

Aus dem
IHF Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung
an der Universität Hamburg
Grandweg 64, 22529 Hamburg
Direktor: Prof. Dr. F.A. Leidenberger

Genomische Struktur des menschlichen „Growth Hormone Secretagogues“- Rezeptor

Dissertation

zur Erlangung eines Doktorgrades
der Medizin
am Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Martina Penshorn
Aus Rotenburg / Wümme

Juni 2001

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: *13. Mai 2002*

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Medizin der Universität Hamburg

Dekan:
Sprecher: *Prof. Dr. C. Wagner*

Referent: *Prof. Dr. H. N. Schulte*

Koreferent: *Prof. Dr. G.-W. Braendle*

Inhaltsverzeichnis

LEGENDE	3
1. EINLEITUNG	4
2. MATERIALIEN	7
2.1. VORGEGEBENE VEKTOREN.....	7
2.2. PRIMER.....	7
2.3. ZELLEN.....	9
2.4. CHEMIKALIEN UND PUFFER.....	9
2.5. ZUSAMMENSETZUNG ERSTELLTER LÖSUNGEN.....	10
2.6. ENZYME.....	11
2.7. KITS.....	11
2.8. GERÄTE.....	12
2.9. SONSTIGE MATERIALIEN.....	13
3. METHODIK	14
3.0. KLONIERUNG EINER SPEZIFISCHEN DNS-SONDE.....	14
3.1. PCR-PHAGEN-SCREENING EINER GENOMISCHEN GENBANK (λFIX II, STRATAGENE).....	16
3.2. SCREENING DER POSITIVEN PHAGENPROBEN.....	17
3.3. GEWINNUNG DER PHAGEN-DNS.....	20
3.3.1. ANZUCHT DER POSITIVEN EINZELKLONE.....	20
3.4. VERDAU DER GEWONNENEN PHAGEN-DNS MITTELS VERSCHIEDENER RESTRIKTIONSENZYME.....	21
3.5. SOUTHERN-BLOT.....	22
3.6. KLONIERUNG UND GEWINNUNG DER DNS.....	22
3.7. SEQUENZIERUNG DER PROMOTORREGION.....	25
3.8. HERSTELLUNG VON PROMOTERKONSTRUKTE MITTELS PCR.....	26
3.9. TRANSFEKTION.....	29
4. ERGEBNISSE	32
4.0. KLONIERUNG EINES SPEZIFISCHEN GHS-R-DNS-FRAGMENTS ZUR SONDENHERSTELLUNG UND ALS POSITIVKONTROLLE.....	32
4.1. ISOLATION EINES GHS-R-POSITIVEN GENOMISCHEN KLONS.....	32
4.2. CHARAKTERISIERUNG DES GENOMISCHEN KLONS.....	36
4.3. UNTERSUCHUNG DER PROMOTORAKTIVITÄT IM ZELLSYSTEM.....	40
5. DISKUSSION	43
5.1. CHARAKTERISIERUNG DES GHS-REZEPTORGENS UND -PROMOTORS.....	43
5.2. HORMONELLE REGULATION.....	45
5.3. KLINISCHE RELEVANZ UND MÖGLICHKEITEN DER GHS-REZEPTORS.....	48
6. ZUSAMMENFASSUNG	50
7. LITERATURVERZEICHNIS	51
LEBENS LAUF	56
DANKSAGUNG	57

Legende

ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
DIG	Digoxigenin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Etylendiamintetraazetat
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GH	Growth Hormone
GHS	Growth Hormone Secretagogues
GHS-R	Growth Hormone Secretagogues Receptor
GHRH	Growth Hormone Releasing Hormone
IGF	Insulin like Growth Factor
Kb	Kilobase
LH	Luteinisierungshormon oder Gonadotropin
LHRH	Gonadotropine Releasing Hormone
M	Molar
mM	10^{-3} Molar
PBS	Phosphat-gepufferte Salinelösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
TPA	12-O-Tetraphorbol-12-Myristat-13-Acetat

1. Einleitung

Neben seiner wichtigen Funktion im Rahmen des Körperwachstums ist das Wachstumshormon (Growth Hormone, GH) an einer Vielzahl anderer Prozesse, wie z.B. Lipolyse und Proteinsynthese, beteiligt. Seine anabolen Effekte werden auf zwei unterschiedlichen Wegen vermittelt: Einerseits durch eine direkte Bindung an spezifische Wachstumshormon-Rezeptoren, andererseits durch Stimulation des Insulin-like-Growth-Factor (IGF). Das Wachstumshormon wird von den somatotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens sezerniert. Entsprechend der klassischen Vorstellung wird seine pulsative Ausschüttung von zwei hypothalamischen Hormonen reguliert: Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) stimuliert, Somatostatin inhibiert die GH-Sekretion.

