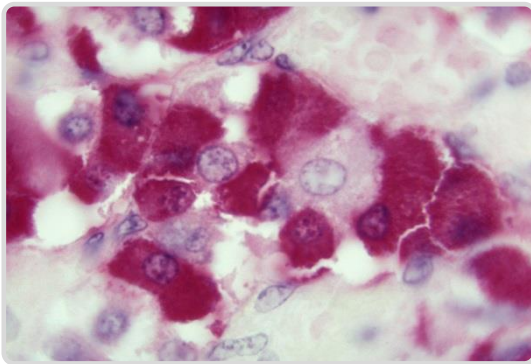


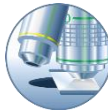
PIT-1-Autoantikörper

bei kombinierter
Somatotropin-, Prolaktin- und Thyreotropin-
Defizienz

Prof. Dr. med. Hans-Peter Seelig
Dr. rer. nat. Claudia A. Seelig



Hypophyse. Azidophile, Somatotropin sezernierende Zellen.



Autoantikörper - Autoantibodies - Autoanticorpi

Prof. Dr. med. Hans-Peter Seelig - Dr. rer. nat. Claudia A. Seelig
Karlsruhe - Merano

kontakt@hpseelig.de · www.hpseelig.de

1 Einleitung

Eine angeborene oder erworbene Hypophysenhormondefizienz kann sich in isolierter oder kombinierter Form manifestieren (isolated pituitary hormone deficiency, IPHD; combined pituitary hormone deficiency, CPHD). Den angeborenen Defizienzen liegen Mutationen einer Reihe der für die fetale Organogenese essenziellen Transkriptionsfaktoren (**Abbildung 1**) zu Grunde (**23, 50**), erworbene Defizienzen können durch Traumata, Tumoren, ionisierende Strahlen, vaskuläre Störungen (post-partum-Nekrosen), Infektionen oder durch Autoimmunprozesse verursacht werden. Als Kennzeichen hypophysärer Autoimmunprozesse gilt die seltene lymphozytäre Hypophysitis (Autoimmunhypophysitis) (**13, 33, 60**), deren Prävalenz bei <1 % der transssphenoidalen Interventionen liegt (**12, 41**). Die am häufigsten anzutreffende Form ist die den Hypophysenvorderlappen (HVL) betreffende, erstmals von Goudie und Pinkerton (**32**) unter dem Verdacht einer Autoimmunpathogenese beschriebene lymphozytäre Adenohypophysitis (LAH). Betroffen sind überwiegend Frauen im 4. Lebensdezennium, Assoziationen mit bestehenden oder abgelaufenen Schwangerschaften sind häufig (**5, 60**). Die im MRT meist darstellbare Hypertrophie der Hypophyse kann Kopfschmerzen, Visusbeschwerden und Diplopien verursachen. Etwa die Hälfte der Patienten entwickelt im Verlauf der Erkrankung einen Hypopituitarismus mit isolierten oder kombinierten ACTH- (32 %), TSH- (15 %), Gonadotropin- (14 %), Prolaktin- (7,5 %) oder seltener Somatotropin- (GH)-Defizienzen (**5, 14**).

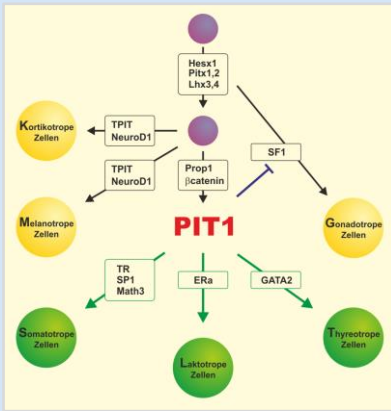


Abbildung 1 Transkriptionsfaktoren regulieren die Differenzierung und Expansion hypophysärer Zellen. Die Adenohypophyse enthält sechs unterschiedliche hormonsezernierende Zellen zu denen die im Hypophysenvorderlappen gelegenen somatotropen (Somatotropin, GH), laktotropen (Prolaktin, PRL), thyreotropen (Thyreotropin, TSH), kortikotropen (Adenokortikotropin, ACTH) und gonadotropen (LH, FSH) und die in der pars intermedialis gelegenen melanotropen (Melanozytenstimulierendes Hormon α -MSH) zählen. Die zeitlich und räumlich gesteuerte Differenzierung, Reifung und Expansion dieser Zellen wird unter Vermittlung zahlreicher Transkriptionsfaktoren, Signalmoleküle und Kofaktoren gesteuert. Einige dieser Transkriptionsfaktoren sind mit ihren Zielorten oben dargestellt.

PIT-1 stellt einen für die Entwicklung von somatotropen, laktotropen und thyreotropen Zellen essenziellen Transkriptionsfaktor dar, der auch für die spätere Hormonsekretion von Bedeutung ist. Sein Ausfall in postpubertärem Alter kann zu einer kombinierten GH-, PRL- und TSH-Defizienz bei Personen mit normaler Körpergröße führen. PIT-1 ist etwa ab der 7. SSW nachweisbar. Bisher wurden Autoantikörper gegen die beiden Transkriptionsfaktoren PIT-1 (Anti-PIT-1-Antikörper-Syndrom) und TPIT beschrieben (siehe Text, **Abbildung in Anlehnung an 68, 69**).

Als Indizien für die Immunpathogenese der lymphozytären Hypophysitis (LH) gelten 1. die lympho-monozytären Infiltrate mit $CD4^+$ T-Zellen, 2. ihre häufige Assoziation oder familiäre Koinkidenz mit anderen organspezifischen oder seltener mit systemischen Autoimmunerkrankungen wie Hashimoto Thyreoiditis, Morbus Basedow, Adrenalitis, perniziöser Anämie, Diabetes mellitus Typ 1, autoimmunem polyglandulären Syndromen (APS) oder systemischem Lupus erythematodes und 3. die in bis zu 60 % der Fälle von LH mit Hormondefizienz auftretenden anti-hypophysären Autoantikörper (anti-pituitary antibodies, APA),

Tabelle 1 Kandidaten-Antigene von Autoantikörpern bei autoimmuner (lymphozytärer) Hypophysitis. Angegeben sind die Prävalenzen (Präv) der mit dem indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) bzw. der mit dem antigenspezifischen Radioimmunpräzipitationsassay (RIPA) nachgewiesenen Autoantikörper, die Organspezifität (Ospez) der Antigene und die Krankheitsspezifität (Kspez) der Autoantikörper.

