dem Bodensatz erfolgte.

Material und Methoden

Im letzten Schritt wurden die Säulen in neue 50 ml Sammelröhrchen eingefügt, 600µl des auf 70°C aufgewärmten BE-Elutionspuffers direkt auf die Mitte der Silikonmembranen aufgetragen und zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend erfolgte die Zentrifugierung bei 4000 x g für vier Minuten.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmungen der genomischen DNA

Nach der Extraktion der DNA wurde ihre Konzentration photometrisch bestimmt. Die Grundlage der Konzentrationsbestimmung von extrahierter DNA ist in den unterschiedlichen Absorptionsmaxima von DNA bei 260 nm und bei Proteinen 280 nm zu sehen. Dabei werden die beiden Absorptionsmaxima im Verhältnis zueinander betrachtet, um so das Maß des Reinheitsgrades der DNA oder des Verunreinigungsgrades mit Proteinen zu bestimmen. Der Normbereich liegt hierbei zwischen 1,7 und 2. Die Toleranzgrenze der Verunreinigung durch Proteine liegt bei < 1,7.

Die Messung der Konzentration erfolgte mit der optischen Dichte (OD). Dazu wurden vorab 30 µl DNA und 970 µl Wasser im Verhältnis 1 : 33,3 verdünnt, in 1 ml Präzisions-Quarzküvetten pipettiert und die optische Dichte bei 260 nm und 280 nm mit Wasser als Leerwert gemessen.

Zur Konzentrationsbestimmung wird folgende Absorptionseinheit (A^{260}) angewandt:

$$A^{260} = OD = 1 \text{ für } 50 \mu\text{g/ml DNA}$$

Die Formel zur Berechnung der Konzentration lautet:

$$\text{Konzentration [} \mu\text{l / } \mu\text{g]} = OD^{260} \times \frac{33,3 \times 5}{1000}$$

2.2.3 Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction = PCR)

Heutzutage stellt die Polymerase-Kettenreaktion eine der am häufigsten verwendeten Standardmethoden in der molekularbiologischen Diagnostik zur Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte dar.

Mullis gelang es 1986 erstmals, kleinste Mengen an DNA in-vitro so zu vervielfältigen, dass sie zum einen keiner vorherigen Klonierung unterworfen und zum anderen mit herkömmlichen Methoden nachzuweisen waren.⁷⁵

Im Hinblick auf die breit gefächerten Anwendungsmöglichkeiten zeigt sich, dass die Untersuchung der DNA in vielen Bereichen der Medizin unentbehrlich geworden ist. Sie dient beispielsweise Rechtsmedizinern zur Personenidentifikation, im therapeutischen Bereich zur Entwicklung von Medikamenten oder Impfstoffen, im diagnostischen Bereich zur genetischen Beratung oder zur Identifizierung von Infektionskrankheiten.

Jedes PCR-Reaktionsgemisch benötigt fünf Komponenten:

1. Ziel-DNA:

Voraussetzung für den Ablauf der PCR ist es, dass die zu amplifizierenden DNA-Sequenzen bekannt sind.

2. Oligonukleotide:

Sogenannte Primer, bestehend aus circa 15-20 Basen, die chemisch synthetisiert sind und sich jeweils komplementär zum gegenüberliegenden Einzelstrang verhalten.

3. DNA-Polymerase:

Enzym der DNA-Synthese. Durch Anlagerung der Desoxynukleosidtriphosphate synthetisiert die DNA-Polymerase einen komplementären Basenstrang in 5'-3'-Richtung. Das heute am häufigsten verwendete Enzym ist die Taq-Polymerase, benannt nach dem Bakterium *Thermus aquaticus*, das vorzugsweise in heißen Quellen lebt und dort Enzyme produziert, die selbst bei Temperaturen von 90-95°C stabil bleiben. Diese Eigenschaft erweist sich für die Reaktionszyklen der PCR als positiv, weil hierbei hohe Temperaturen erreicht werden und dennoch die Stabilität

der DNA-Polymerase gewährleistet wird.^{56,60,104} Früher wurde hierfür die hitzeinstabile Klenow Polymerase verwendet, welche zum Nachteil hatte, dass sie nach jedem Denaturierungsschritt erneut hinzugefügt werden musste. Dadurch waren bis zur Entwicklung der Taq-Polymerase die Einsatzmöglichkeiten der PCR eingeschränkt.

4. Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs):

Fungieren als Substrate der DNA-Polymerase und entsprechen den Bestandteilen einer DNA mit den vier Basen: Guanin, Cytosin, Adenin und Thymin. Deshalb werden auch vier dNTPs benötigt (dGTP, dCTP, dATP und dTTP). Die dNTPs sind in einer gefriergetrockneten Form oder als wässrige Lösung erhältlich, die bei -20°C mehrere Monate haltbar ist.

5. Puffer:

Ist für den Einbau der dNTPs ausschlaggebend und fördert die Aktivität der Polymerase.

Das Prinzip der PCR liegt im zyklischen Aufbau spezifischer DNA-Sequenzen. Durch die Wiederholung der einzelnen Zyklen kommt es zur gleichzeitigen Vermehrung beider komplementärer Stränge. Dabei dienen die Einzelstränge bei jedem Zyklus als Vorlage für die Synthese neuer Stränge.

Während der PCR werden drei Stadien durchlaufen: die Denaturierung, das Anheften der Primer (Annealing) und die Extension zu neuen Doppelsträngen.

Zunächst kommt es durch Erhöhung der Temperatur auf circa 95°C zur Destabilisierung der DNA-Doppelhelix. Durch die Lösung der Wasserstoffbrücken wird die DNA in zwei Einzelstränge gespalten. Im nächsten Schritt kommt es durch Abkühlung des Reaktionsgemisches zur Anheftung der Primer, die sozusagen Voraussetzung für den Start der DNA-Polymerase sind. Der Temperaturbereich schwankt je nach Primer und DNA-Sequenz zwischen 40 und 70°C. Man nennt diesen Prozess auch „annealing“ (Hybridisation).

Der letzte Schritt besteht in der Extension zu neuen Doppelsträngen. Hierfür wird eine Temperatur von circa 72°C benötigt. In diesem Temperaturbereich ist die DNA-Polymerase am aktivsten, insbesondere die Taq-Polymerase, die dank ihrer Thermostabilität bei den hohen Temperaturen nicht zugrunde geht.

Material und Methoden

Hierbei wird die DNA-Polymerase von der Stellung der Primer geleitet. Es erfolgt somit eine Kopie der dazwischenliegenden DNA-Sequenzen, indem der Einzelstrang als Vorlage dient. Dabei beginnt die Synthese der neuen DNA-Stränge an den 3'-Enden der Primer.

Diese einzelnen Zyklen werden circa 40 Mal in einem Thermocycler durchlaufen und dabei kommt es zu einer exponentiellen Zunahme der DNA-Moleküle. Theoretisch gesehen liegt die Anzahl der gebildeten DNA-Moleküle bei 2^n für n Zyklen. Dies bedeutet, dass es schon nach 20 Zyklen zu einer 10^6 fachen Amplifizierung der DNA-Moleküle gekommen ist. In der Realität liegt die Ausbeute aus technischen Gründen bei nur 10^5 , aufgrund des Aktivitätsverlustes der Taq-Polymerase, des Verbrauches an Primern und des sogenannten Plateau-Effektes. Dieser besagt, dass es bei einer steigenden Konzentration von Amplifikationsprodukten zu einer Hemmung der DNA-Polymerase kommt.^{33,99}

Die Spezifität der Amplifikation hängt davon ab, wie genau der Primer die zu amplifizierende DNA-Sequenz erkennt. Die Gefahr einer fehlerhaften Anheftung des Primers an einer anderen Stelle wird durch die Verwendung zweier Primer möglichst gering gehalten. Des Weiteren sollten sich der GC-Gehalt und der AT-Gehalt in den Primern ungefähr entsprechen und repetitive Sequenzen vermieden werden, da es dadurch zur Entstehung sogenannten Pseudo-Amplifikationsprodukten kommen kann. Die Entstehung dieser Pseudoprodukte kann durch die Verwendung von „nested Primern“ vermindert werden, was schließlich zu einer höheren Sensitivität und Spezifität der PCR führt. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass die zu amplifizierende DNA-Sequenz intakt ist und auch keine störenden Faktoren wie EDTA, Detergentien oder auch Phenole vorhanden sind, die die Synthese hemmen könnten.

Nach Beendigung der PCR werden mittels der Gelelektrophorese die PCR-Produkte genauer analysiert. Dafür wird ein Teil des Produktes unter Verwendung von Molekulargewichtsmarkern auf ein Agarose-Gel geladen und nach der elektrophoretischen Auftrennung sowie Färbung mit einer Ethidiumbromidlösung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Ziel ist, eine scharf abgrenzbare Bande auf Höhe der zu erwarteten Basengröße zu sehen. Dabei

Material und Methoden

können zeitweise kleinere DNA-Produkte oder auch die Primer selbst als diffus schwache Banden signifikant werden.

Insgesamt gesehen liegen die Vorteile der PCR in ihrer schnellen und einfachen Handhabung und der Sensitivität. Demgegenüber stehen drei Nachteile: die Ungenauigkeit der DNA-Replikation, da es in vitro zu mehr Kopierfehler als in vivo kommt, das Vorwissen der zu sequenzierenden Sequenz und die Möglichkeit, dass nur kurze DNA-Sequenzen amplifiziert werden können.

2.2.3.1 Durchführung der PCR

Alle Reagenzien, das heißt der Puffer, die Primer, die dNTPs, die Taq-Polymerase, H₂O und eventuell noch Magnesium werden zunächst auf Eis gelegt. So können sie zum einen auftauen und zum anderen auch kühl gehalten werden. Eine Ausnahme stellt hierbei die Taq-Polymerase dar, da sie erst kurz vor dem Gebrauch aus dem Tiefkühlfach geholt und sofort nach dem Pipettieren wieder bei -20°C gelagert wird. Nach dem Schütteln und Zentrifugieren der Reagenzien wird ein sogenannter Mastermix hergestellt, der sich aus definierten Anteilen der einzelnen Reagenzien zusammensetzt. Daraus werden dann 47 µl in jedes einzelne Reaktionsgefäß hineinpipettiert, die schon jeweils 3 µl cDNA enthalten. Insgesamt gesehen enthält ein Reaktionsgemisch 50 µl. Dieses Gemisch wird dann ein letztes Mal geschüttelt und zentrifugiert und anschließend in den Thermocycler gestellt.

Die Aufgabe besteht darin für jedes einzelne Exon die optimale PCR-Bedingung zu schaffen.

Die Protokolle werden im Folgenden erläutert:

Tabelle 4: Exon 1 PCR mit Primer PTPN11 5.1/PTPN11 3.1:

Denaturierung	95°C	1 min
Annealing	60°C	1 min
Extension	72°C	1 min
Hold	72°C 4°C	6 min ∞
Anzahl der Zyklen	40	

Tabelle 5 : Exon 2 PCR mit Primer PTPN11 5.2/PTPN11 3.2:

Denaturierung	95°C	1 min
Annealing	66°C	1 min
Extension	72°C	1 min
Hold	72°C 4°C	6 min ∞
Anzahl der Zyklen	40	

Tabelle 6 : Exon 3 PCR mit Primer Olexon 3/Olexon 3rev:

Denaturierung	95°C	1 min
Annealing	56°C	1 min
Extension	72°C	1 min
Hold	72°C 4°C	6 min ∞
Anzahl der Zyklen	40	

Tabelle 7 :Exon 4 PCR mit Primer Olexon 4/Olexon 4rev:

Denaturierung	95°C	1 min
Annealing	70°C 20 Zyklen 66°C 15 Zyklen	1 min
Extension	72°C	1 min
Hold	72°C 4°C	6 min ∞
Anzahl der Zyklen	35	

Tabelle 8 :Exon 5 PCR mit Primer PTPN11 5.5/PTPN11 3.5:

Denaturierung	95°C	1 min
Annealing	60°C	1 min
Extension	72°C	1 min
Hold	72°C 4°C	6 min ∞
Anzahl der Zyklen	40	

Tabelle 9 :Exon 6 PCR mit Primer PTPN11 5.6/ PTPN11 3.6:

Denaturierung	95°C	1 min
Annealing	54°C	1 min
Extension	72°C	1 min
Hold	72°C 4°C	6 min ∞
Anzahl der Zyklen	40	

Tabelle 10 :Exon 7 PCR mit Primer PTPN11 5.7/Olexon 7rev :

Denaturierung	95°C	1 min
Annealing	64°C 20 Zyklen 62°C 15 Zyklen	1 min
Extension	72°C	1 min
Hold	72°C 4°C	6 min ∞
Anzahl der Zyklen	35	

Tabelle 11 :Exon 8 mit Primer Olexon 8/Olexon 8rev :

Denaturierung	95°C	1 min
Annealing	58°C	1 min
Extension	72°C	1 min
Hold	72°C 4°C	6 min ∞
Anzahl der Zyklen	40	

Tabelle 12:Exon 9 mit Primer PTPN11 5.9/PTPN11 3.9 :