Kürzlich konnte die Bedeutung eines weiteren Rezeptorsystems nachgewiesen werden, das durch die sogenannten „Growth-Hormone-Secretagogues“ (GHS) stimuliert wird. Anfang der 80er Jahre gelang es, synthetische Hexapeptide in Ableitung vom Met-Enkephalin zu entwickeln, die wirkungsvoll die pulsative Ausschüttung von Wachstumshormon durch die Hypophyse anregen konnten (Bowers et al., 1984). Es wurde deutlich, daß diese „GH-Secretagogues“ ihre Wirkung unabhängig vom GHRH entfalten.

Am Beispiel des MK-0677 (Howard et al., 1996) konnte gezeigt werden, daß die GHS über die Interaktion mit einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor wirken, welcher mit einem GTP-bindenden Protein das entsprechende Second-messenger-System aktiviert. Hierbei wird Phospholipase C angeregt, Inositol-Triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) bereitzustellen. Der Anstieg des IP3 bewirkt wiederum eine Umverteilung von interzellulären Kalzium-Depots und eine Aktivierung der Proteinkinase C.

Durch Aktivierung von Kalziumkanälen mit Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und der Blockierung von Kaliumkanälen wird die Ausschüttung von Wachstumshormonen stimuliert.

Es gibt zudem Hinweise auf eine Wirkung der GHS auch auf hypothalamischer Ebene (Codd et al., 1989), welche unabhängig von der GHRH-Ausschüttung ist.

Verschiedene synthetische GHS wurden entwickelt, die alle ihre Wirkung über den gleichen Rezeptor und durch die gleichen hypothalamischen-hypophysären endokrinen und molekularen Mechanismen entfalten. 1996 konnte der GHS-Rezeptor (GHS-R) kloniert werden, wobei sich bestätigte, daß es sich um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor handelt. Das Gen mit hoher Homologie konnte bei Mensch, Schimpanse, Rind, Schwein, Ratte und Maus identifiziert werden. Es wurden zwei Splicing-Varianten der cDNA-Sequenz des Rezeptors beschrieben: GHS-R Ia und die kürzere Variante GHS-R Ib. Subtyp GHS-R Ia besteht aus 366 Aminosäuren und weist die typischen sieben Transmembrandomänen der Rezeptorfamilie auf. Subtyp GHS-R Ib besteht aus 289 Aminosäuren und hat nur fünf membrandurchspannende Helices. (Howard et al., 1996). Nachgewiesen wurde der Rezeptor nicht nur in der Hypophyse, sondern auch in Hypothalamus und Hippocampus.

GH-Secretagogues bieten interessante Möglichkeiten zum Einsatz in der Klinik. Zur Zeit wird ihre Bedeutung sowohl in der Diagnostik von Erkrankungen mit Wachstumshormonmangel und -überschuß überprüft, als auch ihr Einsatz in der Therapie von Erkrankungen mit GH-Mangel. Hierzu gehören nicht nur die klassischen endokrinen Erkrankungen mit einem hypophysärem Wachstumshormonmangel. Auch bei verschiedenen anderen Krankheitsbildern wie HIV oder katabolen Zuständen wird eine Wachstumshormontherapie diskutiert.

Das Wachstumshormon ist ein relativ großes Peptid (191 Aminosäuren, MW 215000) mit schlechter oraler Bioverfügbarkeit, so daß es subkutan zugeführt werden muß. GH-Secretagogues bieten hingegen auch die Möglichkeit der oralen Applikation.

Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war, mit Hilfe molekularbiologischer Arbeitsweisen die genomische Struktur der beiden GHS-Rezeptor-Subtypen genauer zu charakterisieren und die Promotorregion zu identifizieren. So sollte ein Beitrag zum besseren Verständnis der komplexen Regulationsmechanismen in der Hypophyse geleistet werden.

Schrittweise erreichte Ziele waren:

1. Isolation eines Phagenklones aus einer menschlichen genomischen Plazenta-Genbank (λ FIX II, Stratagene) mit Hilfe molekularbiologischer Arbeitsmethoden, der die gesamten kodierenden Nukleotidsequenzen der beiden Rezeptor-Subtypen enthielt.
2. Untersuchung der genomischen Struktur beider GHS-Rezeptor-Subtypen durch Klonierung und Sequenzierung.
3. Charakterisierung der Promotorregion, d.h. Untersuchung auf regulative Elemente und Vergleiche untereinander.
4. Herstellung von Promotorkonstrukten und ihre Transfektion in menschliche Zellen.