Kandidaten-Antigene	Ospez	Krankheiten	Präv [%]	Kspez	Lit
Laktotrope Zellen-IIFT	ja	Autoimmune Endokrinopathie Hashimoto Thyreoiditis	7,0 Kasuistik		11 38
Gonadotrope Zellen-IIFT	ja	IHH IHH Kallmann-Syndrom Gesunde Kontrollen	38,1 21,0 20,0 6,0		21 22 21
Kortikotrope Zellen-IIFT	ja	ACTH-Defizienz	14,8		21
Somatotrope Zellen-IIFT	ja	GH-Defizienz	26,0		21
Somatotropin, GH (RIPA)	ja	LAH LINH ACTH-Defizienz TSH-Defizienz	20,0 33,3 10,0 25,0	nein *5	62 61
PGSF1a (RIPA)	ja	LINH ACTH-D	33,3 20,0	nein *5	62
PGSF2 (RIPA)	ja	LAH LINH ACTH-Defizienz TSH-Defizienz LAH	20,0 11,1 10,0 50,0 9,5	nein *5 nein *2	62 57
α -Enolase (RIPA)	nein	LH Hypophysenadenome	41,2 46,2	nein *6	63
γ -Enolase, NSE (RIPA)	partiell	LH	2,3	*3	57
TPIT (RIPA)	ja	LH	10,5	nein *1	57
CHD8 (RIPA)	nein	LH	8,1	nein	
Piccolo (RIPA)	nein	LH	3,5	nein	
CADPS (RIPA)	nein	LH	14,0	nein	
Segretogranin II	nein	ESS (Empty-Sella-Syndrom)	Kasuistik	?	8
TDRD6 (RIPA)		LH APS1 APS1 und GH-Defizienz	0,0 49,0 50,0		7
HCS (HPL)	nein	LH	*4	?	45
C14orf166, CGI99, hCLE	ja	LH	*7	nein	
Pit-1 (POU1F1) ELISA	ja	LH (GH-, PRL-, TSH-Defekt)	Kasuistik	ja	66

IHH idiopathischer hypogonadotroper Hypogonadismus

LAH lymphozytäre Adenohypophysitis

LINH lymphozytäre Infundibulo-Hypophysitis

LH lymphozytäre Hypophysitis

APS1 autoimmunes polyendokrines Syndrom Typ 1

PGSF1a Pituitary gland specific factor 1a (c19orf30)

PGSF2 Pituitary gland specific factor 2

Fortsetzung Tabelle siehe Seite 4

Fortsetzung Tabelle 1

TPIT	T-box factor pituitary (T-box transcription factor TBC19), Transkriptionsfaktor kortikotroper Zellen, genetischer Defekt verursacht isolierte ACTH-Defizienz.
CHD8	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 8.
TDRD6	Tudor domain containing protein 6.
Piccolo	553 kDa Protein, beteiligt an der Fusion sekretorischer Vesikel mit der Plasmamembran.
CADP	Calcium-dependent activator protein for secretion, Vesikelexozytose neuroendokriner Zellen.
C14orf166	RNA-bindendes, in Nukleus und Zytoplasma vorkommendes Protein, involviert in RNA-Metabolismus. Assoziiert mit RNAP II, an Orten der RNAP II-gesteuerten RNA Transkription.
HCS	Human chorionic somatomammotropin
HPL	humanes Placentallaktogen
*1	Biopsie-bestätigte LH 4,8 %, Verdacht auf LH 9,3 %, ACTH-Defizienz 10,0 %, ESS + ACTH-Defizienz 16,7 %, Verdacht auf LINH + Diabetes insipidus 50 %, auch bei M. Addison, APS1, M. Basedow, Hashimoto Thyreoiditis, Typ 1 DM.
*2	Biopsie-bestätigte Fälle von LH. Prävalenzen bei Verdacht auf LH 2,3 %, 16,7 % bei ESS, 25 % bei Diabetes insipidus und 2,2 % bei Gesunden.
*3	Nicht in Biopsie-bestätigten Fällen. 1 von 6 mit ESS (16,7 %), 1 von 2 mit ESS + ACTH-Defizienz (50 %).
*4	Das beim Screening mit LH-Seren erhaltene Sequenzmotiv findet sich auch in den Isoformen 1 - 3 von GH1 sowie in den Isoformen 1 von CSH1 und CSH2.
*5	Sonstige Autoimmunerkrankungen (3,2 - 6,5 %, 43,5 % bei rheumatoider Arthritis [64]).
*6	Andere Erkrankungen der Hypophyse 20,0 % (ACTH-, TSH-Defizienz, Sheehan-Syndrom).
*7	Fragliches Autoantigen bei lymphozytärer Hypophysitis.

deren pathogene Bedeutung, Organ- und Krankheitsspezifität jedoch als sehr unsicher anzusehen sind, da sie häufig auch bei anderen hypophysären und extra-hypophysären Erkrankungen (Empty-Sella- oder Sheehan-Syndrom, Diabetes insipidus, Hyperprolaktinämie, Hypophysentumoren, M. Addison, M. Basedow, Hashimoto-Thyreoiditis, APS, Diabetes, u.a.) gefunden werden(5, 6; 9, 10, 13, 16, 19, 20, 21, 23, 34). Ein Hinweis auf ihre pathogene und/oder prognostische Bedeutung wurde auch darin gesehen, dass innerhalb von fünf Jahren 18,8 % der Antikörper-positiven APS-Patienten (APS-3, APS-4) einen Hypopituitarismus entwickelten, nicht aber die antikörper-negativen Patienten (6).

