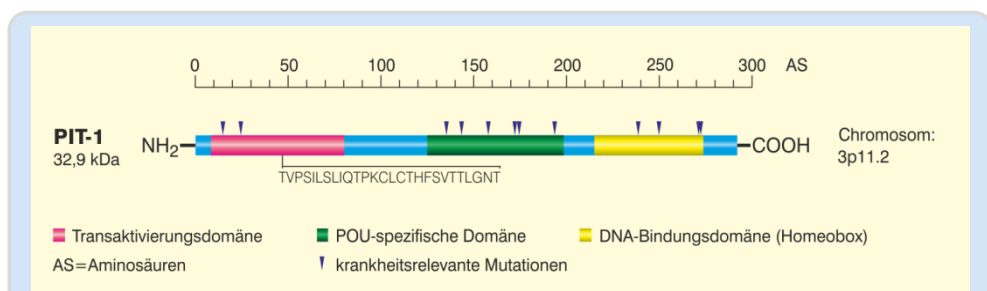




## PIT-1-Autoantikörper

<b>Akronym</b>	PIT-1 (pituitary-specific positive transcription factor 1)
<b>Genname</b>	<i>POU1F1</i>
<b>Indikationen</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>▶ Kombinierte GH, Prolaktin und TSH-Defizienz</li><li>▶ Combined pituitary hormone deficiency (CPHD)</li><li>▶ Anti-PIT-1-Antikörpersyndrom</li></ul>
<b>Siehe auch</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>▶ <a href="#">Autoantikörper bei Erkrankungen der Hypophyse</a></li><li>▶ <a href="#">PIT-1-Autoantikörper bei kombinierter Somatotropin-, Prolaktin- und Thyreotropin-Defizienz</a></li></ul>

**Antigen** Der hypophysenspezifische Transkriptionsfaktor PIT-1 (pituitary-specific transcriptional factor-1, PIT-1, POU1F1; Accession No: P28069) spielt eine zentrale Rolle bei der Expression von Wachstumshormon (GH), Prolaktin und Thyreoidea-stimulierendem Hormon  $\beta$  (TSH $\beta$ ). Er ist von Bedeutung für die Differenzierung somatotropher, laktotropher und thyretropher Zellen in der Hypophyse.



**Abbildung 1** Molekülstruktur von PIT-1 (POU1F1). PIT-1 (growth hormone factor-1, GHF-1, OMIM 173110) wird in zwei, durch alternatives Spleißen entstandenen Isoformen exprimiert, einer kürzeren Isoform PIT-1B (GHF-1, P28069-1; 291 aa, Mr 32,9 kDa, oben dargestellt), welche der kanonischen Sequenz entspricht und einer längeren Isoform A (PIT-1A, GHF-2, P28069-2; 317 aa, Mr 35,7 kDa) mit einer nach Threonin 47 beginnenden, 27 Aminosäuren umfassenden Insertion (Sequenz angegeben). Im N-terminalen Bereich findet sich eine Transaktivierungsdomäne, C-terminal davon gelegen sind die POU-Domäne mit der POU-spezifischen Sequenz (POU-s) und der durch einen Linker von 16 aa getrennten POU-Homeobox-Sequenz (POU-h). Die Tertiärstrukturen der DNA-bindenden Regionen (POU-s und POU-h) sind durch 3 bzw. 4 Helix-Motive gekennzeichnet. Die Orte der beim Menschen beschriebenen, mit kombinierten Hormondefekten (GH, PRL,  $\beta$ TSH) assoziierten PIT-1-Mutationen, sind angegeben.