Denaturierung	95°C	1 min
Annealing	60°C 20 Zyklen 56°C 15 Zyklen	1 min
Extension	72°C	1 min
Hold	72°C 4°C	6 min ∞
Anzahl der Zyklen	35	

Tabelle 13:Exon 10 mit Primer PTPN11 5.10/PTPN11 3.10:

Denaturierung	95°C	1 min
Annealing	60°C	1 min
Extension	72°C	1 min
Hold	72°C 4°C	6 min ∞
Anzahl der Zyklen	40	

Tabelle 14:Exon 11 mit Primer PTPN11 5.11/PTPN11 3.11:

Denaturierung	95°C	1 min
Annealing	60°C	1 min
Extension	72°C	1 min
Hold	72°C 4°C	6 min ∞
Anzahl der Zyklen	40	

Tabelle 15:Exon 12 mit Primer PTPN11 5.12/PTPN11 3.12:

Denaturierung	95°C	1 min
Annealing	56°C	1 min
Extension	72°C	1 min
Hold	72°C 4°C	6 min ∞
Anzahl der Zyklen	40	

Tabelle 16:Exon 13 mit Primer Olexon 13/Olexon 13 rev:

Denaturierung	95°C	1 min
Annealing	58°C	1 min
Extension	72°C	1 min
Hold	72°C 4°C	6 min ∞
Anzahl der Zyklen	40	

Tabelle 17:Exon 14 mit Primer PTPN11 5.14/PTPN11 3.14:

Denaturierung	95°C	1 min
Annealing	62°C	1 min
Extension	72°C	1 min
Hold	72°C 4°C	6 min ∞
Anzahl der Zyklen	40	

Tabelle 18:Exon 15 mit Primer PTPN11 5.15/PTPN11 3.15:

Denaturierung	95°C	1 min
Annealing	62°C	1 min
Extension	72°C	1 min
Hold	72°C 4°C	6 min ∞
Anzahl der Zyklen	40	

Der jeweilige PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 19: PCR-Ansatz zur Amplifizierung der jeweiligen Exons

Reagenz	Menge
Puffer	5 µl
dNTP	0,6 µl
Primer für 5' Richtung	10 µl
Primer für 3' Richtung	10µl
Taq-Polymerase	1 µl
Wasser	20,4 µl
cDNA	3 µl

Bei manchen Exons wurde zusätzlich zur Verbesserung der PCR-Bedingung entweder Magnesiumchlorid (MgCl) oder Q-Solution hinzugefügt. Je nach der jeweils verwendeten Menge, wird die Wassermenge um den gleichen Betrag reduziert, so dass sich stets ein Gesamtvolumen von 50 µl ergibt.

2.2.3.2 Elektrophorese der PCR-Produkte

Nach der PCR wurden die PCR-Produkte entweder bei -20°C gelagert oder sofort elektrophoretisch getrennt.

Zur Auftrennung der jeweils amplifizierten Exons benötigte man eine Agarose-Gelelektrophorese. Die Genauigkeit deren Auftrennung ist von der Dauer der Elektrophorese und der Konzentration des Gels abhängig.

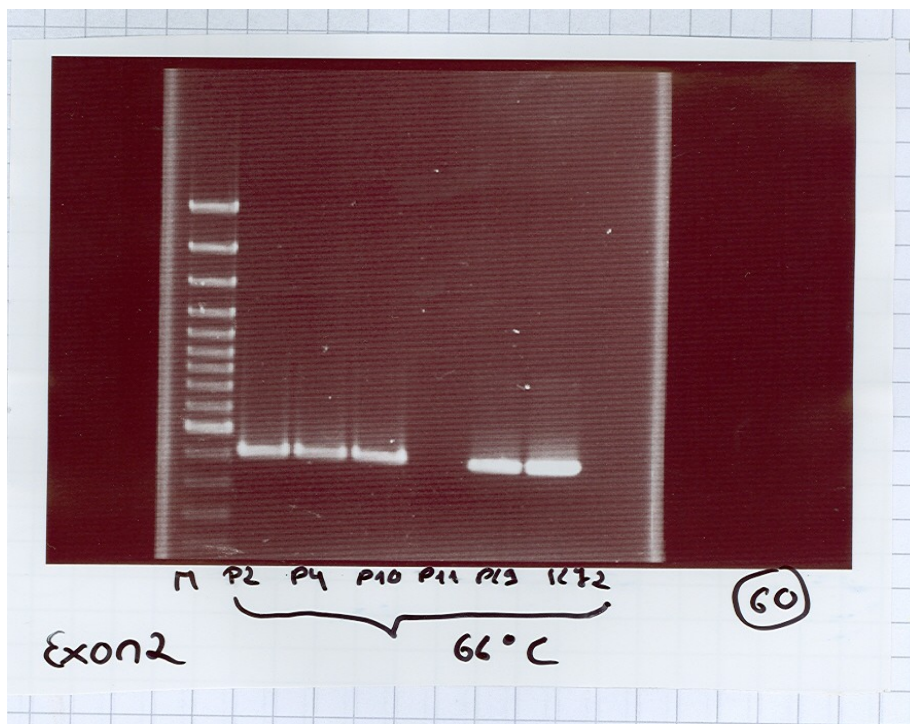
Zunächst erfolgte der Ansatz des 1%-igen Agarose-Gels. Für ein kleines Gel wurden 50 ml Agarose hergestellt. Dafür wurden zu 0,5 g Agarose 50 ml TBE-Puffer (10x TBE-Puffer 1:10 verdünnt) hinzugegeben und in der Mikrowelle bis zum Aufkochen erhitzt. Danach wurde das Gel unter Vermeidung von Luftblasenbildung vorsichtig in die Kammer gegossen, in der sich ein Kamm zur Bildung der Geltaschen befand. Nach circa 15 min war das Gel erstarrt und der zuvor angebrachte Kamm konnte entfernt werden. Anschließend konnte das Gel in der Kammer platziert und mit der TBE-Pufferlösung aufgegossen werden, bis die Geltaschen vollständig mit der Lösung versehen waren.

7 µl des PCR-Produktes wurden mit 1 µl Ladepuffer gemischt, zentrifugiert und daraufhin mit einer 10 µl Pipettenspitze in die vorgesehenen Geltaschen

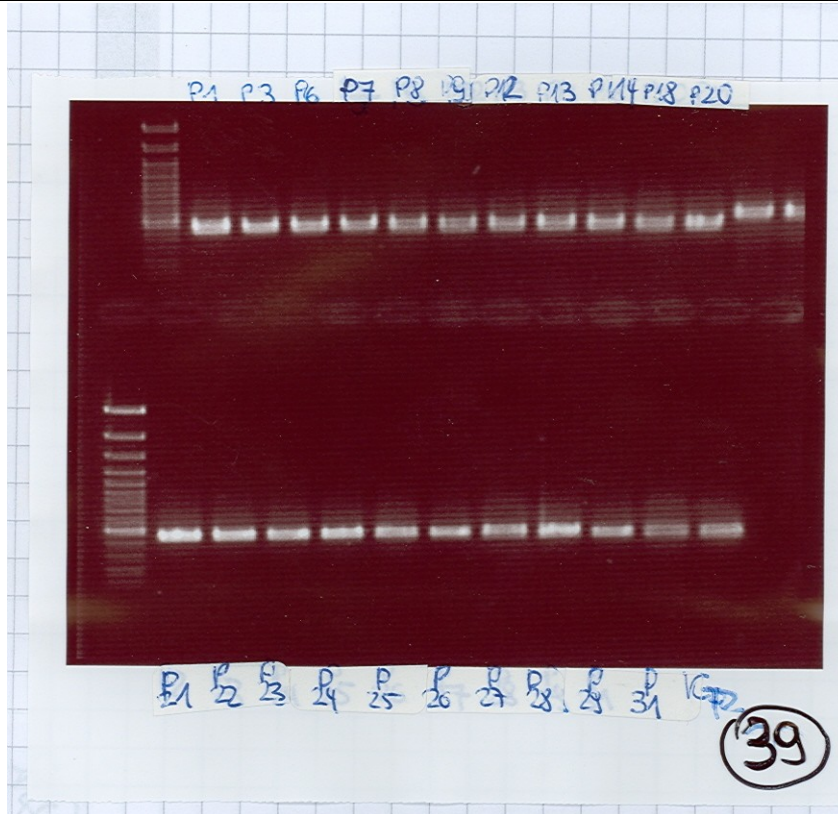
Material und Methoden

vorsichtig aufgetragen. Hierbei wurde die ganz linke Geltasche für das Auftragen des Molekulargewichtsmarkers benötigt. Das Gel wurde unter Verwendung von einer 80-Volt Spannung je nach Größe der jeweiligen Produkte 30 bis 45 Minuten in einer Elektrophoresekammer laufen gelassen. Entsprechend ihrer negativen Ladung, wandern die PCR-Produkte zum Pluspol der Elektrophoresekammer. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 15 Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und anschließend als scharf abgrenzbare Banden in der erwarteten Größe unter ultraviolettem Licht sichtbar. Mit einer Fotovorrichtung wurden die Gele auf Schwarz-Weiß-Instantfilmen angelichtet.

Abbildung 3: Elektrophorese-Bilder von Exon 2 und Exon 13



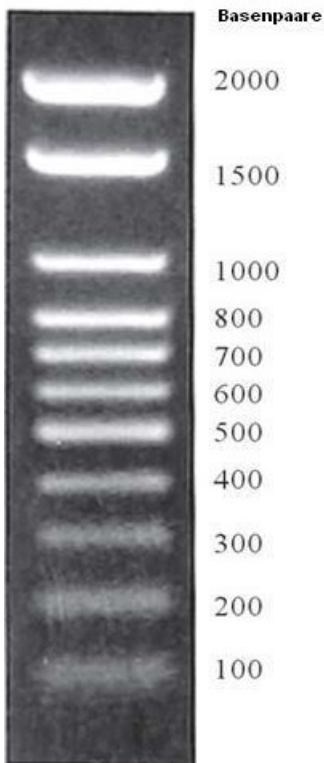
Patientenamplifikation von Exon 2. Hier sind neben dem Molekulargewichtsmarker scharf abgrenzbare Banden der Patientenproben zu sehen.



Patientenamplifikation von Exon 13

Auf der linken Seite befinden sich jeweils die Molekulargewichtsmarker (M)(vgl. Abbildung 4). Jeder einzelne Strich entspricht einer anderen Größe. Die Skalierung erfolgt hier in Hunderter-Schritten. Dabei entspricht der unterste Strich 100 Basenpaaren, so dass man in der Abbildung 1 von Exon 2 erkennen kann, dass Exon 2 eine Länge von ungefähr 405 Basenpaaren hat. Neben dem Molekulargewichtsmarker wurden die einzelnen Proben der Patienten aufgetragen. Das Ziel bestand hierbei darin, anschließend durch die optimale PCR-Bedingung scharf abgrenzbare, der Größe entsprechende Banden in der Elektrophorese zu bekommen. (vgl. Abbildung 3).

Abbildung 4: Der Molekulargewichtsmarker



2.2.4 DNA-Sequenzierung

Unter einer DNA-Sequenzierung versteht man die nähere Bestimmung einer DNA-Sequenz. Genauer erläutert geht es hierbei um die Abfolge von den Nukleotiden in einer genomischen DNA, welche die Bestandteile von Nucleinsäuren darstellen und als Träger der genetischen Information dienen. Dabei stellt die DNA-Replikation das grundlegende Prinzip dar.

Es gibt es zwei Methoden zur Sequenzierung von DNA. Zum einen die Methode der chemischen Spaltung nach Maxam und Gilbert, die im Jahre 1977 entwickelt wurde. Zum anderen gibt es, die heute am häufigsten verwendete enzymatische Methode, (die sogenannte Dideoxymethode). Sie wird auch „Kettenabbruch-Synthese“ genannt und wurde im Jahre 1975 von dem englischen Biochemiker Sanger entwickelt.¹⁰⁵ Mit beiden Methoden gelingt die erfolgreiche Bestimmung eines Bakteriengenoms.

Material und Methoden

Der Vorteil von der Dideoxymethode liegt in der besseren Effizienz und in der leichteren Durchführung.

Voraussetzung hierfür ist, dass die zu bestimmende DNA-Sequenz einzelsträngig vorliegt, was durch die Denaturierung der DNA ermöglicht wird. Diese Denaturierung wird bei der klassischen Methode durch Zugabe von Alkali (NaOH, Natronlauge) erreicht. Als Ausgangsmaterial werden 1-10 µg DNA benötigt, die man durch Amplifikation im Rahmen einer PCR erhält. Dabei benötigt die DNA-Polymerase Sequenzierprimer, die nur zu einer einzigen Stelle komplementär zur Matrizen-DNA sind. So ist der Bereich festgelegt, an dem die Sequenzierung beginnen soll. Nach den herkömmlichen Methoden ist der Primer entweder radioaktiv oder nicht radioaktiv (zum Beispiel mit Fluoreszin) am 5' Ende markiert. Des Weiteren muss gewährleistet sein, dass die zu sequenzierende DNA in einer gereinigten Form vorliegt und die Länge der Sequenzabschnitte nicht unnötig verkürzt wird, zum Beispiel aufgrund von Verunreinigungen durch störende Proteine, Kohlenhydrate oder Salze. Zur Reinigung werden entsprechende Reinigungsverfahren durchgeführt, welche später noch erläutert werden.