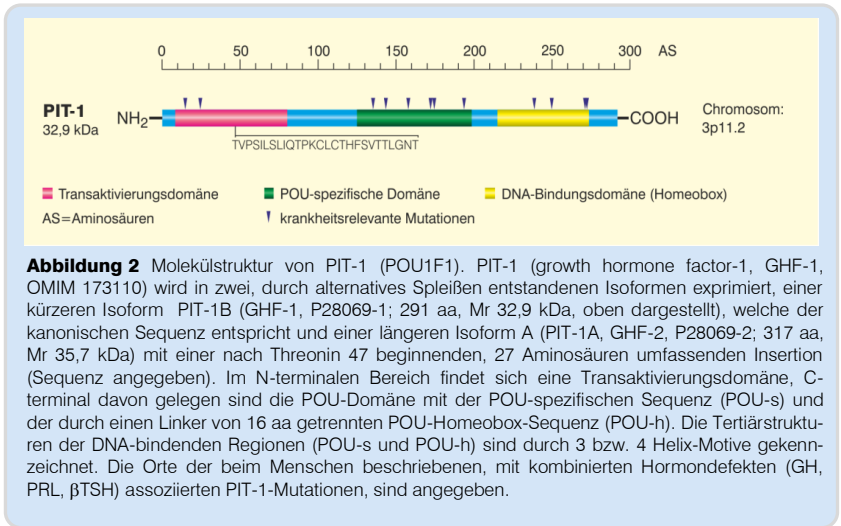
Zum Nachweis von APA wurde neben Komplementfixationstest (26), Western Blot und Immunoblot (18) oder Radioimmunpräzipitationsassay (RIPA; Tabelle 1; Abbildung 5) überwiegend der indirekte Immunfluoreszenztest (IIFT) an humanen oder tierischen Hypophysen eingesetzt, mit dem der Nachweis von Antikörpern gegen Prolaktin- (PRL-) sezernierende (11) und andere hormonbildende Zellen erfolgte (Übersicht: 5, 14). Da sich diese Antikörper nicht gegen die Hormone selbst sondern gegen unbekannte Zielantigene in den hormonbildenden Zellen richteten (11), waren die Ergebnisse wegen deren mangelnder Charakterisierung in hypophysären Proteinextrakten mit Hilfe von Western Blots erwartungsgemäß widersprüchlich (14, 18, 51, 52). Einige Kandidaten-Antigene wurden in den letzten Jahren auch molekularbiologisch charakterisiert (Tabelle 1). Ob die korrespondierenden Antikörper aber ursächlich für die Entstehung der Hypophysitis und der Hormondefizienzen verantwortlich sind, bleibt fraglich, da sie vielfach weder gewebe- noch krank-

heitsspezifisch sind. In der Diagnostik der lymphozytären Hypophysitis haben Untersuchungen auf Autoantikörper daher keinen besonderen Stellenwert erzielt.

Ein wichtiger Schritt in Richtung der Aufklärung der Autoimmunpathogenese hypophysärer Hormondefekte gelang mit dem Nachweis gewebe- und krankheitsspezifischer Autoantikörper gegen den Transkriptionsfaktor PIT-1 (POU1F1) bei Patienten mit einer erworbenen kombinierten Somatotropin-, Prolaktin- und Thyreotropin-Defizienz, einem auch als „Anti-PIT-1 Antibody-Syndrom“ bezeichnetem Krankheitsbild (4, 66).

2 PIT-1 Struktur und Funktion

Der im Hypophysenvorderlappen exprimierte Transkriptionsfaktor PIT-1 (POU1F1; **Abbildung 2**) kommt in zwei Isoformen (PIT-1A, Mr. 35,7 kDa und PIT-1B, Mr. 32,9 kDa) vor, die beide eine konservierte POU-Domäne enthalten (37, 50). POU-Domänen, ein Akronym, abgeleitet aus den drei mit konservierten homologen Domänen ausgestatteten Transkriptionsfaktoren Pit-1, Oct-2 und Unc-86, erkennen und binden an spezifische DNA-Sequenzen in Promotor-, Enhancer- und Silencer-Regionen der zu steuernden Gene (29). Die POU-spezifische (PUO-s) Domäne von PIT-1 umfasst 75 Aminosäuren (aa 124 - 198).



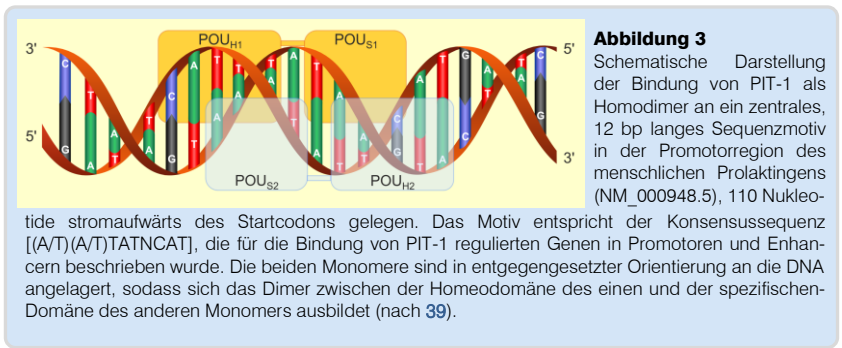
Sie ist von der C-terminal gelegenen 60 aa großen POU-homöo-Domäne (POU-h, aa 214 - 273) durch einen Linker von 16 aa getrennt. POU-h ist für weitere Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Faktoren wichtig. Die Tertiärstruktur des PIT-1 bildet Helix-Motive aus, welche für die Auffaltung dieser Proteindomäne und den direkten Kontakt mit der DNA verantwortlich sind (**Abbildung 3**). Die Zielsequenzen von PIT-1 sind AT-reiche Sequenzabschnitte welche das Sequenzmotiv (A/T)(A/T)TATNCAT als Kernmotiv aufweisen. Das Somatotropin-Gen enthält zwei dieser Sequenzmotive in seinem Promotor, der Prolaktin-Genpromotor weist vier solcher Bindungsstellen auf (27). Pit-1 bildet Homodimere im Bereich der DNA-Doppelhelix aus, die durch Interaktion mit weiteren Faktoren die Zielgene aktivieren. Für die hochaffine Bindung von PIT-1 an die GH-, PRL- und β -TSH-kodierenden Gene ist die Präsenz beider Untereinheiten der POU-Domäne notwendig.

PIT-1 ist ein für die Gentranskription bei der Spezifizierung und Expansion von somato-, lakto- und thyreotropen Zelllinien essenzieller Transkriptionsfaktor. Bei Erwachsenen

reguliert er die Transkription der GH-, PRL- und β -TSH-kodierenden Gene, sowie des GH-releasing-hormone-(GHRH-, Somatocrinin-)-Rezeptor-Gens (49) und des *Pit-1*-Gens selbst (50). Bei fehlender fetaler PIT1-Expression ist die Entwicklung und Funktion dieser endokrinen Zellen grundlegend gestört (15, 25, 37, 40, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 55, 56, 58, 65).

Beim Menschen wurde eine extrahypophysäre Expression von PIT-1 in gesundem und neoplastischem Mamma-Gewebe (31), in Placenta (2, 54) in hämatopoetischen und lymphoiden Geweben sowie in HL60-, Raji-Zellen (17) und MCF-7-Zellen (30) beschrieben. Eine erhöhte Expression von PIT-1 fand sich in Hypophysen-Tumoren (24, 1, 53).