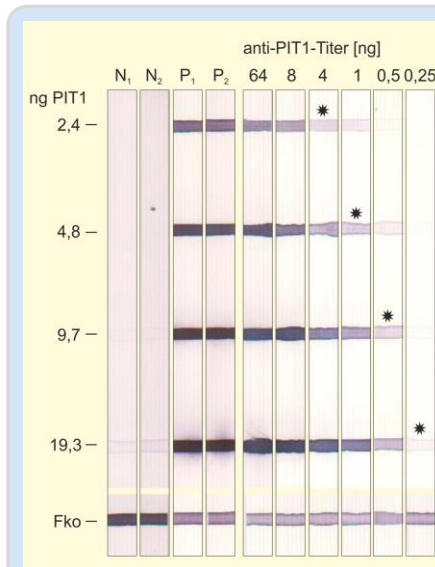
<b>Nachweismethoden</b>	Für den Nachweis von PIT-1-Autoantikörpern stehen verschiedene Methoden zur Verfügung:
<b>Indirekter Immunfluoreszenztest</b>	In Gewebeschnitten humaner oder muriner Hypophysen reagieren die Antikörper spezifisch mit intranukleär gelegenen PIT-1 GH-, PRL- und $\beta$ -TSH synthetisierender Zellen. Ein positiver vierstufiger IIFT (Nachweis einer spezifischen Bindung der im Patientenserum vorkommenden Antikörper bei simultaner immunologischer Markierung der hormone sezernierenden Zelle) erlaubt den Verdacht auf die Anwesenheit von anti-PIT-1-Antikörpern, der allerdings mit antigenspezifischen Methoden bestätigt werden muss.
<b>Western Blot</b>	Die Antikörper reagieren im Western Blot mit PIT-1 in elektrophoretisch aufgetrennten murinen (Maus, Ratte) oder humanen hypophysären Proteinextrakten sowie auch mit Extrakten aus GH3-Zellen (rat pituitary adenoma cells) und hPIT-1 exprimierenden Cos7- oder HEK293-Zellen. Sie erkennen eine dem Molekulargewicht von PIT-1 entsprechende Proteinbanden von 32,9 bzw. 35,7 kDa (Yamamoto et al. 2011).



## PIT-1-Autoantikörper

### Lineblot

Rekombinantes, gereinigtes in *E. coli* oder HEK293-Zellen synthetisiertes PIT-1-Protein kann, auf Nitrozellulosemembranen gesprüht, in Form von Lineblots zum einfachen Nachweis von PIT-1-Antikörpern herangezogen werden. Da auf einem Blot-Streifen verschiedene Antigenmengen aufgebracht werden können, ermöglicht der Test eine semiquantitative Einschätzung der im Serum vorhandenen Antikörperkonzentration (Abbildung 2).

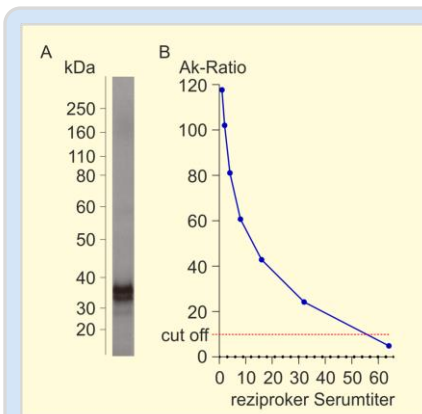


**Abbildung 2** Nachweis von Autoantikörpern gegen PIT-1 mittels Lineblot. Rekombinantes, in *E. coli* exprimiertes PIT-1 (kanonische Sequenz, pET-21a-Vektor [Novagen]) wurde nach Reinigung mittels  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatografie in den auf der Ordinate angegebenen Konzentrationen [ng/mL] auf Nitrozellulosemembranen gesprüht (Plotter: SX sciDROP NANO, Scienion AG, Berlin). Die angegebenen Proteinkonzentrationen entsprechen der sich in einer Spur des 3 mm breiten Blotstreifens befindenden absoluten Antigenmenge. Die Verwendung unterschiedlicher Antigenkonzentrationen erlaubt eine semiquantitative Abschätzung der im Serum vorhandenen Antikörperkonzentration. Als Funktionskontrolle (Fko) ist in der fünften Spur anti-human-IgG vom Kaninchen aufgebracht. Gebundene Antikörper wurden mit Hilfe von mit alkalischer Phosphatase markierten Zweitantikörpern sichtbar gemacht.  $\text{N}_1$ ,  $\text{N}_2$ : Negativkontrollen, Humanserum, Verdünnung 1:200.  $\text{P}_1$ ,  $\text{P}_2$  Positivkontrollen. Bei der Titration eines anti-PIT-1 positiven Serums (Antikörper-Titer in ng Immunglobulin/mL angegeben;

Sigma, HPA041646) zeigt sich beim Unterschreiten der Antikörpersättigung eine der Antigenkonzentration angenähert proportionale Abnahme der Färbereaktion (\*)

### Radioimmunopräzipitation

Für den spezifischen Nachweis von Autoantikörpern gegen PIT-1 wurde von uns ein Radioimmunopräzipitationsassay entwickelt, bei dem *in vitro* transkribiertes und translatiertes  $^{35}\text{S}$ -Methionin-markiertes PIT-1 als Antigen eingesetzt wird (Abbildung 3).