Für die Sequenzierung werden vier separate Reaktionsansätze hergestellt. Sie enthalten im Einzelnen eine DNA-Polymerase, einen Primer, die Matrizen-DNA, alle vier dNTPs und Dideoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) enthält, die modifizierte Nukleotide darstellen. Daher rührt auch der Name Dideoxymethode. Entsprechend der vier Basen in einer DNA gibt es vier verschiedene ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP). Diese unterscheiden sich jedoch von den dNTPs durch eine fehlende Hydroxylgruppe am 3' Ende. Durch diese fehlende Hydroxylgruppe, die das Anhängen eines Nukleotids erst ermöglicht, wirken die ddNTPs wie ein spezifischer Inhibitor der DNA-Synthese. Grund hierfür ist, dass die DNA-Polymerase dann nicht mehr in der Lage ist die DNA zu verlängern und somit ein Kettenabbruch eintritt, wobei der Einbau der ddNTPs zufällig erfolgt. Jeder der vier Ansätze enthält somit eine statistische Mischung aller Kettenlängen an neu gebildeten und markierten DNA-Fragmenten. Anschließend kann man die Proben auf ein Polyacrylamidgel

auftragen. Die DNA-Fragmente wandern dann entsprechend ihrer Größe unterschiedlich schnell zum Pluspol in der Elektrophoresekammer.

Die radioaktiven Fragmente können dann unter Verwendung eines Röntgenfilms detektiert werden.

Heute vermeidet man gerne das Arbeiten mit radioaktiven Stoffen. Deshalb wurde eine Methode entwickelt, bei der die Primer mit fluoreszierenden Stoffen versehen werden, was eine automatische Sequenzierung unter Verwendung eines Lasers ermöglicht. Dabei treffen die DNA-Fluoreszenz-Fragmente auf den Laserstrahl des Detektors, welche das Fluorescein-Molekül zur Emission anregt. Das wird dann von den Photorezeptoren aufgezeichnet und maschinell lesbar.

2.2.4.1 Zyklus-Sequenzierung

Die Zyklus-Sequenzierung stellt eines der modernsten Verfahren dar, das eine Modifikation der Sanger-Methode impliziert.

Dieses Verfahren wurde auch in dieser Arbeit verwendet.

Das Ziel zur Entwicklung der Zyklussequenzierung war es, größere Mengen des markierten Reaktionsproduktes zu erhalten. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass sie einfacher durchzuführen ist und selbst für eine zuverlässige Auswertung der DNA-Sequenzen mit geringen Mengen an DNA auskommt.

Die Grundlage für diese Methode stellen drei Teilschritte dar, wie sie auch im Verfahren der PCR vorkommen. Der erste Schritt liegt in der Denaturierung der DNA-Doppelstränge bei einer Temperatur von circa 95 °C, was zur Entstehung zweier Einzelstränge führt. Hierbei erfolgt die Denaturierung durch Erhitzen, und nicht durch das Hinzufügen von Alkali, wie es im Rahmen der klassischen Methode nach Sanger erfolgt. Im zweiten Schritt kommt es bei einer Abkühlung der Temperatur auf circa 50°C zur Anlagerung des Sequenzierprimers mit dem DNA-Matrizenstrang, was als Voraussetzung für den letzten Schritt, der Extension fungiert. In der Extension kommt es zur Synthese eines komplementären Stranges, weil zum einen der Primer den Startpunkt definiert und zum anderen für den Beginn der DNA-Synthese notwendig ist. Das

Material und Methoden

Reaktionsgemisch enthält hierbei auch eine DNA-Matrize, ddNTPs, dNTPs, einen Puffer und die Taq-Polymerase.

Wie bei der Beschreibung des PCR-Verfahrens schon erläutert, nutzt man die Taq-Polymerase, weil sie auch bei Temperaturen von 95°C aufgrund ihrer Eigenschaften stabil bleibt.

Der Unterschied zur klassischen Methode ist darin zu sehen, dass bei der Zyklus-Sequenzierung die Kopien durch mehrmaliges Wiederholen (20-30 Mal) der Zyklen erfolgen und sie somit zu einer Zunahme der neu gebildeten DNA-Fragmente führen. Diese Sequenzierreaktion kann in einem PCR-Thermocycler erfolgen. Was die Markierung der neu gebildeten DNA-Produkte betrifft, werden hier fluoreszenzmarkierte ddNTPs verwendet, was folglich dazu führt, dass dann das 3'Ende markiert wird. Dabei besteht die Möglichkeit jeden einzelnen ddNTP mit einem spezifischen Farbstoff zu versehen. Dies hat den Vorteil, dass man keine vier verschiedenen Reaktionsansätze benötigt, sondern nur noch einen Ansatz, der dann mittels Kapillarelektrophorese getrennt und von einem Detektor differenziert wird.¹¹¹

2.2.4.2 Durchführung der DNA-Sequenzierung

Technische Grundlage für die Sequenzierung der PCR-Produkte war die Fluoreszenz-Dye-Terminator-Technologie. Dabei wird die DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, welche dann vom Laser zur Emission angeregt werden und so gemessen werden können.

2.2.4.3 Vorbereitung der 96 well-Filterplatte

Bevor man die Sequenzierung starten konnte, erfolgte die Vorbereitung der 96 well-Filterplatten, die mit dem Einfüllen des Sephadex G-50 Pulvers begann. Danach wurden 300 µl Bidest hinzugefügt, welches man dann drei Stunden lang bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C quellen ließ. Anschließend folgte die Zentrifugation über fünf Minuten bei 910x g, um den Wasserüberstand zu entfernen. Schließlich wurden 150 µl Bidest hinzugefügt und vor der

Material und Methoden

Benutzung der Filterplatten zentrifugierte man nochmals fünf Minuten bei 910 rpm. Zum Auffangen der gereinigten Proben wurden die 96 well Platten verwendet.

2.2.4.4 Reinigung der PCR-Produkte mit SDS und Sephadex

Die Original PCR-Produkte wurden nach einem bestimmten Schema in die 96 well Mikrotiterplatten pipettiert und dort entsprechend verdünnt (1:2/ 1:4/ 1:8).

Zur Reinigung wurden aus diesen Platten je 2,5 µl von den organischen PCR-Produkten eingesetzt und mit 7,5 µl MilliQ-Wasser verdünnt. Anschließend wurden die Proben mit 2 µl 1,1 %-igem SDS (denaturierendes Agens) versetzt und fünf Minuten auf 98°C erwärmt, dann auf 25°C in einem Thermocycler abgekühlt, 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und schließlich über Multiscreenplatten mit Sephadex G-50 fünf Minuten lang bei 910x g zentrifugiert. Durch diese Sephadex G-50-Säulenzentrifugation können Proteine, freie Nukleotide und Salze, die die anschließende Sequenzierung stören würden, eliminiert werden.

2.2.4.5 Sequenzier-Reaktion

Die Sequenzierung wurde unter Verwendung des ABI BigDye Terminator Kit durchgeführt.

Der Ansatz für eine Probe von 11 µl setzte sich wie folgt zusammen:

• PCR-Produkt	2,0 µl
• ABI BigDye Terminator Mix (BDT v3.1)	0,5 µl
• Primer (3,2 pMol/µl)	1,0 µl
• 5xPuffer	1,925 µl
• MilliQ-Wasser	<u>4,575 µl</u>
Gesamtvolumen	11 µl

Anschließend wurde der Sequenzieransatz im Thermocycler der Firma Perkin Elmer mit 25 Zyklen im folgenden Protokoll amplifiziert:

Tabelle 20: Zyklusprofil der Cycle-Sequenzierung

Initiale Denaturierung	96°C	30 s
Anzahl der Zyklen	1	
Denaturierung	96°C	20 s
Annealing	50°C	10 s
Extension	60°C	4 min
Anzahl der Zyklen	25	

Im Anschluss an die Sequenzierungsreaktion wurde der Ansatz nochmals gereinigt. Zu Turbo 25 wurden 4 µl Bidest, 2 µl SDS (1,1%) hinzugefügt und fünf Minuten auf 98°C erwärmt. Danach mussten 15 Minuten bis zur Abkühlung gewartet werden. Anschließend wurde der Ansatz, wie oben schon erläutert, über Multiscreenplatten mit Sephadex G-50 fünf Minuten bei 910 g erneut gereinigt, bevor die anschließende Sequenzierung erfolgte. Dies geschah unter Verwendung von ABI 3100 Capillary Sequencer, welcher mit 96 Kapillaren versehen ist. Das Prinzip dieser automatisierten DNA-Sequenzierung besteht in der Fluoreszenz-Dye-Terminator Technologie.

2.2.4.6 Sequenzanalysen

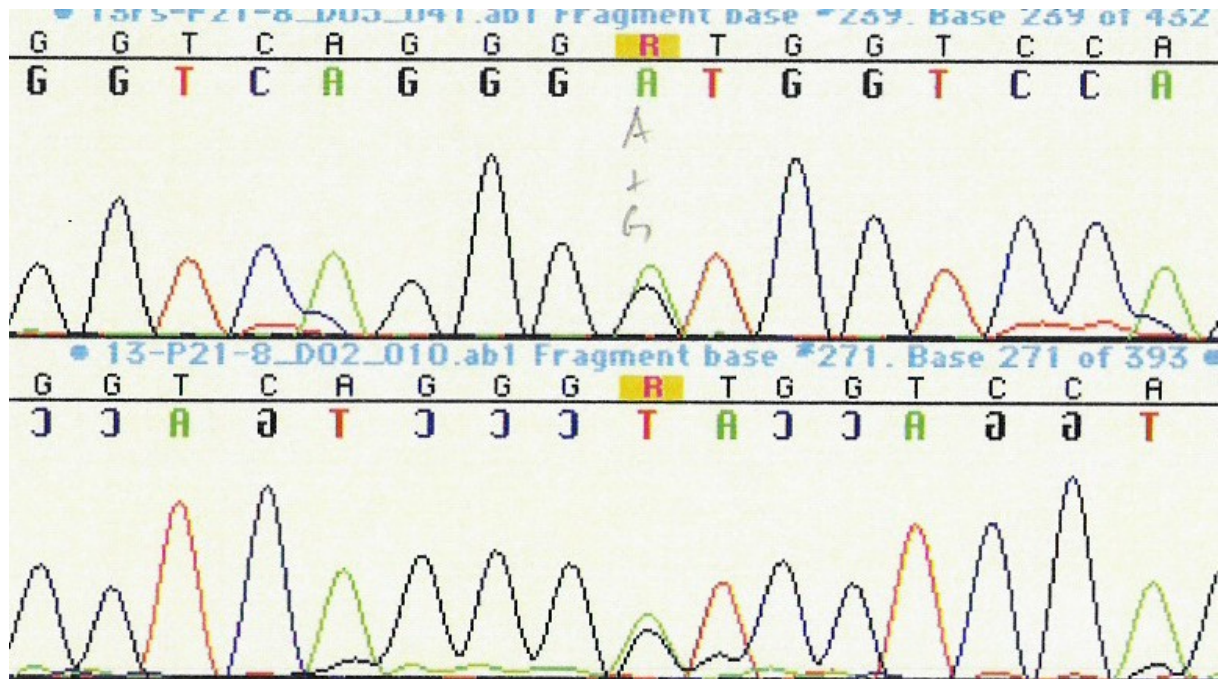
Zur Analyse der Sequenzen wurden die Sequenzer 4.1, Software der Firma Gene Codes Corporation (Ann Arbor USA) verwendet. Dabei wurde jedes Exon des PTPN11-Gens der jeweiligen Patienten auf Mutationen untersucht und kenntlich gemacht.

Im Folgenden ist ein Auszug einer Sequenzanalyse von Exon 13 zu sehen. Dabei fällt bei P21 eine Überlagerung zweier Emmissionswellenlängen auf, was auf eine Punktmutation an dieser Position schließen lässt. An dieser Stelle ist

Material und Methoden

eine Nukleotidsubstitution 1510A→ G zu sehen, die dann zum Ersatz der Aminosäure Methionin504 zu Valin führt.