Bei Snell- und Jackson- Zwergmäusen bestehen GH-, PRL- und TSH-Defizienzen, die durch Mutationen im *PIT-1*-Gen verursacht werden (42). Die Tiere zeigen eine Hypoplasie des HVL und Zwergwuchs. Beim Menschen wurden zahlreiche Mutationen des *PIT-1*-Gens beschrieben von denen die meisten im Bereich der POU-Domänen liegen (Abbildung 2). Sie können eine kongenitale kombinierte Hypophysenhormon-Defizienz mit Minderwuchs, Hypothyreoidismus und PRL-Defizienz auslösen (50).



3 Autoantikörper gegen PIT-1 (anti-PIT-1)

Antikörper gegen PIT-1 wurden bei drei Patienten mit einer adulten Form einer kombinierten GH-, PRL- und β -TSH-Defizienz entdeckt („Anti-PIT-1-Antibody-Syndrom“, 66). Die den Immunglobulinklassen IgG₁ und IgG₃ angehörenden Autoantikörper reagierten im Western Blot und ELISA mit nativem humanem und murinem PIT-1 aus hypophysären Proteinextrakten, mit PIT-1 aus GH3-Zellen (einer PIT-1 exprimierenden, GH und PRL sezernierenden, aus einem Hypophysenadenom der Ratte etablierten Zelllinie) sowie mit rekombinantem PIT-1, das in *E. coli* oder mittels *in vitro* Transkription und Translation (ivTT) synthetisiert wurde. Im indirekten Immunfluoreszenztest färbten sie die korrespondierenden hormonbildenden Zellen humaner und muriner Hypophysen. Die von den Antikörpern erkannten immunreaktiven Epitope lagen sowohl im Bereich der POU- als auch der Transaktivierungsdomäne (66).

Anti-PIT-1 ist weitgehend spezifisch für diese Form der adulten, kombinierten GH-, PRL- und β -TSH-Defizienz. Sie ließen sich weder bei gesunden Kontrollpersonen noch bei Patienten mit anderen Endokrinopathien wie Hypophysitis, Hypophysentumoren, Sheehan-Syndrom, Empty-Sella-Syndrom, isolierter ACTH-Defizienz, Typ 1 Diabetes mellitus, Autoimmunthyreoiditis, autoimmunem polyglandulärem Syndrom, M. Addison, Anti-Insulin-Antikörper-Syndrom und systemischen rheumatischen Autoimmunerkrankungen nachweisen. Es fanden sich bei den drei Patienten auch keine Antikörper gegen die in

Tabelle 1 aufgelisteten Zielantigene Enolase, Somatotropin oder TDRD6. Die Antikörper waren jedoch mit anderen, für autoimmune Endokrinopathien charakteristischen, organ-spezifischen Autoantikörpern wie anti-Thyreoidperoxidase, anti-Thyreoglobulin, anti-GDA (Glutamatdecarboxylase) oder anti-Parietalzellen vergesellschaftet, sodass das „Anti-PIT-1-Autoantikörper-Syndrom“ in den Definitionsbereich der autoimmunen polyglandulären Syndrome (APS) fiel. Es fehlten jedoch die klinischen Zeichen des APS-1 wie Hypoparathyreoidismus und Candidiasis sowie die für das APS-2 charakteristischen HLA-Haplotypen.

Die Serumspiegel der von PIT-1 gesteuerten Hormone waren bei allen drei Patienten bei normalem Längenwachstum deutlich vermindert. Bei keinem der Patienten fanden sich Hinweise auf Hyperplasien der Hypophyse, einer zeigte im MRT Anzeichen einer HVL-Atrophie. Histologisch und immunhistochemisch zeigte einer der dahin gehend untersuchten Patienten eine Atrophie der GH-, PRL- und TSH-sezierenden Zellen verbunden mit CD8⁺-T-Zellen enthaltenden lympho-plasmazellulären Infiltraten, welche letztere auch in Nebennieren, Schilddrüse, Magenschleimhaut, Leber und Pankreas anzutreffen waren.

3 Immunpathologie

Die Ursachen für das Auftreten von Autoantikörpern gegen PIT-1 sind noch unbekannt. Die drei Patienten besaßen keinen gemeinsamen HLA-Haplotyp, was eine Beteiligung von HLA-Loci an der Entstehung der Autoantikörper eher unwahrscheinlich macht. Mutationen des *PIT-1*-Gens, mit der Expression potenziell immunogener Proteine lagen nicht vor. Auffällig war, dass alle drei Patienten eine heterozygote Variante des Einzelnukleotidpolymorphismus A467N *SIAE*-Variante (c.400C>T,rs7941523) der Sialinsäureacetyltransferase aufwiesen (67). Katalytisch defektive Varianten der Sialinsäureacetyltransferase sind mit einer Reihe von Autoimmunerkrankungen assoziiert (36, 59). Sialinsäureacetyltransferase ist ein negativer Regulator der B-Zell Signalisierung, der auf inhibitorische Rezeptoren wirkt und bei Mäusen führt ein *SIAE*-Defekt zum Verlust der B-Zelltoleranz und zur spontanen Entwicklung von Autoantikörpern (59). Da der hier gefundene Einzelnukleotidpolymorphismus jedoch keinen Esterasedefekt nach sich zieht, bleibt seine mögliche Bedeutung für die Genese von Autoantikörpern vorerst unklar (67). Bei einem der dahin gehend untersuchten Patienten ließen sich jedoch mittels EliSpot PIT-1-reaktive zytotoxische T-Zellen nachweisen (4), sodass möglicherweise auf noch unbekanntem Wege entstandene immunreaktive zytotoxische T-Zellen hypophysäre Zellen, die PIT-1-Peptide zusammen mit MHC I-Molekülen auf ihrer Oberfläche exprimieren, zerstören könnten. Im Verlaufe eines solchen Prozesses könnte sich in einem proinflammatorischen Umfeld eine humorale Immunantwort gegenüber PIT-1 aufbauen. Die bei einem der Patienten nachgewiesenen lymphozytären Infiltrate in Hypophyse, Thyreoidea, Nebenniere, Leber und Pankreas wären ein möglicher Hinweis auf eine pathologische T-Zellfunktion (4, 66).