**Abbildung 5** Nachweis von Autoantikörpern gegen PIT-1 mittels Radioimmunopräzipitationsassay (RIPA).

**A** Autoradiogramm eines mittels SDS-PAGE aufgetrennten, *in vitro* transkribierten und translatierten sowie  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierten vollständigen, 6 Histidin-Tags enthaltenden PIT-1-Proteins mit (296 Aminosäuren, Mr 33,5 kDa) nach Chromatografie auf Sephadex G25 zur Entfernung nicht eingebauten Methionins. Die für die Synthese als Template dienende cDNA wurde aus dem Plasmid pCMV6-Entry-POU1F1 (Origene, RC216327) mit sequenzspezifischen Primern amplifiziert (100 % Übereinstimmung mit der Konsensus-Sequenz; NP\_000297.1) und in einen modifizierten pCITE-4a-Vektor (Novagen) kloniert. Das radioaktive Antigen ist frei von Kontaminationen und besitzt das zu erwartende Molekulargewicht.

**B** RIPA-Standardkurve: Präzipitation von  $^{35}\text{S}$ -Methionin-PIT-1 mit einer Mischung zweier polyvalenter anti-PIT-1-Antikörper vom Kaninchen (Sigma, HPA041646, SAB4200002). Die Auswertung des Assays erfolgte nach Frey und Mitarbeitern (Frey et al. 1998) mit 5 humanen Negativkontrollen.

### ELISA

Ein ELISA mit kommerziellem, rekombinantem in HEK293-Zellen exprimiertem PIT-1-Protein (SantaCruz Biochemicals) wurde von Yamamoto und Mitarbeitern beschrieben (Yamamoto et al. 2011).



## PIT-1-Autoantikörper

### Literatur

Bando H, Iguchi G, Yamamoto M, Hidaka-Takeno R, Takahashi Y: Anti-PIT-1 antibody syndrome; a novel clinical entity leading to hypopituitarism. *Pediatr Endocrinol Rev* (2015); 12(3): 290 - 296 (PMID: [25962206](#)).

Bando H, Iguchi G, Fukuoka H, Yamamoto M, Hidaka-Takeno R, Okimura Y, Matsumoto R, Suda K, Nishizawa H, Takahashi M, Tojo K, Takahashi Y: Involvement of PIT-1-reactive cytotoxic T lymphocytes in anti-PIT-1 antibody syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* (2014); 99(9): E1.744 - 1.749 (PMID: [24937538](#)).

Frey A, Di Canzio J, Zurakowski D: A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *J Immunol Methods* (1998); 221(1-2): 35 - 41 (PMID: [9894896](#)).

Yamamoto M, Iguchi G, Bando H, Fukuoka H, Suda K, Takahashi M, Nishizawa H, Matsumoto R, Tojo K, Mokubo A, Ogata T, Takahashi Y: A missense single-nucleotide polymorphism in the sialic acid acetyltransferase (SIAE) gene is associated with anti-PIT-1 antibody syndrome. *Endocr J* (2014); 61(6): 641 - 644 (PMID: [24748456](#)).

Yamamoto M, Iguchi G, Takeno R, Okimura Y, Sano T, Takahashi M, Nishizawa H, Handayaningshi AE, Fukuoka H, Tobita M, Saitoh T, Tojo K, Mokubo A, Morinobu A, Iida K, Kaji H, Seino S, Chihara K, Takahashi Y: Adult combined GH, prolactin, and TSH deficiency associated with circulating PIT-1 antibody in humans. *J Clin Invest* (2011); 121(1): 113 - 119 (PMID: [21123951](#)).

weitere Literatur siehe Laborinformation „[PIT-1-Autoantikörper bei kombinierter Somatotropin-, Prolaktin- und Thyreotropin-Defizienz](#)“