Abbildung 5: Eine Sequenzierreaktion von Exon 13



2.2.5 Messung der Wachstumshormone (hGH)

Die Messungen der Serumspiegel der Wachstumshormone (hGH) erfolgten mit einem polyklonalen in house-Radioimmunoassay (RIA) der Kinderklinik Tübingen. Gegen die internationalen WHO-Richtlinien mit dem NIBSC Code 88/624 (1mg = 3 IU) wurden die Messungen der Wachstumshormone abgeglichen. Dabei betrug die untere Detektierungsgrenze 0.1 µg/L. Nach Hauffa et al. war der durchschnittliche Intra-Assay-Variationskoeffizient 6,9% und der Inter-Assay-Variationskoeffizient lag bei 9,5%⁵¹. Was die IGF-1 und IGFBP-3 Serumspiegel betrifft wurden beide mittels dem Radioimmunoassay nach Blum et al. gemessen.¹⁸ Dabei betrug die durchschnittlichen Intra- und

Material und Methoden

Interassay-Variationskoeffizienten des IGF-1-Assays weniger als 10 %. Hinsichtlich des IGFBP-3-Assays lagen hierbei der Intra-Assay-Variationskoeffizient bei 4,1% und der Inter-Assay-Variationskoeffizient bei 9,7%. Da die IGF-1- und IGFBP-3-Serumspiegel von Geschlecht, Alter und der Reife abhängig sind, wurden diese in SDS für das Alter und Geschlecht bei Mädchen unter 11 Jahren und bei Jungen unter 13 Jahren ausgedrückt.²¹ Die IGF-1-Spiegel der drei Kinder mit verspätetem Eintritt in die Pubertät wurden in SDS für das Knochenalter und das Geschlecht ausgedrückt.²¹

2.2.6 Statistische Methoden

Die statistischen Analysen erfolgten unter Anwendung des zweiseitigen Fisher's Wahrscheinlichkeitstests und des zweiseitigen Student-t-Tests für kontinuierliche Variablen. P-Werte, die unterhalb von 0,05 lagen, wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Mutationsanalysen

Die Sequenzierung der kodierenden Exons des PTPN11-Gens erfolgte bei 29 Patienten, die die erforderlichen Kriterien des Noonan-Syndroms aufwiesen. Die 15 Exons einschließlich der flankierenden Intron-Sequenzen wurden mittels der PCR amplifiziert und anschließend unter Verwendung des ABI 3100 Capillary Sequencer sequenziert. Das Ziel der PCR war es scharf abgrenzbare Banden in der Elektrophorese zu bekommen, die anschließend sequenziert wurden (siehe Abbildung 3). Die Auswertung der DNA-Sequenzierung des PTPN11-Gens zeigte bei insgesamt 16 Patienten Punkt-Mutationen auf (55%). Darunter waren elf verschiedene Mutationen bei vierzehn nicht miteinander verwandten Familien. In dieser Arbeit lag die Mehrheit der Mutationen im Bereich der Exons 3, 8 und 13 (11 von 14 Mutationen). Dabei sind bei Mutationen im Bereich des Exons 3 die N-SH2-Domäne und zudem bei Exon 7, Exon 8 als auch bei Exon 13 die PTP-Domäne betroffen.

Zwölf der 14 Mutationen wurden schon in früheren Berichten über das Noonan-Syndrom veröffentlicht.^{122,123,133} Die beiden neuen Mutationen dieser Studie zeigten einen Basenaustausch von Cytosin zu Adenin an Position 766 (766 C→A) im Exon 7 und einen Basenaustausch von Cytosin zu Thymin an Position 1472 (1472 C→T) im Exon 13. 766 C→A bedingt den Aminosäurewechsel Q256K und 1472 C→T hat den Aminosäurewechsel P491L zur Folge. Beide Mutationen sind im SHP-2-Bereich vorzufinden, wo auch Zenker et al.¹³³ die Aminosäurewechsel Q256R und P491S beschrieben.

Wie auch schon in den Studien von Tartaglia et al.¹²² (mit 31%) und bei Zenker et al.¹³³ (mit 18%) stellt auch in der vorliegenden Arbeit die Mutation im Exon 8 des PTPN11-Gens, die den Basenaustausch von Adenin zu Guanin an Position 922 zur Folge hat und zugleich den Aminosäurewechsel von Asparagin 308 zu Asparaginsäure (Asn308Asp) bedingt, die häufigste Mutation dar.

In der folgenden Tabelle wurden alle Mutationen aufgelistet, die im Rahmen dieser Arbeit herausgearbeitet wurden.

Ergebnisse

Tabelle 21: PTPN11-Mutationen bei 16 Patienten mit Noonan-Syndrom

Exon	Basenaustausch	Aminosäure-wechsel	Funktionelle Domäne	Anzahl	Bezug zur Literatur
2	124 A zu G	Thr42Ala (T42A)	N-SH2	1	(Tartaglia et al. 1555-63) ¹²²
3	179 G zu C	Gly60Ala (G60A)	N-SH2	1	(Tartaglia et al. 1555-63) ¹²²
3	181 G zu A	Asp61Asn (D61N)	N-SH2	1	(Zenker et al. 368-74) ¹³³
3	184 T zu G	Tyr62Asp (Y62D)	N-SH2	1	(Tartaglia et al. 1555-63) ¹²²
3	228 G zu T	Glu76Asp (E76D)	N-SH2	3 *	(Tartaglia et al. 1555-63) ¹²²
7	766 C zu A	Gln256Lys (Q256K)	PTP	1	Neu
7	844 A zu G	Ile282Val (I282V)	PTP	1	(Tartaglia et al. 465-68) ¹²³
8	922 A zu G	Asn308Asp (N308D)	PTP	3	(Tartaglia et al. 1555-63) ¹²²
8	923 A zu G	Asn308Ser (N308S)	PTP	1	(Tartaglia et al. 1555-63) ¹²²
13	1472 C zu T	Pro491Leu (P491L)	PTP	2 *	Neu
13	1510 A zu G	Met504Val (M504V)	PTP	1	(Tartaglia et al. 1555-63) ¹²²

* schließt ein Geschwisterpaar mit ein

3.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen als klinische Merkmale

Die klinischen Merkmale sind in Tabelle 22 zusammengefasst. Hierbei wurden die Merkmale der Patienten mit Mutationen im SHP-2-Protein (Mut⁺Gruppe) mit den Patienten ohne Mutationen (Mut⁻Gruppe) in diesem Protein miteinander verglichen. Die Patienten aus der Mut⁺Gruppe waren bei der ambulanten Vorstellung deutlich jünger: 5.1+/-2.7 versus 10.3+/-5.2 Jahren (Durchschnitt +/- Standardabweichung: P=0.002). Was die Körpergröße betrifft, waren die

Ergebnisse

Patienten der Mut⁺Gruppe nicht signifikant kleiner im Vergleich zu denen der Mut⁻Gruppe: -3.15+/-0.92 versus -3.01+/-1.35 SDS-Werte der Körpergröße.

Der Vergleich beider Gruppen zeigt auch, dass der Minderwuchs bei den Eltern nur in der Mut⁺Gruppe vertreten ist (P=0.01). Darüber hinaus sind Patienten mit Pulmonalstenose und Septumdefekten signifikant höher in der Mut⁺Gruppe vorhanden (P=0.0007 und 0.02). Die drei Patienten aus der Mut⁺Gruppe ohne diagnostizierte Pulmonalstenose, wovon zwei gar keinen Herzfehler (n=2) und einer eine Aortenisthmusstenose (n=1) hatten, waren die einzigen, die Mutationen außerhalb der Exons 3,8 und 13 aufwiesen. Keine Unterschiede zwischen der Mut⁺Gruppe und der Mut⁻Gruppe sind bezüglich der Merkmale Pterygium colli, inverser Haaransatz, hoher und spitzer Gaumen, Brustkorbdeformitäten und Cubitus valgus, sowie der typischen Gesichtsmerkmale wie dysplastischen Ohren, Ptosis und Hypertelorismus zu erkennen. Das Gleiche trifft auch für den Krytorchismus, den Minderwuchs und den Lernschwierigkeiten zu.

In unserer Studie war auch ein neun Jahre alter Junge mit einem Riesenzellgranulom vertreten, was in Verbindung mit dem Noonan-Syndrom eine seltene Störung darstellt. Dieser wies eine Y62D-Mutation im SHP-2-Protein auf.

Tabelle 22: Charakteristische klinische Merkmale bei Kindern mit Noonan-Syndrom. Unterteilt in Daten von Patienten mit positiven Mutationen im Bereich des SHP-2-Proteins (Mut⁺) und Daten von Patienten, die keine Mutationen auf dem SHP-2-Protein (Mut⁻) aufweisen.

Klinische Merkmale	Mut ⁺ (n=16)	Mut ⁻ (n=13)	P-Wert
Geschlecht [männlich:weiblich]	11:5	8:5	0.71
Eltern mit Minderwuchs [Anzahl/Gesamt (%)]	7/16 (44)	0/12 (0)	0.01*
Dysplastische Ohren & Ptosis & Hypertelorismus	7/16 (44)	6/13 (46)	1.00
Pulmonalstenose	13/16 (81)	2/13 (15)	0.0007*

Ergebnisse

Septumdefekte	10/16 (63)	2/13 (15)	0.02*
Hypertrophe Kardiomyopathie	2/16 (13)	1/13 (8)	1.00
Aortenisthmusstenose	3/16 (19)	3/13 (23)	0.64
Herzoperationen oder Valvuloplastie	8/16 (50)	2/13 (15)	0.11
Krytorchismus	6/10 (60)	5/8 (63)	1.00
Minderwuchs	14/16 (88)	11/13 (85)	1.00
Lernschwierigkeiten	6/16 (38)	7/13 (54)	0.47
Pterygium colli	9/16 (56)	6/13 (46)	0.72
Inverser Haaransatz	9/16 (56)	8/13 (62)	1.00
Hoher und spitzer Gaumen	3/16 (19)	5/13 (38)	0.41
Geschrägte Lidachse	8/16 (50)	6/13 (46)	1.00
Brustkorbdeformitäten	10/16 (63)	9/13 (69)	1.00
Cubitus valgus	1/16 (6)	3/13 (23)	0.29

*weist auf einen P-Wert <0.05 hin

3.3 Wachstumsstörungen

Die Kinder, die sich aufgrund ihres Minderwuchs in der endokrinologischen Sprechstunde der Kinderklinik Tübingen vorstellten, wurden genauen auxologischen Messungen unterzogen. Darüber hinaus wurden mit ihnen auch Tests zur Prüfung der Sekretionsleistung der Wachstumshormone durchgeführt (Tabelle 23). Dabei zeigte sich, dass die untersuchten Kinder eine schwerere Wachstumsstörung aufwiesen als die restlichen Kinder der Gesamtpopulation mit Noonan-Syndrom und einer Tendenz zum Minderwuchs.⁹⁵ Des Weiteren stellten sich die Mut⁺Kinder früher in der Sprechstunde vor, als die Mut⁻Kinder (P=0.002). Zum Zeitpunkt der Vorstellung war die Wachstumsstörung innerhalb der Mut⁺- und der Mut⁻Gruppe als gleich schwer anzusehen (P=0.74).

3.4 IGF-1- und IGFBP-3-Serumspiegel

Erstaunlicherweise waren die IGF-1-Serumspiegel (-2.03 SDS versus -1.13 SDS; $P=0.005$) und die IGFBP-3-Serumspiegel (-0.92 versus +0.40 SDS, $P=0.006$) zum Zeitpunkt der Wachstumshormonmessung oder bei der ersten Vorstellung, in der Mut⁺Gruppe signifikant geringer.

Im Gegensatz dazu schienen die Wachstumshormonspiegel während der nächtlichen Spontansekretion innerhalb der Mut⁺Gruppe deutlich, wenn auch nicht signifikant höher zu sein, als in der Mut⁻Gruppe (GH max. 16.2+/-10.2 versus 7.4+/-3.3 ng/ml: $P=0.091$, durchschnittliches GH 4.5+/-1.8 versus 2.7+/-0.9 ng/ml: $P=0.075$). Eine ähnliche Tendenz zeigte sich während der Arginin-Stimulation (GH max. 11.8+/-6.3 versus 5.6+/-1.6 ng/ml: $P=0.14$)

3.5 Therapeutische Versuche mit rekombinantem Wachstumshormon (rhGH)

Eine Subgruppe von präpubertalen Patienten wurde auf der Basis individueller therapeutischer Versuche mit rhGH behandelt. Hierbei lag die durchschnittliche Dosis bei 0.043 mg/kg/d, analog der Medikation zur Wachstumshormonförderung bei Patienten mit Turner-Syndrom. Die durchschnittliche delta SDS-Größe war ein Jahr nach der rhGH-Therapie in der Mut⁺Gruppe (n=8) signifikant geringer als in der Mut⁻ Gruppe (n=3) (+0.66 versus +1.26; $P=0.007$). Die letzte Gruppe wurde mit einer gering höheren Dosis an Wachstumshormonen behandelt (0.050 versus 0.042 mg/kg/d).