Unklar bleibt auch, ob den Autoantikörpern selbst eine pathologische Rolle bei der Genese des Entzündungsprozesses und der Zerstörung PIT-1 exprimierender Zellen im HVL zugeschrieben werden kann. *In vitro* zeigten die Antikörper keine komplementabhängigen zytotoxischen Effekte gegenüber PIT-1 exprimierenden GH3-Zellen oder gegenüber Zellen aus Primärkulturen muriner Hypophysen. Sie beeinflussten weder die Proliferationsrate von GH3-Zellen noch deren PIT-1-Transkription und GH- oder PRL-Sekretion. PIT-1 als intranukleärer Transkriptionsfaktor ist für zirkulierende Antikörper auch nicht akzessibel. Anti-PIT-1 können immunpathologische Reaktionen erst sekundär nach Schädigung und Freisetzung von PIT-1 aus den exprimierenden Zellen initiieren. Die Antikörper stellen somit eher ein Epiphänomen des Krankheitsprozesses dar, das wegen seiner Assoziation mit

dem Krankheitsbild jedoch von diagnostischer Bedeutung sein könnte. Der Nachweis von PIT-1-spezifischen reaktiven zytotoxischen T-Zellen spricht dafür, dass in erster Linie zelluläre Immunprozesse für die Entstehung dieser Form der Hypophysitis verantwortlich sein dürften wobei aber die kombinierte Defizienz von GH, PRL und TSH, den drei von PIT-1 gesteuerten Hormonen und die Anwesenheit eines spezifisch gegen PIT-1 gerichteten Autoantikörpers im Kontext einer lymphozytären Hypophysitis mit selektivem Untergang der korrespondierenden hormonproduzierenden Zellen vermuten lassen, dass diesen Antikörpern auch eine noch unbekannte Rolle in der Pathogenese der Erkrankung zukommen könnte. Es wäre zu überprüfen, ob Patienten mit derartigen kombinierten Hormondefizienzen ohne Mutationen im *PIT-1*-Gen ähnliche Autoimmunphänomene entwickeln, zumal da sich bei den meisten Patienten mit CPHD keine Mutationen in den Genen der beteiligten Transkriptionsfaktoren nachweisen lassen.

Da die für ein differenziertes therapeutisches Vorgehen erforderliche sichere Abgrenzung der autoimmunen Hypophysitis von anderen pathologischen Prozessen zur Zeit nur histologisch, d. h. nach transsphenoidaler Intervention, möglich ist, könnte dem Nachweis krankheitsspezifischer Autoantikörper gegen Transkriptionsfaktoren auch bei anderen Formen nicht genetisch bedingter Hormon-Defizienzen eine diagnostische Bedeutung zukommen. Antikörper gegen den für die terminale Differenzierung kortikotroper Zellen benötigten Transkriptionsfaktor TPIT wurden bei Patienten mit Hypophysitis und ACTH-Defizienz beobachtet (57), solche gegen die Transkriptionsfaktoren SOX9, und SOX10 bei APS-1-Patienten (35).

4 Nachweismethoden

Für den Nachweis von PIT-1-Autoantikörpern stehen verschiedene Methoden zur Verfügung:

4.1 Indirekter Immunfluoreszenztest: In Gewebeschnitten humaner oder muriner Hypophysen reagieren die Antikörper spezifisch mit intranukleär gelegenen PIT-1 GH-, PRL- und β -TSH synthetisierender Zellen. Ein positiver vier-stufiger 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.

4.2 ELISA: Ein ELISA mit kommerziellem, rekombinantem in HEK293-Zellen exprimiertem PIT-1-Protein (SantaCruz Biochemicals) wurde von Yamamoto und Mitarbeitern beschrieben (66).

4.3 Western Blot: 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 (66).

4.4 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 4).

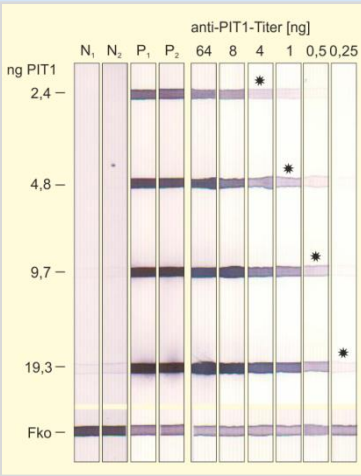


Abbildung 4 Nachweis von Autoantikörpern gegen PIT-1 mittels Lineblot. Rekombinantes, in *E. coli* exprimiertes PIT-1 (kanonische Sequenz, pET-21a-Vektor [Novagen]) wurde nach Reinigung mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatografie in den auf der Ordinate angegebenen Konzentrationen [ng/mL] auf Nitrozellulosemembranen 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 semi-quantitative 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.

N_1 , N_2 : Negativkontrollen, Humanserum, Verdünnung 1:200. P_1 , 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 Färbreaktion (*).

4.5 Radioimmunopräzipitation: Für den spezifischen Nachweis von Autoantikörpern gegen PIT-1 wurde von uns ein Radioimmunopräzipitationsassay entwickelt, bei dem *in vitro* transkribiertes und translatiertes ^{35}S -Methionin-markiertes PIT-1 als Antigen eingesetzt wird (Abbildung 5).

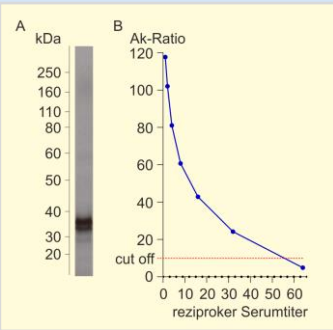


Abbildung 5 Nachweis von Autoantikörpern gegen PIT-1 mittels Radioimmunopräzipitationsassay (RIPA).

A Autoradiogramm eines mittels SDS-PAGE aufgetrennten, *in vitro* transkribierten und translatierten sowie ^{35}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}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 (28) mit 5 humanen Negativkontrollen.

Literatur

- 1 Asa SL, Puy LA, Lew AM, Sundmark VC, Elsholtz HP: Cell typespecific expression of the pituitary transcription activator Pit-1 in the human pituitary and pituitary adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (1993); 77(5): 1275 - 1280 (PMID: [8077321](#)).
- 2 Bamberger AM, Bamberger CM, Pu LP, Puy LA, Loh YP, Asa SL: Expression of pit-1 messenger ribonucleic acid and protein in the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* (1995); 80(7): 2.021 - 2.026 (PMID: [7608249](#)).
- 3 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](#)).
- 4 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](#)).
- 5 Bellastella A, Bizzarro A, Coronella C, Bellastella G, Sinisi AA, De Bellis A: Lymphocytic hypophysitis: a rare or underestimated disease? *Eur J Endocrinol* (2003); 149(5): 363 - 376 (PMID: [14585081](#)).
- 6 Bellastella G, Rotondi M, Pane E, Dello Iacovo A, Pirali B, Dalla Mora L, Falorni A, Sinisi AA, Bizzarro A, Colao A, Chiovato L, De Bellis A; Italian Autoimmune Hypophysitis Network Study: Predictive role of the immunostaining pattern of immunofluorescence and the titers of antipituitary antibodies at presentation for the occurrence of autoimmune hypopituitarism in patients with autoimmune polyendocrine syndromes over a five-year follow-up. *J Clin Endocrinol Metab* (2010); 95(8): 3.750 - 3.757 (PMID: [20501686](#)).
- 7 Bensing S, Fetissoff SO, Mulder J, Perheentupa J, Gustafsson J, Husebye ES, Oscarson M, Ekwall O, Crock PA, Hökfelt T, Hulting AL, Kämpe O: Pituitary autoantibodies in autoimmune polyendocrine syndrome type 1. *Proc Natl Acad Sci* (2007 **b**); 104(3): 949 - 954 (PMID: [17215373](#)).
- 8 Bensing S, Hulting AL, Höög A, Ericson K, Kämpe O: Lymphocytic hypophysitis: report of two biopsy-proven cases and one suspected case with pituitary autoantibodies. *J Endocrinol Invest* (2007 **a**); 30(2): 153 - 162 (PMID: [17392607](#)).
- 9 Beressi N, Beressi JP, Cohen R, Modigliani E: Lymphocytic hypophysitis. A review of 145 cases. *Ann Med Interne (Paris)* (1999); 150(4): 327 - 341 (PMID: [10519020](#)).
- 10 Betterle C, Greggio NA, Volpato M. Clinical review 93: Autoimmune polyglandular syndrome type 1. *J Clin Endocrinol Metab* (1998); 83(4): 1.049 - 1.055 (PMID: 9543115).
- 11 Bottazzo GF, Pouplard A, Florin-Christensen A, Doniach D. Autoantibodies to prolactin-secreting cells of human pituitary. *Lancet* (1975); 2(7.925): 97 - 101 (PMID: [49739](#)).
- 12 Buxton N, Robertson I: Lymphocytic and granulocytic hypophysitis: a single centre experience. *Br J Neurosurg* (2001); 15(3): 242 - 245 (PMID: [11478060](#)).
- 13 Caturegli P, Newschaffer C, Olivi A, Pomper MG, Burger PC, Rose NR: Autoimmune hypophysitis. *Endocr Rev* (2005); 26(5): 599 - 614 (PMID: [15634713](#)).
- 14 Caturegli P, Lupi I, Landek-Salgado M, Kimura H, Rose NR: Pituitary autoimmunity: 30 years later. *Autoimmun Rev* (2008); 7(8): 631 - 637 (PMID: [18774118](#)).
- 15 Chen R, Ingraham HA, Treacy MN, Albert VR, Wilson L, Rosenfeld MG: Autoregulation of Pit-1 gene expression is mediated by two cis-active elements. *Nature* (1990); 346(6284): 583 - 586 (PMID: [2142999](#)).
- 16 Cheung CC, Ezzat S, Smyth HS, Asa SL: The spectrum and significance of primary hypophysitis. *J Clin Endocrinol Metab* (2001); 86(3): 1.048 - 1.053 (PMID: [11238484](#)).
- 17 Costoya JA, García-Barros M, Gallego R, Señaris R, Arce VM, Devesa J: Correlation of Pit-1 gene expression and Pit-1 content with proliferation and differentiation in human myeloid leukemic cells. *Exp Cell Res* (1998); 245(1): 132 - 136 (PMID: [9828108](#)).