Ergebnisse

Tabelle 23: Auflistung der auxologischen Daten und der Hormonspiegel bezüglich der GH-IGF-1-Achse, sowie das Ansprechen auf rhGH

Innerhalb der Klammer ist die durchschnittliche Standardabweichung der Daten aufgezeigt

	Anzahl= Mut ⁺ /Mut ⁻	Mut ⁺	Mut ⁻	P- Wert
Schwangerschaftswochen	16/12	38.7 (1.9)	37.1 (4.3)	0.19
Geburtslänge (SDS)	16/11	-0.48 (1.59)	-0.25 (1.58)	0.72
Geburtsgewicht (SDS)	16/11	-0.70 (1.49)	-0.40 (1.17)	0.58
Größe der Mutter (cm)	16/12	157.8 (8.4)	165.9 (7.4)	0.014*
Größe des Vaters (cm)	16/12	173.6 (8.2)	179.6 (5.8)	0.045*
Alter bei der ersten Vorstellung (Jahre)	16/13	5.1 (2.7)	10.3 (5.2)	0.002*
Größe bei der ersten Vorstellung (SDS)	16/13	-3.15 (0.92)	-3.01 (1.35)	0.74
Alter bei der Messung von GH (Jahre)	11/9	7.7 (3.6)	7.6 (4.7)	0.93
IGF-1 (SDS)	16/13	-2.03 (0.69)	-1.13 (0.89)	0.005*
IGFBP-3 (SDS)	16/13	-0.92 (1.26)	+0.40 (1.08)	0.006*
GH Peak, Arginin (ng/ml)	11/6	11.8 (6.3)	5.6 (1.6)	0.14
GH Peak, spontan (ng/ml)	9/5	16.2 (10.2)	7.4 (3.3)	0.091
GH durchschnittlich, spontan (ng/ml)	9/5	4.5 (1.8)	2.7(0.9)	0.075
Alter bei GH-Gabe (Jahre)	8/3	7.4 (2.2)	6.3 (1.9)	0.35
Größe bei GH- Gabe (SDS)	8/3	-3.46 (0.71)	-3.80 (0.13)	0.44
GH Dosierung (mg/kg/d)	8/3	0.042 (0.007)	0.050 (0.008)	0.17
Delta SDS-Größe nach 1 Jahr rhGH (SDS)	8/3	+0.66 (0.21)	+1.26 (0.36)	0.007*
Alter bei der letzten Vorstellung (Jahre)	15/13	12.0 (4.0)	13.6 (4.2)	0.31
Größe bei der letzten Vorstellung (SDS)	16/13	-2.37 (0.82)	-2.50 (1.63)	0.79

*weist auf einen P-Wert <0.05 hin

4. Diskussion

4.1. Mutationsraten

2001 gelang Tartaglia et al.¹²³ der entscheidende Schritt bezüglich der Pathogenese vom Noonan-Syndrom. Sie konnten zeigen, dass bei ungefähr 50% der untersuchten Patienten mit Noonan-Syndrom Mutationen im *PTPN11*-Gen vorhanden waren. Daraufhin folgten weitere Untersuchungen des *PTPN11*-Gens, um die Relevanz dieses Gens in Bezug auf die Pathogenese des Noonan-Syndroms näher zu erforschen. Musante et al.⁷⁷ fanden Mutationen in diesem Gen bei 33% seiner 96 untersuchten Patienten mit Noonan-Syndrom. In einer weiteren Veröffentlichung von Tartaglia et al.¹²² im Jahre 2002 konnten sie Mutationen im *PTPN11*-Gen bei 45% von 119 untersuchten Patienten aufzeigen. Kosaki et al.⁶⁶ fanden in ihrer Studie mit 21 japanischen Noonan-Patienten sechs verschiedene Mutationen bei insgesamt sieben vorhandenen Mutationen. Schließlich veröffentlichte Zenker et al.¹³³ 2004 eine Arbeit mit 57 Noonan-Patienten, von denen 60% Mutationen im *PTPN11*-Gen aufwiesen.

In unserer Studie wiesen 55% der 29 untersuchten Patienten mit diagnostiziertem Noonan-Syndrom elf verschiedene Mutationen auf.

Somit erstrecken sich die bisherigen Mutationsraten in einem Rahmen von 33% bis 60% und stellen dadurch einen weiteren Beweis dafür da, dass *PTPN11*-Mutationen verantwortlich für die Entwicklung eines Noonan-Syndroms sind.

4.2 Klärung bezüglich einer Assoziation zwischen Geno- und Phänotyp

Die klinische Heterogenität beim Noonan-Syndrom veranlasste Untersuchungen zur Klärung einer möglichen Assoziation zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp. Eine genauere Aufschlüsselung der klinischen Merkmale unserer Studie ist in Tabelle 22 wiedergegeben. Die statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Noonan-Syndrom und den kardialen Phänotypen wie der Pulmonalstenose oder den Septumdefekten bestätigte sich auch in unserer Studie. Es zeigte sich deutlich, dass Patienten mit einer

Diskussion

Pulmonalstenose signifikant höher in der Gruppe mit Mutationen auf dem *PTPN11*-Gen vertreten waren.^{66,77,122} Hierbei wiesen 81% innerhalb der Mut⁺Gruppe unserer Studie eine Pulmonalstenose im Verhältnis zu 15% in der Mut⁻Gruppe.

Tatsächlich war die Gesamtprävalenz der Pulmonalstenosen in unserer Studie (81%) höher als die Prävalenz (74%) bei Zenker et al.¹³³ und Tartaglia et al.¹²² (57%). In Bezug auf die Pulmonalstenose zeigten experimentelle Analysen mit Mäusen, dass der Signalweg der epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF) wichtig für die semilunare Klappenentwicklung ist und SHP-2 eine Komponente des EGF vermittelten Signaltransduktionweges darstellt.^{24,93} Das lässt darauf schließen, dass die Mutationen von SHP-2 eine fehlerhafte Entwicklung der Pulmonalklappe bedingen können.

Das deutliche Überwiegen der kardiologisch betroffenen Patienten lässt sich auch an den Septumdefekten zeigen. Hierbei wiesen 63% der Mut⁺Patienten im Vergleich zu 15% bei den Mut⁻Patienten Septumdefekte auf. Dabei bestand, verglichen zu früheren Studien, auch bezüglich der Septumdefekte eine höhere Gesamtprävalenz. Bei Zenker et al.¹³³ zeigten 31% der Mut⁺Patienten Septumdefekte, wohingegen in anderen Berichten von nur 10% bis 15% die Rede war.^{4,122} Ein Grund für diese Unterschiede könnte in der Verwendung der denaturierenden Hochdruckflüssigkeitschromatographie von Musante et al.⁷⁷, Tartaglia et al.¹²² und Maheshwari et al.⁷⁰ zu sehen sein. Die denaturierende Hochdruckflüssigkeits-chromatographie weist im Vergleich zur direkten DNA-Sequenzierung eine leicht geringere Sensitivität auf.

Bezüglich des Vorhandenseins von hypertrophen Kardiomyopathie zeigten sich in unserer Studie keine Unterschiede zwischen Mut⁺- und Mut⁻Patienten. Somit wird die Beobachtung einer Assoziation zwischen Pulmonalstenose und der inversen Korrelation zur Kardiomyopathie anderer Gruppen nicht bestätigt.^{70,77,122}

Im Gegensatz zu Zenker et al.¹³³ zeigten sich keine höheren Korrelationen bei Patienten mit Mutationen auf dem *PTPN11*-Gen bezüglich des Minderwuchses, Brustkorbdeformitäten und den typischen Gesichtszügen. Somit lässt sich, wie bei Tartaglia et al.¹²², auch in unserer Studie, keine Assoziation zwischen

Diskussion

den letzten genannten typischen Merkmalen beim Noonan-Syndrom und dem Vorliegen einer Mutation aufzeigen. Wie der Tabelle 21 zu entnehmen ist, wurden Mutationen in den unterschiedlichen Domänen ermittelt. Die nähere Untersuchung bezüglich des Phänotyps und der dazugehörigen Mutation zeigte keine signifikanten Abweichungen im N-SH2 oder PTP-Bereich, was die Beobachtung von Tartaglia et al.¹²² bestätigt. Des Weiteren stellte sich auch in unserer Studie heraus, dass die am häufigsten vorkommende Mutation, die einen Aminosäurewechsel von Asparagin 308 zu Asparaginsäure (Asn308Asp) bedingt, keine qualitativen Unterschiede den Phänotyp betreffend demonstrierte, was auch den Studien von Tartaglia et al.¹²² und Zenker et al.¹³³ zu entnehmen ist.

4.3 Spezifika des Minderwuches bei Patienten mit positivem oder negativem Mutationsergebnis

Was die Spezifika der Wachstumsstörung betrifft, war diese bei den Mut⁺- und Mut⁻-Patienten als gleich schwer anzusehen. Insgesamt gesehen wiesen jedoch die Patienten unserer Studie eine schwerere Wachstumsstörung, als in der Gesamtpopulation mit Noonan-Syndrom vorhanden. Dabei lag die Größe näherungsweise eine Standardabweichung unterhalb des Durchschnitts für Patienten mit Noonan-Syndrom. Darüber hinaus war der Minderwuchs bei den Eltern nur bei den Mut⁺-Patienten vorhanden.

Wie bereits erwähnt, spielt SHP-2 unter anderem eine wichtige Rolle bei einer Reihe von Wachstumsfaktoren und Hormonen.¹¹⁷ Dies veranlasste uns die GH-IGF-1-Achse zum ersten Mal bezüglich Vorhandensein oder Fehlen von SHP-2 Defekten näher zu untersuchen. Frühere Studien berichteten über widersprüchliche Ergebnisse mit niedrigen und normalen IGF-1-Serumspiegel,^{114,120} sowie niedriger, normaler und hoher spontanen GH-Ausschüttung bei Kindern mit Noonan-Syndrom.^{81,82}

4.4 GH-IGF-1-Achsen

Die Betrachtung der IGF-1- und IGFBP-3-Serumspiegel zeigte interessanterweise, dass diese bei Kindern mit Mutationen deutlich geringer ausfielen. Des Weiteren machte es den Anschein, dass die spontane und stimulierte Wachstumshormonsekretion in der Mut⁺Gruppe höher war, wobei die Wachstumshormoninsuffizienz als Ursache einer IGF-1-Insuffizienz ausgeschlossen wurde.

Diese Daten stehen im Einklang mit den Ergebnissen aus den In-Vitro-Studien, bezüglich der Funktion von SHP-2 im Signaltransduktionsweg von Wachstumshormonen.⁶² Eine wichtige Rolle spielt hierbei die JAK-STAT-Signalkaskade, welche als intrazellulärer Signalweg von einer Vielzahl von Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren genutzt wird. Als Beispiele sind hier die Wachstumshormone⁴⁹, Interferone⁷³ und Prolaktin¹²⁷ zu nennen.

Es hatte sich gezeigt, dass eine direkte Assoziation zwischen SHP-2 und dem Gh-Rezeptor als Antwort auf die Wachstumshormone in vitro besteht.⁶²

Ein weiterer Aspekt ist, dass SHP-2 wie eine zytosolische Phosphatase von STAT5 wirkt, welche in der Lage ist die Aktivität von STAT5 herunter zu regulieren.^{25,132}

Daher zeigt sich, dass die Fähigkeit von SHP-2 in vitro Signalmoleküle wie STATs und JAKs zu binden und zu dephosphorylieren, welche eine positive Regulation der zellulären Antwort auf Wachstumshormone beinhaltet, mit unseren In-Vivo- Ergebnissen übereinstimmen. Diese zeigen, dass die Mutationen von SHP-2 zu einer negativen Regulierung der zellulären Antwort auf Wachstumshormone bei Kinder mit Noonan-Syndrom führen, das sich durch die IGF-1/IGFBP-3 Serumspiegel widerspiegeln lässt. Dennoch muss darauf hingewiesen werden, dass experimentelle Daten über den direkten Effekt an der Genexpression, bezüglich der Ausübung von aktivierter SHP-2 noch fehlen.²⁵

Wie schon erwähnt, zeigten sich bezogen auf die Körpergröße keine Unterschiede zwischen der Mut⁺Gruppe und der Mut⁻Gruppe. Des Weiteren

Diskussion

lagen neben dem Kleinwuchs auch keine weiteren klinischen Merkmale von Wachstumshormonresistenz vor.

Wenn man die zahlreichen intrazellulären Interaktionen der weitgehend überall exprimierten SHP-2 betrachtet, wird der Wachstumshormonrezeptor wahrscheinlich einer von mehreren Mechanismen sein, die den Phänotyp beim Noonan-Syndrom betreffen. Dieser Signalweg ist aber von großem Interesse, wenn rhGH in hoher Dosierung zur Förderung des Wachstums bei kleinwüchsigen Kindern verordnet werden kann.

4.5 Auswirkungen der Wachstumshormontherapie bei Mut⁺Patienten im Vergleich zu Mut⁻Patienten

Was die Auswirkungen der Wachstumshormontherapie bei Mut⁺Patienten betreffen, zeigt sich, dass die mit Wachstumshormonen behandelten Patienten mit Noonan-Syndrom ein geringeres Ansprechen auf eine Hochdosiswachstumshormontherapie im Vergleich zu der Mut⁻Gruppe zeigen. Es deutet sich an, dass Mutationen im Bereich von SHP-2 eine milde Wachstumshormonresistenz durch einen Postrezeptorsignaldefekt verursachen, der wahrscheinlich zu einem Minderwuchs und geringem Ansprechen auf rhGH beim Noonan-Syndrom führt.

Jedoch muss darauf hingewiesen werden, dass unsere Ergebnisse durch noch folgende Studien weiter bestätigt werden müssen, da unsere untersuchte Gruppe klein und die GH-Dosierung nicht identisch war.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Untersuchung eines Kollektivs von 29 Personen, die sich in den letzten fünf Jahren mit den drei typischen Anomalien eines Noonan-Syndroms oder einer Pulmonalstenose in der endokrinologischen Ambulanz der Kinderklinik in Tübingen vorstellten. Hierbei wandte man eine PCR-Etablierung mit anschließender Sequenzierung der Patienten-DNA an.