- 18 Crock PA: Cytosolic autoantigens in lymphocytic hypophysitis. *J Clin Endocrinol Metab* (1998); 83(2): 609 - 618 (PMID: [9467582](#)).
- 19 De Bellis A, Bizzarro A, Conte M, Perrino S, Coronella C, Solimeno S, Sinisi AM, Stile LA, Pisano G, Bellastella A: Antipituitary antibodies in adults with apparently idiopathic growth hormone deficiency and in adults with autoimmune endocrine diseases. *J Clin Endocrinol Metab* (2003); 88(2): 650 - 654 (PMID: [12574195](#)).
- 20 De Bellis A, Salerno M, Conte M, Coronella C, Tirelli G, Battaglia M, Esposito V, Ruocco G, Bellastella G, Bizzarro A, Bellastella A: Antipituitary antibodies recognizing growth hormone (GH)-producing cells in children with idiopathic GH deficiency and in children with idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab* (2006); 91(7): 2.484 - 2.49 (PMID: [16621907](#)).
- 21 De Bellis A, Sinisi AA, Conte M, Coronella C, Bellastella G, Esposito D, Pasquali D, Ruocco G, Bizzarro A, Bellastella A: Antipituitary antibodies against gonadotropin-secreting cells in adult male patients with apparently idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* (2007); 92(2): 604 - 607 (PMID: [17090639](#)).
- 22 De Bellis A, Pane E, Bellastella G, Sinisi AA, Colella C, Giordano R, Giavoli C, Lania A, Ambrosio MR, Di Somma C, Zatelli MC, Arvat E, Colao A, Bizzarro A, Bellastella A; Italian Autoimmune Hypophysitis Network Study: Detection of antipituitary and antihypothalamus antibodies to investigate the role of pituitary or hypothalamic autoimmunity in patients with selective idiopathic hypopituitarism. *Clin Endocrinol* (2011); 75(3): 361 - 366 (PMID: [21521324](#)).
- 23 de Graaff LC, De Bellis A, Bellastella A, Hokken-Koelega AC: Antipituitary antibodies in dutch patients with idiopathic hypopituitarism. *Horm Res* (2009); 71(1): 22 - 27 (PMID: [19039233](#)).
- 24 Delhase M, Vergani P, Malur A, Velkeniers B, Tengels E, Trouillas J, Hooghe-Peters EL: Pit-1/GHF-1 expression in pituitary adenomas: further analogy between human adenomas and rat SMTW tumours. *J Mol Endocrinol* (1993); 11(2): 129 - 139 (PMID: [8297469](#)).
- 25 Dollé P, Castrillo JL, Theill LE, Deerinck T, Ellisman M, Karin M. Expression of GHF-1 protein in mouse pituitaries correlates both temporally and spatially with the onset of growth hormone gene activity. *Cell* (1990); 60(5): 809 - 820 (PMID: [1690079](#)).
- 26 Engelberth O, Jezková Z: Autoantibodies in Sheehan's syndrome. *Lancet* (1965); 285(7.394): 1.075.
- 27 Fox SR, Jong MT, Casanova J, Ye ZS, Stanley F, Samuels HH: The homeodomain protein, Pit-1/GHF-1, is capable of binding to and activating cell-specific elements of both the growth hormone and prolactin gene promoters. *Mol Endocrinol* (1990); 4(7): 1.069 - 1.080 (PMID: [2284007](#)).
- 28 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](#)).
- 29 Gehring WJ: Homeo boxes in the study of development. *Science* (1987); 236(4.806): 1.245 - 1.252 (PMID: [2884726](#)).
- 30 Gil-Puig C, Blanco M, García-Caballero T, Segura C, Perez-Fernandez R: Pit-1/GHF-1 and GH expression in the MCF-7 human breast adenocarcinoma cell line. *J Endocrinol* (2002); 173(1): 161 - 167 (PMID: [11927395](#)).
- 31 Gil-Puig C, Seoane S, Blanco M, Macia M, Garcia-Caballero T, Segura C, Perez-Fernandez R: Pit-1 is expressed in normal and tumorous human breast and regulates GH secretion and cell proliferation. *Eur J Endocrinol* (2005); 153(2): 335 - 344 (PMID: [16061841](#)).
- 32 Goudie RB, Pinkerton PH: Anterior hypophysitis and Hashimoto's disease in a young woman. *J Pathol Bacteriol* (1962); 83: 584 - 585 (PMID: [13900798](#)).
- 33 Hamnvik OP, Laury AR, Laws ER Jr, Kaiser UB: Lymphocytic hypophysitis with diabetes insipidus in a young man. *Nat Rev Endocrinol* (2010); 6(8): 464 - 470 (PMID: [20585348](#)).
- 34 Hashimoto K, Takao T, Makino S: Lymphocytic adenohypophysitis and lymphocytic infundibuloneurohypophysitis. *Endocr J* (1997); 44(1): 1 - 10 (PMID: [9152609](#)).
- 35 Hedstrand H, Ekwall O, Olsson MJ, Landgren E, Kemp EH, Weetman AP, Perheentupa J, Husebye E, Gustafsson J, Betterle C, Kämpe O, Rorsman F: The transcription factors SOX9 and SOX10 are

- vitiligo autoantigens in autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Biol Chem* (2001); 276(38): 35.390 - 35.395 (PMID: [11423552](#)).
- 36 Hirschfield GM, Xie G, Lu E, Sun Y, Juran BD, Chellappa V, Coltescu C, Mason AL, Milkiewicz P, Myers RP, Odin JA, Luketic VA, Bacon B, Bodenheimer H, Liakina V, Vincent C, Levy C, Pillai S, Lazaridis KN, Amos CI, Siminovitch KA: Association of primary biliary cirrhosis with variants in the CLEC16A, SOCS1, SPIB and SIAE immunomodulatory genes. *Genes Immun* (2012);13(4): 328 - 335 (PMID: [22257840](#)).
- 37 Ingraham HA, Chen RP, Mangalam HJ, Elsholtz HP, Flynn SE, Lin CR, Simmons DM, Swanson L, Rosenfeld MG: A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* (1988); 55(3): 519 - 529 (PMID: [2902928](#)).
- 38 Iwama S, Welt CK, Romero CJ, Radovick S, Caturegli P: Isolated prolactin deficiency associated with serum autoantibodies against prolactin-secreting cells. *J Clin Endocrinol Metab* (2013); 98(10): 3.920 - 3.925 (PMID: [23940128](#)).
- 39 Jacobson EM, Li P, Leon-del-Rio A, Rosenfeld MG, Aggarwal AK: Structure of Pit-1 POU domain bound to DNA as a dimer: unexpected arrangement and flexibility. *Genes Dev* (1997); 11(2): 198 - 212 (PMID: [9009203](#)).
- 40 Lefevre C, Imagawa M, Dana S, Grindlay J, Bodner M, Karin M. Tissue specific expression of the human growth hormone gene is conferred in part by the binding of a specific trans-acting factor. *EMBO J* (1987); 6(4): 971 - 981 (PMID: [3595566](#)).
- 41 Leung GK, Lopes MB, Thorner MO, Vance ML, Laws ER Jr. Primary hypophysitis: a single-center experience in 16 cases. *J Neurosurg* (2004); 101(2): 262 - 271 (PMID: [15309917](#)).
- 42 Li S, Crenshaw EB, Rawson EJ, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG: Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene Pit-1. *Nature* (1990); 347(6.293): 528 - 533 (PMID: [1977085](#)).
- 43 Lin C, Lin SC, Chang CP, Rosenfeld MG: Pit-1-dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature* (1992); 360(6.406): 765 - 768 (PMID: [1334535](#)).
- 44 Lin SC, Li S, Drolet DW, Rosenfeld MG: Pituitary ontogeny of the Snell dwarf mouse reveals Pit-1-independent and Pit-1-dependent origins of the thyrotrope. *Development* (1994); 120(3): 515 - 522 (PMID: [8162852](#)).
- 45 Lupi I, Broman KW, Tzou SC, Gutenberg A, Martino E, Caturegli P: Novel autoantigens in autoimmune hypophysitis. *Clin Endocrinol* (2008); 69(2): 269 - 278 (PMID: [18194487](#)).
- 46 Mangalam HJ, Albert VR, Ingraham HA, Kapiloff M, Wilson L, Nelson C, Elsholtz H, Rosenfeld MG: A pituitary POU domain protein, Pit-1, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally. *Genes Dev* (1989); 3(7): 946 - 958 (PMID: [2550324](#)).
- 47 McCormick A, Brady H, Theill LE & Karin M. Regulation of the pituitary specific homeobox gene GHF-1 by cell autonomous and environmental cues. *Nature* (1990); 345(6.278): 829 - 832 (PMID: [1972784](#)).
- 48 Nelson C, Albert VR, Elsholtz HP, Lu LI-W, Rosenfeld MG: Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor. *Science* (1988); 239(4.846): 1.400 - 1.405 (PMID: [2831625](#)).
- 49 Petersenn S, Rasch AC, Heyens M, Schulte HM: Structure and regulation of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene. *Mol Endocrinol* (1998); 12(2): 233 - 247 (PMID: [9482665](#)).
- 50 Pfäffle RW, DiMattia GE, Parks JS, Brown MR, Wit JM, Jansen M, Van der Nat H, Van den Brande JL, Rosenfeld MG, Ingraham HA: Mutation of the POU-specific domain of Pit-1 and hypopituitarism without pituitary hypoplasia. *Science* (1992); 257(5.073): 1.118 - 1.121 (PMID: [1509263](#)).
- 51 Pisanu C, Cocco C, Cossu E, Baroni MG, Pigliaru F, Manetti L, Lupi I, Martino E, Mariotti S: Anterior pituitary autoantibodies in patients with type 1 diabetes mellitus: methodological problems and clinical correlations. *J Endocrinol Invest* (2014); 37(10): 973 - 978 (PMID: [25070044](#)).

- 52 Ricciuti A, De Remigis A, Landek-Salgado MA, De Vincentiis L, Guaraldi F, Lupi I, Iwama S, Wand GS, Salvatori R, Caturegli P: Detection of pituitary antibodies by immunofluorescence: approach and results in patients with pituitary diseases. *J Clin Endocrinol Metab* (2014); 99(5): 1.758 - 1.766 (PMID: [24606106](#)).
- 53 Sanno N, Teramoto A, Matsuno A, Osamura RY: Expression of human Pit-1 product in the human pituitary and pituitary adenomas. Immunohistochemical studies using an antibody against synthetic human Pit-1 product. *Arch Pathol Lab Med* (1996); 120(1): 73 - 77 (PMID: [8554449](#)).
- 54 Schanke JT, Conwell CM, Durning M, Fisher JM, Golos TG. Pit-1/Growth hormone factor 1 splice variant expression in the rhesus monkey pituitary gland and the rhesus and human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* (1997); 82(3): 800 - 807 (PMID: [9062486](#)).
- 55 Scully KM, Rosenfeld MG: Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science* (2002); 295(5.563): 2.231 - 2.235 (PMID: [11910101](#)).
- 56 Simmons DM, Voss JW, Ingraham HA, Holloway JM, Broide RS, Rosenfeld MG, Swanson LW: Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev* (1990); 4(5): 695 - 711 (PMID: [2379827](#)).
- 57 Smith CJ, Bensing S, Burns C, Robinson PJ, Kasperlik-Zaluska AA, Scott RJ, Kämpe O, Crock PA: Identification of TPIT and other novel autoantigens in lymphocytic hypophysitis: immunoscreening of a pituitary cDNA library and development of immunoprecipitation assays. *Eur J Endocrinol* (2012); 166(3): 391 - 398 (PMID: [22193973](#)).
- 58 Steinfeldt HJ, Hauser P, Nakayama Y, Radovick S, McClaskey JH, Taylor T, Weintraub BD, Wondisford FE: Thyrotropin-releasing hormone regulation of human TSHB expression: role of a pituitary-specific transcription factor (Pit-1/GHF-1) and potential interaction with a thyroid hormone-inhibitory element. *Proc Natl Acad Sci* (1991); 88(8): 3.130 - 2.134 (PMID: [1901656](#)).
- 59 Suroli I, Pirnie SP, Chellappa V, Taylor KN, Cariappa A, Moya J, Liu H, Bell DW, Driscoll DR, Diederichs S, Haider K, Netravali I, Le S, Elia R, Dow E, Lee A, Freudenberg J, De Jager PL, Chretien Y, Varki A, MacDonald ME, Gillis T, Behrens TW, Bloch D, Collier D, Korzenik J, Podolsky DK, Hafler D, Murali M, Sands B, Stone JH, Gregersen PK, Pillai S: Functionally defective germline variants of sialic acid acetyltransferase in autoimmunity. *Nature* (2010); 466(7.303): 243 - 247 (PMID: [20555325](#)).
- 60 Takahashi Y: Autoimmune hypophysitis: new developments. *Handb Clin Neurol* (2014); 124: 417 - 422 (PMID: [25248604](#)).
- 61 Takao T, Nanamiya W, Matsumoto R, Asaba K, Okabayashi T, Hashimoto K: Antipituitary antibodies in patients with lymphocytic hypophysitis. *Horm Res* (2001); 55(6): 288 - 292 (PMID: [11805433](#)).
- 62 Tanaka S, Tatsumi KI, Kimura M, Takano T, Murakami Y, Takao T, Hashimoto K, Kato Y, Amino N: Detection of autoantibodies against the pituitary-specific proteins in patients with lymphocytic hypophysitis. *Eur J Endocrinol* (2002); 147(6): 767 - 775 (PMID: [12457452](#)).
- 63 Tanaka S, Tatsumi KI, Takano T, Murakami Y, Takao T, Yamakita N, Tahara S, Teramoto A, Hashimoto K, Kato Y, Amino N: Anti-alpha-enolase antibodies in pituitary disease. *Endocr J* (2003 **a**); 50(6): 697 - 702 (PMID: [14709840](#)).
- 64 Tanaka S, Tatsumi K, Tomita T, Kimura M, Takano T, Yoshikawa H, Amino N: Novel autoantibodies to pituitary gland specific factor 1a in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* (2003 **b**); 42(2): 353 - 356 (PMID: [12595635](#)).
- 65 Theill LE & Karin M: Transcriptional control of GH expression and anterior pituitary development. *Endocr Rev* (1993); 14(6): 670 - 689 (PMID: [8119232](#)).
- 66 Yamamoto M, Iguchi G, Takeno R, Okimura Y, Sano T, Takahashi M, Nishizawa H, Handayani-shi 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](#)).
- 67 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](#)).

- 68 Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG: Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev* (2007 a); 87(3): 933 - 963 (PMID: [17615393](#)).
- 69 Zhu X, Wang J, Ju BG, Rosenfeld MG: Signaling and epigenetic regulation of pituitary development. *Curr Opin Cell Biol* (2007b); 19(6): 605 - 611 (PMID: [17988851](#)) Zhu X, Wang J, Ju BG, Rosenfeld MG: Signaling and epigenetic regulation of pituitary development. *Curr Opin Cell Biol* (2007); 19(6): 605 - 611 (PMID: [17988851](#)).