Von besonderem Interesse war dabei die nähere Untersuchung der 15 codierenden Exons des *PTPN11*-Gens, um Mutationen in diesem Bereich aufzeigen zu können. Darüber hinaus wurde eine retrospektive Untersuchung der klinischen Merkmale anhand der klinischen Akten durchgeführt, sowie die auxiologischen Daten der GH-IGF-1-Achse der mutationspositiven mit den mutationsnegativen Patienten verglichen.

Das Ziel war die Ermittlung einer Assoziation zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp bei vorhandenem Noonan-Syndrom. Die Auswertung der Sequenzierung zeigte 16 Mutationen im *PTPN11*-Gen auf (55%). Mehrheitlich waren die Mutationen in den Exons 3, 8 und 13 aufzufinden. Die beiden neuen Mutationen dieser Studie zeigten einen Basenaustausch von Cytosin zu Adenin an Position 766 (766 C→A) im Exon 7 und einen Basenaustausch von Cytosin zu Thymin an Position 1472 (1472 C→T) im Exon 13. 766 C→A bedingt den Aminosäurewechsel Q256K und 1472 C→T hat den Aminosäurewechsel P491L zur Folge. Beide neuen Mutationen sind in der PTP-Domäne der SHP-2 vorzufinden, wo auch Zenker et al.¹³³ die Mutationen Q256R und P491S beschrieben, die eine Änderung der Konformation vom inaktiven in den aktiven Zustand favorisieren. Die aktivierte SHP-2 führt zu einer Down-Regulierung der Signaltransduktionswege von Wachstumshormonen und fungiert damit als negativer Regulator.¹¹⁶

Die Analyse der Genotyp-Phänotyp-Korrelation demonstrierte auch in unserer Studie eine signifikante Assoziation der kardialen Phänotypen, wie der Pulmonalstenose und der Septumdefekte mit Mutationen im Bereich des *PTPN11*-Gens. Hierbei wiesen 81% innerhalb der Mut⁺Gruppe unserer Studie eine Pulmonalstenose auf, im Verhältnis zu 15% in der Mut⁻Gruppe.

Zusammenfassung

Was die Septumdefekte betrifft, konnte gezeigt werden, dass 63% der Mut⁺-Patienten im Vergleich zu 15% bei den Mut⁻-Patienten diese aufzeigten, wohingegen das

Vorhandensein von hypertrophen Kardiomyopathien in unserer Studie keine Unterschiede im Vergleich von Mut⁺- und Mut⁻-Patienten abbildete. Bezüglich des Minderwuchses, den Brustkorbdeformitäten und den typischen Gesichtsmerkmalen

stellten sich keine höhere Korrelationen bei Patienten mit Mutationen auf dem *PTPN11*-Gen dar. Somit erhärtete sich auch in unserer Studie keine Assoziation zwischen den letzten genannten typischen Merkmalen beim Noonan-Syndrom und dem Vorliegen einer Mutation.

Bei der näheren Betrachtung der Wachstumsstörung war diese bei den Mut⁺- und Mut⁻-Patienten als gleich schwer anzusehen, wobei insgesamt gesehen die Patienten unserer Studie eine schwerere Wachstumsstörung aufwiesen, als die Gesamtpopulation mit Noonan-Syndrom. Die Größe belief sich näherungsweise auf eine Standardabweichung unterhalb des Durchschnitts für Noonan-Syndrom. Des Weiteren ließ sich der Minderwuchs bei den Eltern nur bei den Mut⁺-Patienten eruieren.

Die Analyse der IGF-1- und IGFBP-3-Serumspiegel ergab, dass diese bei Kindern mit Mutationen deutlich geringer ausfiel. Des Weiteren stellte sich heraus, dass die spontane und stimulierte Wachstumshormonsekretion in der Mut⁺-Gruppe höher war. Dabei stehen diese Daten bezüglich der Funktion von SHP-2 im Signaltransduktionsweg von Wachstumshormonen im Einklang mit den Ergebnissen aus den In-Vitro-Studien. Darüber hinaus konnte dargestellt werden, dass die Mutationen von SHP-2 zu einer negativen Regulierung der zellulären Antwort auf Wachstumshormone bei Kindern mit Noonan-Syndrom führen, das sich durch die IGF-1/IGFBP-3 Serumspiegel verdeutlichen ließ.

Im Rahmen unserer Untersuchung konnte bewiesen werden, dass bei Wachstumshormonen behandelten Patienten mit Noonan-Syndrom ein geringeres Ansprechen auf eine Hochdosiswachstumshormontherapie bei Mut⁺-Patienten besteht, im Vergleich zu der Mut⁻-Gruppe. Hieraus wurde der Schluss gezogen, dass Mutationen im Bereich von SHP-2 eine milde

Zusammenfassung

Wachstumshormonresistenz durch einen Postrezeptorsignaldefekt verursachen, der wahrscheinlich zu einem Minderwuchs und geringem Ansprechen auf rhGH beim Noonan-Syndrom führt.

6. Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

- ¹ Ahmad, S., Banville, D., Zhao, Z., Fischer, E.H. and Shen, S.-H. (1993)
"A widely expressed human protein-tyrosine phosphatase containing src homology 2 domains."
Proceedings of the National Academy of Science USA 90: 2197-2201.
- ² Albertsson-Wikland, K., Wennergren, G., Wennergren, M., Vilbergsson, G., Rosberg, S. (1993)
"Methoden zur Evaluierung der Spontansekretion von Wachstumshormonen."
In: Ranke, M.B. (Hrsg.): *Endokrinologische Funktionsdiagnostik im Kindes- und Jugendalter* (J & J Verlag, Mannheim): 87-115.
- ³ Allanson, J. E. (1987)
"Noonan syndrome."
J Med Genet 24: 9-13.
- ⁴ Allanson, J. E., Hall, J.G., Hughes, H.E., Preus, M., Witt, R.D. (1985)
"Noonan syndrome: the changing phenotype."
Am J Med Genet 21: 507-514.
- ⁵ Allanson, J. E., Hall, J.G. and Van Allen, M.I. (1985)
"Noonan phenotype associated with neurofibromatosis."
Am J Med Genet 21: 457-462.
- ⁶ Arany, E., Afford, S., Strain, A.J., Winwood, P.J Arthur M.J.P., Hill, D.J. (1994)
"Differential cellular synthesis of insulin like growth factor binding protein 1 (IGFBP1) and IGFBP-3 within human liver."
J Clin Endocrinol Metabol 79(6): 1871-1876.
- ⁷ Argente, J., Barrios, V., Pozo, J., Munoz, M.T., Hervas, F., Stene, M., Hernandez, M. (1993)
"Normative data for insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins and growth hormone binding proteins in a healthy Spanish Pediatric population: Age - and sex- related changes."
J Clin Endocrinol Metabol 77(6): 1522-1528.
- ⁸ Argetsinger, L.S., Carter-Su, C. (1996)
"Mechanism of signaling by growth hormone receptor."
Physiol Rev 76: 1089-1107.

Anhang

- 9** Bahdau, M., Flintoff, W., Assouline, B., Lyonnet, S., Le Merrer, M., Prieur, M., Guilloud-Bataille, M., Feingold, N., Munnich, A., Vidaud, M. Vidaud, D. (1996) "Exclusion of allelism of Noonan syndrome and neurofibromatosis type I in a large family with Noonan syndrome-neurofibromatosis association." *Am J Med Genet* **66**: 347-355.
- 10** Ballard, J., Baxter, R., Binoux, M., Clemmons, D., Drop, S., Hall, K., Hintz, R., Rechler, R., Rutanen, E., Schwander, J. (1989) "On the nomenclature of the IGF binding proteins." *Acta Endocrinol (Copenh)* **121**: 751-752.
- 11** Bastien, L., Ramachandran, C., Liu, S., Adam, M. (1993) "Cloning, expression and mutational analysis of SH-PTP2, human protein-tyrosine phosphatase." *Biochem Biophys Res Commun* **196**: 124-133.
- 12** Baumann, G. and Mercado, M. (1993) "Growth hormone binding proteins in plasma." *Nutrition* **9(6)**: 546-553.
- 13** Baumann, G., M. Shaw, and T. A. Buchanan. (1989) "In vivo kinetics of a covalent growth hormone binding protein complex." *Metabolism* **38(4)**: 330-333.
- 14** Beshyah, S. A., Anayaoku, V., Nityananthan, R., Sharp, P., Jahnston, D.G. (1991) "The effect of subcutaneous injection sites on absorption of human growth hormone: abdomen versus thigh." *Clin Endocrinol* **35**: 409-412.
- 15** Bierich, J.R. (1986) "Treatment of pituitary dwarfism with biosynthetic growth hormone." *Acta Paediatr Scand (Suppl)* **325**: 13-18.
- 16** Blethen, S.L., Baptista, J., Kuntze, J., Foley, T., Lafranchi, S., Johanson, A. (1997) "Adult height in growth hormone (GH)-deficient children treated with biosynthetic GH." *J Clin Endocrinol Metab* **82**: 418-420.
- 17** Blum, W. F. (1993) "Insulinähnliche Wachstumsfaktoren und ihre Bindungsproteine." *In: Ranke, M.B. (Hrsg.): Endokrinologische Funktionsdiagnostik im Kindes -und Jugendalter (J&J Verlag, Mannheim)* 116-133.

- 18** Blum, W. F., Albertsson-Wikland, K., Rosberg, S., Ranke, M.B. (1993)
"Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion."
J Clin Endocrinol Metab 76: 1610-16.
- 19** Blum, W. F., Ranke, M.B., Kietzmann, K., Gauggel, E., Zeisel, H.J., Bierich, J.R. (1990)
"A specific radioimmunoassay for the growth hormone (GH)-dependent somatomedin-binding protein: Its use for diagnosis of GH-deficiency."
J Clin Endocrinol Metab 70(5): 1292-1298.
- 20** Blum, W.F. and M.B. Ranke. (1990)
"Use of insulin-like growth factor binding protein 3 for the evaluation for growth disorders."
Horm Res 33(4): 31-37.
- 21** Blum, W. F. and R. Schweizer. (2003)
"Insulin-like growth factors and their binding proteins."
In: Ranke MB (ed): diagnostics of endocrine function in children and adolescents." *Basel, Karger* :166-199.
- 22** Brady, A. F., Jamieson, C.R., van der Burgt, I., Crosby, A., van Reen, M., Kremer, H., Mariman, E., Patton, M.A., Jeffery, S.(1997)
"Further delineation of the critical region for Noonan syndrome on the long arm of chromosome 12."
Eur J Hum Genet 5: 336-337.
- 23** Charbonneau, H. and N. K. Tonks. (1992)
"1002 protein tyrosine phosphatases?"
Annu Rev Cell Biol 8: 463-493.
- 24** Chen, B., Bronson, R.T., Klamann, L.D., Hampton, T.G., Wang, J.F., Green, P.J., Magnuson, T., Douglas, P.S., Morgan, J.P., Neel, B.G. (2000)
"Mice mutant for Egfr and Shp2 have defective cardiac semilunar valvulogenesis." *Nat Genet* 24: 296-299.
- 25** Chen, Y., Wen, R., Yang, S., Schuman, J. Zhang, E.E., Yi, T., Feng, G.S., Wang, D. (2003)
"Identification of shp-2 as a Stat5a phosphatase."
J Biol Chem 278: 16520-16527.
- 26** Cole, T.J., Freeman, J.V., Preece, M.A. (1995)
"Body mass index references curves for the UK, 1990"
Arch Dis Child 73: 25-29.

- 27** Collins, E. and Turner, G. (1973)
"The Noonan syndrome: a review of the clinical and genetic features of 27 cases."
J Pediatr 83: 941-950.
- 28** D'Ercole, A.J., Stiles, A.D., Underwood, L.E. (1984)
"Tissue concentration of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action."
Proc Natl Acad Sci USA 81: 935-939.
- 29** Dechert, U., Duncan, A.M.V., Bastien, L., Duff, C., Adam, M., Jirik, F.R. (1995)
"Protein-tyrosine phosphatase SH-PTP2 (PTPN11) is localized to 12q24.1-24.3." *Hum Genet* 96: 609-615.
- 30** Digilio, M. C., Conti, E., Sarkozy, A., Mingarelli, R., Dottorini, T., Marino, B., Pizzuti, A., Dallapiccola, B. (2002)
"Grouping of multiple-lentiginos/LEOPARD and Noonan syndromes on the PTPN11 gene."
Am J Hum Genet 71: 389-394.
- 31** Digilio, M. C., Marino, B., Picchio, F., Prandstraller, D., Toscano, A., Giannotti, A., Dallapiccola, B. (1998)
"Noonan syndrome and aortic coarctation."
Am J Med Genet 80:160-162.
- 32** Duncan, W. J., Fowler, R.S., Farkas, L.G., Ross, R.B., Wright, A.W., Bloom, K.R., Huot, D.J., Sondheimer, H.M., Rowe, R.D. (1981)
"A comprehensive scoring system for evaluating Noonan syndrome."
Am J Med Genet 10: 37-50.
- 33** Ehrlich, H. A., D. Gelfand, and Sninsky, J. (1991)
"Recent advances in the polymerase chain reaction."
Science 252: 1643-1651.
- 34** Evans, H. J. (1977)
"Chromosome anomalies among live births."
J Med Genet 14: 309-312.
- 35** Falls, H. F. and Kertesz, E.D. (1964)
"A new syndrome combining pterygium colli with developmental anomalies of the eyelids and lymphatics of the lower extremities."
Trans Am Ophthalmol Soc 62: 248-275.

- 36** Feng, G.-S. (1999)
"Shp-2 tyrosine phosphatase: signaling one cell or many."
Exp Cell Res 253: 47-54.
- 37** Flavell, G. (1943)
"Webbing of neck with Turner`s syndrome in the male."
Br J Surg 31:150-153.
- 38** Ford, C. E., Miller, O.J., Polani, P.E., de Almeida, J.C., Briggs, J.H. (1959)
"A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome)." *Lancet* 1: 711-713.
- 39** Fraccaro, M., Ikkos, D., Lindsten, J., Luft, R., Tillinger, K.G. (1961)
"Testicular Germinal Dysgenesis (Male Turner's Syndrome)."
Acta Endocr 36: 98-114.
- 40** Frawley, J. M. (1925)
"Congenital webbing."
Am J Dis Child 29: 799-805.
- 41** Fredriks, A.M., van Buuren, S., Burgmeijer, R.J., Meulmeester, J.F., Beuker, R.J., Brugman, E., Roede, M.J., Verloove-Vanhorick, S.P., Wit, J.M. (2000)
"Continuing positive secular growth change in the Netherlands 1955-1997."
Pediatr Res 47: 316-323
- 42** Futterweit, W., Chapman, M.L., Salvaneschi, J.P., Moloshok, R.E. (1961)
"Multiple Congenital Defects in a Twelve Year Old Boy With Cryptorchidism
"Male Turner's Syndrome."
Metabolism 10: 1074-1084.
- 43** Goeddel, D.V., Heyneker, H.L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yansura, D.G., Ross, M.J., Miozzari, G., Crea, R., Seeburg, P.H. (1979)
"Direct expression in Escherichia coli of a DNA sequence coding for human growth hormone."
Nature 281: 544-548
- 44** Gorlin, J. R., M. M. Cohen and Levin, L.S. (1990)
"Syndromes affecting the skin and mucosa."
In: Gorlin, J.R., Cohen, M.M., Levin, L.S. (eds): Syndromes of the head and neck.
(Oxford University Press, New York): 461-464.

- 45** Gorlin, R. J., R. C. Anderson and Blaw, M.E. (1969)
"Multiple lentiginos syndrome: complex comprising multiple lentiginos, electrocardiographic conduction abnormalities, ocular hypertelorism, pulmonary stenosis, abnormalities of genitalia, retardation of growth, sensorineural deafness, and autosomal dominant hereditary pattern."
Am J Dis Child 117: 652-662.
- 46** Guevara-Aguirre, J., Rosenbloom, A.L., Vaccarello, M.A., Fielder, P.J., de la Vega, A., Diamond Jr., F.B., Rosenfeld, R.G. (1991)
"Growth hormone receptor deficiency (Laron syndrome): Clinical and genetics characteristics."
Acta Paediatr Scand (Suppl) 377: 96-103.
- 47** Gustavson, K. H., Hagberg, H., Knutson, Sjoelin, S. (1964)
"The pterygium-collis syndrome in the male. A clinical, histological and cytogenetic study of two cases."
Acta Paediatr 53: 454-464.
- 48** Hagenäs, L. (1989)
"Clinical tests as predictors of growth response in GH treatment of short normal children."
Acta Paediatrica Scand (Suppl) 362: 36-42.
- 49** Hanisch, A., Dieterich, K.D., Dietzmann, K., Ludecke, K., Buchfelder, M., Fahlbusch, R. et al. (2000)
"Expression of members of the interleukin-6 family of cytokines and their receptors in human pituitary and pituitary adenomas."
J Clin Endocrinol Metab 85: 4411-4414.
- 50** Hasegawa, Y., Hasegawa, T., Aso, T., Kotoh, S., Nose, O., Ohyama, J., Araki, K., Tanaka, T., Saisyo, S., Yokoya, S., Nishi, J., Miyamoto, S., Sasaki, N., Kurimoto, F., Stene, M., Tsuchiya, Y. (1994)
"Clinical utility of insulin-like growth factor binding protein-3 in the evaluation and treatment of short children with expected growth hormone deficiency."
Acta Endocrinol (Copenh.) 131: 27-32.
- 51** Hauffa, B. P., Lehmann, N., Bettendorf, M., Mehls, O., Dorr, H.G., Partsch, C.J.; Schwarz, H.P., Stahnke, N., Steinkamp, H., Said, E., Sander, S., Ranke, M.B. (2004)
"Central reassessment of GH concentrations measured at local treatment centers in children with impaired growth: consequences for patient management."
Eur J Endocrinol 150: 291-297.

- 52** Heller, R. H. (1965)
"The Turner Phenotype in the Male."
J Pediat 66: 48-63.
- 53** Herington, A. C. (1991)
"Insulin-like growth factors: biochemistry and physiology."
Baillière`s Clin Endocrinol Metab 5(4).
- 54** Hindmarsh, P. C., Stanhope, R., Preece, M.A., Brook, C.G.D. (1990)
"Frequency of administration of growth hormone - an important factor in determining growth response to exogenous growth hormone."
Horm Res 33(4): 83-89.
- 55** Hof, P., Pluskey, S., Dhe-Paganon, S., Eck, M.J., Shoelson, S.E. (1998)
"Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2."
Cell 92: 441-450.
- 56** Innis, M. A., Myambo, K.B., Gelfand, D.H., Brow, M.A.D. (1988)
"DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase chain reaction-amplified DNA."
Proceedings of the National Academy of Science USA 85: 9436-9440.
- 57** Ion, A., Tartaglia, M., Song, X., Kalidas, K., van der Burgt, I., Shaw, A.C., Ming, J.E., Zampino, G., Zackai, E.H., Dean, J.C.S., Somer, M., Parenti, G., Crosby, A.H., Patton, M.A., Gelb, B.D., Jeffery, S. (2002)
"Absence of PTPN11 mutations in 28 cases of cardiofaciocutaneous (CFC) syndrome."
Hum Genet 111: 421-427.
- 58** Ishizawa, A., Oho, S., Dodo, H., Katori, T., Homma, S.I. (1996)
"Cardiovascular abnormalities in Noonan syndrome: the clinical findings and treatments."
Acta Paediatr Jpn 38: 84-90.
- 59** Jamieson, C. R., van der Burgt, I., Brady, A.F., van Reen, M., Elswawi, M.M., Hol, F., Jeffery, S., Patton, M.A., Mariman, E. (1994)
"Mapping a gene for Noonan syndrome to the long arm of chromosome 12."
Nat Genet 8: 357-360.
- 60** Janssen, O. E. (1992)
"Poymerase Ketten Reaktion, Grundlagen und Anwendung."
Kememai I: 8-17.

- 61** Joergensen, J. O. L., Moeller, N., Lauritzen, T., Alberti, K.G.M.M., Oerskov, H., Christiansen, J.S. (1990)
"Evening versus morning injections of growth hormone (GH) in GH-deficient patients: effects on 24-hour patterns of circulating hormones and metabolites."
J Clin Endocrinol Metab 70(1): 207-214.
- 62** Kim, S.O., Jiang, J., Yi, W., Feng, G.S., Frank, S.J. (1998)
"Involvement of the Src homology 2- containing tyrosine phosphatase SHP-2 in growth hormone signaling."
J Biol Chem 273: 2344-2355.
- 63** Klapper, D. G., M. E. Svoboda Van Wyk, J.J.. (1983)
"Sequence analysis of somatomedin-C: Confirmation of identity with insulin-like growth factor-I."
Endocrinology (Baltimore) 112: 2215-2217.
- 64** Klinker, R. and Silbernagel, S. (1996)
Lehrbuch der Physiologie. 2 ed.
- 65** Kobylinski, O. (1883)
"Über eine flughautähnliche Ausbreitung am Halse."
Archiv für Anthropologie 14: 343.
- 66** Kosaki, K., Suzuki, T., Muroya, K., Hasegawa, T., Sato, S., Matsuo, N., Kosaki, R., Nagai, T., Hasegawa, Y., Ogata, T. (2002)
"PTPN11 Mutations in Seven Japanese Patients with Noonan Syndrome."
J Clin Endocrinol Metab 87: 3529-3533.
- 67** Laron, Z. (1999)
"Natural history of the classical form of primary growth hormone (GH) resistance (Laron syndrome)"
J Pediatr Endocrinol Metab (Suppl 1) 12: 231-249.
- 68** Legius, E., Schrander-Stumpel, C., Schollen, E., Pulles-Heintzberger, C., Gewillig, M., Fryns, J.P. (2002)
"PTPN11 mutations in LEOPARD syndrome."
J Med Genet 39: 571-574.
- 69** Legius, E., Wlodarska, I., Wu, R., Fryns, J.P. (1994)
"Duplication (11)q13.3-q14.2 in a patient with Noonan syndrome."
Eur S Hum Genet : A 174.

- 70** Maheshwari, M., Belmont, J., Fernbach, S., Ho, T., Molinari, L., Yakub, I., Yu, F., Combes, A., Towbin, J., Craigen, W.J., Gibbs, R. (2002)
"PTPN11 Mutations in Noonan syndrome type I: detection of recurrent mutations in exon 3 and 13."
Hum Mutat 20: 298-304.
- 71** Marino, B., Digilio, M.C., Toscano, A., Giannotti, A., Dallapiccola, B. (1999)
"Congenital heart diseases in children with Noonan syndrome: an expanded cardiac spectrum with high prevalence of atroventricular canal."
J Pediatr 135: 703-706.
- 72** Mendez, H. M. and Opitz, J.M. (1985)
"Noonan syndrome: a review."
Am J Med Genet 21: 493-506.
- 73** Michl, P., Beikler, T., Engelhardt, D., Weber, M.M. (2000)
"Interleukin-3 and interleukin-6 stimulate bovine adrenal cortisol secretion through different pathways."
Neuroendocrinol 12(1): 23-28.
- 74** Miller, O. J. (1964)
"The sex chromosome anomalies."
Am J Obstet Gynecol 90: 1078-1082.
- 75** Mullis K., Faloona F. Scharf S. Saiki R. Horn G. Erlich H. (1986)
"Spezific enzymatic amplification of DNA In vitro: The Polymerase Chain Reaction." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51: 263-273.
- 76** Murad, F. (1993)
"Hormones and Hormon Antagonists."
In: Goodman and Gilman`s The Pharmacological Basis of Therapeutics. 8 ed.
- 77** Musante, L., Kehl, H.G., Majewski, F., Meinecke, P., Schweiger, S., Gillissen-Kaesbach, G., Wiczorek, D., Hinkel, G.K., Tinschert, S., Hoeltzenbein, M., Ropers, H.H., Kalscheuer, V.M. (2003)
"Spectrum of mutations in PTPN11 and genotype-phenotype correlation in 96 patients with Noonan syndrome and five patients with cardio-facio-cutaneous syndrome."
Eur J Hum Genet 11: 201-206.

- 78** Niklasson, A., Ericson, A., Fryer, J.G., Karlberg, J., Lawrence, C., Karlberg, P. (1991)
"An update of the Swedish reference standards for weight, length and head circumference at birth for given gestational age (1977-1981)."
Acta Paediatr Scand 80(8-9): 756-762.
- 79** Noonan, J. A. (1968)
"Hypertelorism with Turner phenotype."
Am J Dis Child 116: 373-380.
- 80** Noonan, J. A. and Ehmke, D.A. (1963)
"Associated noncardiac malformations in children with congenital heart disease." *Journal of Pediatrics* 63: 468-470.
- 81** Noordam, C., van der Burgt, I., Sweep, C.G., Delemarre-van de Waal, H.A., Sengers, R.C., Otten, B.J. (2001)
"Growth hormone (GH) secretion in children with Noonan syndrome: frequently abnormal without consequences for growth or response to GH treatment."
Clin Endocrinol 54: 53-59.
- 82** Noordam, K., van der Burgt, I., Brunner, H.G., Otten, B.J. (2002)
"The relationship between clinical severity of Noonan`s syndrome and growth, growth hormone (GH) secretion and response to GH treatment."
J Pediatr Endocrinol Metab 15: 175-180.
- 83** Nora, J. J., Lortscher, R.H. and Spangler, R.D (1974)
"The Ullrich-Noonan syndrome."
Am J Dis Child 127: 48-55.
- 84** Ohlsson, C., Isgaard, J., Törnell, J., Nilsson, A., Isaakson, O.G.P., Lindahl, A. (1993)
"Endocrine regulation of longitudinal bone growth."
Review Paper Acta Paediatr Scand (suppl) 391: 33-40.
- 85** Ooi, G. T. (1990)
"Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs): more than just 1, 2, 3."
Mol Cell Endocrinol 71: C39-C43.
- 86** Opitz, J. M. and Pallister, P.D. (1979)
"Brief historical note: the concept of gonadal dysgenesis."
American Journal of Medical Genetics 4: 333-343.

- 87** Opitz, J. M., R. L. Summitt, and Sarto, G.E. (1965)
"Noonan's syndrome in girls: A genocopy of the Ullrich-Turner syndrome."
J Pediatr 67: 968.
- 88** Pearl, W. (1977)
"Cardiovascular anomalies in Noonan's syndrome."
Chest 71: 677-679.
- 89** Postel-Vinay, M. C. and Fontoura, M. (1991)
"Regulation of growth hormone binding proteins in human plasma."
Review Paper Acta Paediatr Scand (suppl) 379: 79-82.
- 90** Pot, D. A. and Dixon, J.E. (1992)
"A thousand and two protein tyrosine phosphatases."
Biochim Biophys Acta 1136: 35-43.
- 91** Prader, A., Largo, R.H., Molinari, L., Issler, C. (1989)
"Physical growth of Swiss children from birth to 20 years of age. First Zurich longitudinal study of growth and development."
Helv Paediatr Acta Suppl 52: 1-125.
- 92** Qu, C.-K. and G.-S. Feng. (1998)
"Shp-2 has a positive regulatory role in ES cell differentiation and proliferation."
Oncogene 17: 433-439.
- 93** Qu, C.-K., Yu, W.-M., Azzarelli, B., Feng, G.-S. (1999)
"Biased suppression of the hematopoiesis and multiple developmental defects in chimeric mice containing Shp-2 mutant cells."
Mol Cell Biol 18: 6075-6082.
- 94** Ranke, M. B. and Haber, P. (1993)
"Wachstumshormonstimulationstests."
Ed. Ranke, M.B. (J & J Verlag, Mannheim): 70-86.
- 95** Ranke, M. B. Heidemann, P., Knupfer, C., Enders, H., Schmaltz, A.A., Bierich, J.R. (1988)
"Noonan syndrome: growth and clinical manifestations in 144 cases."
Eur J Pediatr 148: 220-227.
- 96** Ranke, M. B., Pfluger, H., Rosendahl, W., Stubbe, P., Enders, H., Bierich, J.R., Majewski, F. (1983)
"Turner syndrome: Spontaneous growth in 150 cases and review of the literature." *Eur J Pediatr* 141: 81-88.

- 97** Ranke, M.B. (1995)
"Growth hormone therapy in children: when to stop?"
Horm Res 43: 122-125.
- 98** Ranke, M.B., Dorr, H.G., Stahnke, N., Partsch, C.J., Schwarz, H.P., Wollmann, H.A., Bettendorf, M., Hauffa, B.P. (2000)
"Therapy of growth deficiency with growth hormone. Developments 10 years after the introduction of rekombinant growth hormone."
Monatszeitschrift Kinderheilkunde 148: 746-761.
- 99** Reischl, U. and Hell, W. (1993)
"Moderne Methoden der Nukleinsäure-Diagnostik."
Lab.-Med. 17: 456-464.
- 100** Reynolds, J. F., Neri, G., Herrmann, J.P., Blumberg, B., Coldwell, J.G., Miles, P.V., Opitz, J.M. (1986)
"New multiple congenital anomalies/mental retardation syndrome with cardio-facio-cutaneous involvement-the CFC syndrome."
Am J Med Genet 25: 413-427.
- 101** Rinderknecht, E. and Humbel, R.E.. (1978)
"The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin."
J.Biol.Chem. 253: 2769-2776.
- 102** Robinson, I.C.A.F., Carmignac, D.F., Fairhall, K.M. (1993)
" Growth hormone (GH) receptors, GH-binding protein and GH: an autoregulatory system?"
Review Paper Acta Paediatr (Suppl) 391: 22-28.
- 103** Rossi, E. and Caflisch, A. (1951)
"The pterygium syndrome; status Bonnevie-Ullrich, dystrophia brevicollis, Turner`s syndrome and congenital arthromyodysplasia."
Helv Pediatr Acta 6(2): 119-140.
- 104** Saiki, R. K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988)
"Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase."
Science 239: 487-491.
- 105** Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977)
"DNA sequencing with chain-terminating inhibitors."
Proceedings of the National Academy of Science 74: 5463-5467.

- 106** Saxton, T. M., Henkemeyer, M., Gasca, S., Shen, R., Rossi, D.J., Shalaby, F., Feng, G.-S., Pawson, T. (1997)
"Abnormal mesoderm patterning in mouse embryos mutant for the SH2 tyrosine phosphatase Shp-2."
Nat Genet 24: 420-423.
- 107** Schlüter, G., Rossuis, M., Wessel, A., Zoll, B. (2003)
"Das Noonan-Syndrom"
Deutsches Ärzteblatt Jg.100 Heft 18: 1192-1197.
- 108** Sharland, M., Morgan, M., Smith, G., Burch, M., Patton, M.A. (1993)
"Genetic counseling in Noonan syndrome."
Am J Med Genet 45: 437-440.
- 109** Sharland, M., Taylor, R., Patton, M.A., Jeffery, S. (1992)
"Absence of linkage of Noonan syndrome to the neurofibromatosis type 1 locus."
J Med Genet 29: 188-190.
- 110** Shen, S. H., Bastien, L., Posner, B.L., Chretien, P. (1991)
"A protein-tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyrosine kinases."
Nature 352: 736-739.
- 111** Shimasaki, S., Uchiyama, F., Shimonaka, M., Ling, N. (1990)
"Molecular cloning of the cDNAs encoding a novel insulin-like growth factor-binding protein from rat and human."
Mol Endocrinol 4: 1451-1458.
- 112** Smith, L. M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B.H. and Hood, L.E. (1986)
"Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis."
Nature 321: 674-679.
- 113** Smith, W.J., Nam, T.J., Underwood, L.E., Busby, W.H., Celnicker, A., Clemmons, D.R. (1993)
"Use of insulin like growth factor binding proteins 2 (IGFBP-2), IGFBP-3 and IGF 1 for assessing growth hormone status in short children."
J Clin Endocrinol Metabol 77(5): 1294-1299.
- 114** Spadoni, G. L., Bernardini, S., Cianfarani, S., Vaccaro, F., Pasquino, A.M., Cives, C., Pucarelli, I., Passeri, F., Dini, F., Boscherini, B. (1990)
"Spontaneous growth hormone secretion in Noonan's syndrome."
Acta Paediatrica Scand (Suppl) 367: 157.

- 115** Steiker, D. D. et al. (1961)
"Turner's Syndrome in the Male."
J Pediat 58: 321-329.
- 116** Stein-Gerlach, M., C. Wallasch, and A. Ullrich. (1998)
"SHP-2-containing protein tyrosine phosphatase-2."
Int J Biochem Cell Biol 30: 559-566.
- 117** Stofega, M. R., Herrington, J., Billestruo, N., Carter-Su, C. (2000)
"Mutation of the SHP-2 binding site in growth hormone (GH) receptor prolongs GH-promoted tyrosyl phosphorylation of GH receptor, JAK2 and STAT5B."
Mol Endocrinol 14: 1338-1350.
- 118** Summitt, R. L., Opitz, J. M. and Smith, D. W. (1965)
"Noonan's syndrome in the male."
J Pediat 67 / 5[2], 936. (Abstract)
- 119** Tamir, I., J. M. Dal Porto and Cambier, J.C. (2000)
"Cytoplasmic protein tyrosine phosphatase SHP-1 and SHP-2: regulators of B cell signal transduction."
Curr Opin Immunol 12: 307-315.
- 120** Tanaka, K., Sato, A., Naito, T., Kuramochi, K., Itabashi, H., Takemura, Y. (1992)
"Noonan syndrome presenting growth hormone neurosecretory dysfunction."
Intern Med 31: 908-911.
- 121** Tang, T. L., Freeman, R.M., O'Reilly, A.M., Neel, B.G., Sokol, S.Y. (1995)
"The SH2-containing protein-tyrosine phosphatase SH-PTP2 is required upstream of MAP kinase for early *Xenopus* development."
Cell 80: 473-483.
- 122** Tartaglia, M., Kalidas, K., Shaw, A., Song, X., Musat, D.L., van der Burgt, I., Brunner, H.G., Bertola, D.R., Crosby, A., Ion, A., Kucherlapati, R.S., Jeffery, S., Patton, M.A., Gelb, B.D. (2002)
"PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity."
Am J Hum Genet 70: 1555-1563.

Anhang

- 123** Tartaglia, M., Mehler, E.L., Goldberg, R., Zampino, G., Brunner, H.G., Kremer, H., van der Burgt, I., Crosby, A.H., Ion, A., Jeffery, S., Kalidas, K., Patton, M.A., Kucherlapati, R.S., Gelb, B.D. (2001)
"Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome."
Nat Genet 29: 465-468.
- 124** Tassabehji, M., Strachan, T., Sharland, M., Colley, A., Donnai, D., Harris, R., Thakker, N. (1993)
"Tandem duplication within a neurofibromatosis type I (NF1) gene exon in a family with features of Watson syndrome and Noonan syndrome."
Am J Hum Genet 53: 90-95.
- 125** Underwood, L. E., Thissen, J.P., Ketelslegers, J.M., Clemmons, P.R. (1994)
"Hormonal and nutrition regulation of IGF-I and its binding proteins."
Horm Res 42: 142-151.
- 126** Van der Burgt, I., Berends, E., Lommen, E., van Beersum, S., Hamel, B., Mariman, E. (1994)
"Clinical and molecular studies in a large Dutch family with Noonan syndrome."
Am J Med Genet 53: 187-191.
- 127** Van der Burgt, I. and Brunner, H. (2000)
"Genetic heterogeneity in Noonan syndrome: evidence for an autosomal recessive form."
Am J Med Genet 94: 46-51.
- 128** Weber, M.M., Michl, P., Auernhammer, C.J., Engelhardt, D. (1997)
"Interleukin-3 and interleukin-6 stimulate cortisol secretion from adult human adrenocortical cells."
Endocrinology 138(5): 2207-2210.
- 129** Witt, D. R. et al. (1986)
"Growth curves for height in Noonan syndrome."
Clin Genet 30: 150-153.
- 130** Woelfle, J., Chia, D.J., Massart-Schlesinger, M.B., Moyano, P., Rotwein, P. (2005)
"Molecular physiology, pathology and regulation of the growth hormone/insulin-like growth factor-I system."
Pediatr Nephrol 20: 295-302.

131 Wüster, C. (1995)

"Growth hormone, insulin-like growth factors and bone metabolism."
Review, Endocrinol Metabol 2: 3-12.

132 Yu, C-L-, Yong-Jiu, J., Burakoff, S.J. (2000)

"Cytosolic tyrosine dephosphorylation of STAT5."
J Biol Chem 275: 599-604.

133 Zenker, M., Buheitel, G., Rauch, R., Koenig, R., Bosse, K., Kress, W.,

Tietze, H.-U., Doerr, H.-G., Hofbeck, M., Singer, H., Reis, A., Rauch, A. (2004)

"Genotype-phenotype correlations in Noonan syndrome."
J Pediat 144: 368-374.

6.2 Danksagung

Für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und die Korrektur bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Priv. Doz. Dr.med. Binder. Des Weiteren danke ich Frau Dr. N.E. Wittekindt für die Unterstützung und die vielen Anregungen, sowie S.C. Schuster und H. Keller vom Max Planck Institut in Tübingen für die Hilfe und Unterstützung.

Einen großen Dank gebührt auch Frau C. Urban bei der technischen Unterstützung und allen Mitarbeitern der Sektion pädiatrische Endokrinologie der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin in Tübingen, die mir jederzeit mit ihren Auskünften weiterhalfen.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken für die Unterstützung während der Erstellung dieser Dissertation.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Thomas für seine ständige Unterstützung während dieser Zeit bedanken.

6.3 Lebenslauf

Name: KIRA NEUER

Geburtsdatum: 20.06.1981

Geburtsort: 73560 Böblingen

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1987-1991 Grundschule in Bittenfeld
1991-2000 Staufer-Gymnasium in Waiblingen
Juni 2000 Abitur

Studium: Oktober 2000 bis Februar 2002 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes.

April 2002 bis Februar 2006 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen.

Frühjahr 2003: Physikum

Frühjahr 2007: 2.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen: 15.09.03 bis 12.10.03 Innere Medizin (Gastroenterologie und Hepatologie), Klinikum Ludwigsburg

23.02.04 bis 02.04.04 Arbeitsmedizin, DaimlerChrysler AG in Untertürkheim

24.03.05 bis 10.04.05 Gynäkologie, Gemeinschaftspraxis Dr.med. Schramm und Dr.med. Gropengießer

01.08.05 bis 14.08.05 Gynäkologie und Geburtshilfe, Evg. Krankenhaus Kalk

15.08.05 bis 04.09.05 Unfallchirurgie, Klinikum Bietigheim

Praktisches Jahr: 27.02.06-18.06.06: Allgemeinmedizin bei Dr.U.-M. Werner

26.06.06-08.10.06:Chirurgie, Ospedale Regionale di Lugano (Schweiz)