GP-P26

5`-cactgcactccagcctgggac-3`

2.2.3. Primer im Bereich der cDNA

GP-S11	5`-ggtgctctggactgctcacg-3`
GP-S13	5`-aggaccagaaccacaagcaaacc-3`
GP-S14	5`-tggacatgatggtgtacagaatgg-3`
GP-S17	5`-tgaaagatgaaagttctcgggcct-3`
GP-S18	5`-aaagtgaggactgacttcctgc-3`
GP-S19	5`-atctaaaaagcgttcaagcgg-3`
GP-S20	5`-aaatatggttacagcccagc-3`
GP-S21	5`-cttaatggcatattttaaggcttc-3`
GP-S22	5`-cttccttgacaatttgaagggg-3`
GP-S23	5`-caaatcctttgagcctggctcc-3`
GP-S24	5`-ccattctgtacaacatcatgtcc-3`
GP-S25	5`-catgaggcacgtgagcaatcag-3`
GP-S26	5`-ctgattgctcacgtgcctcatg-3`

2.2.4. Primer zur Herstellung der Promotorkonstrukte

Antisenseprimer: GP-P16	5`-ctcagctgaacaggctctgggac-3`
Senseprimer: GP-P9	5`-ccaagtcgagttggtcaagctcg-3`
GP-P14	5`-ggttgaagaccttgcccaagg-3`
GP-P17	5`-cttctgcctctcacctccctctc-3`
GP-P18	5`-ccggaggatgtggtgggagaaac-3`
GP-P19	5`-gcttcggagagagcgcctcac-3`
GP-P20	5`-accccgccaccaggttgcac-3`
GP-P22	5`-ggtagtagaggtggtacaaact-3`
T7	5`-taatacgactcactataggg-3`
GL	5`-ctttatgttttggcgcca-3`
RV	5`-ctagcaaaataggctgtccc-3`

2.3. Zellen

2.3.1. Bakterielle Zellen

DH 5 alpha Kompetente Zellen	Life Technologies; Paisley, U.K.
OneShot-kompetente Zellen	Invitrogen; San Diego, CA., U.S.A.
XL1-P2-Blue E.coli	Stratagene; Heidelberg

2.3.2. Eukaryontische Zelllinien

GH 4 (Rattenhypophysenzellen)	AG Melmed, CSMC; L.A., U.S.A.
-------------------------------	-------------------------------

2.4. Chemikalien und Puffer

-Agarose	Life Technologies; Paisley, U.K.
-Ampicillin	Sigma; St.Louis, Mo, U.S.A.
-Bromphenolblau	Serva; Heidelberg
-Borsäure	Merk; Darmstadt
-Chloroform	Merk; Darmstadt
-Ethanol absolut z.A.	Merk;Darmstadt
-Ethidiumbromid	Life Technologies; Gaithersburg, U.S.
-Formamid	Merk; Darmstadt
-Glycerol	Life Technologies; Paisley, U.K.
-Kanamycin	Sigma; St.Louis, MO, U.S.A.
-IPTG (Isopropylthio- β -D-Galactoside)	Life Technologies; Paisley, U.K.
-LB-Agar	Life Technologies; Paisley, U.K.
-Maleinsäure	Merk-Schuchardt; Hohenbrunn
-Natriumacetat, wasserfrei	Merk; Darmstadt
-Natriumchlorid	Merk; Darmstadt
-Natriumcitrat	Merk; Darmstadt
-Natriumhydroxid Pellets	Merk; Darmstadt
-Natronlauge, 2N	Merk; Darmstadt

-N-Laurylsarcosine	Sigma; St.Louis, Mo, U.S.A.
-Phenol	Merk; Darmstadt
-Salzsäure, 2N	Merk; Darmstadt
-SDS (Dodecylschwefelsäure)	Sigma; St.Louis, Mo, U.S.A.
-SSC (Saline-sodium citrate)	Sigma; St.Louis, Mo, U.S.A.
-Tris	Biomedicals;
-Tween 20 Reagent	Merck-Schuchardt; München

2.5. Zusammensetzung erstellter Lösungen

-Äquibrierungslösung	0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, pH 9.5
-Blockierungslösung	0.1M Maleinsäure, 0.15M NaCl, 1% Blockierungsreagenz (w/v), pH 7.5
-CPD-Star-Lösung	25mM CPD-Star in Äquibrierungslösung
-Denaturierungslösung	1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH
-Detektionslösung 3	12,11g TrisHCl, 5,84g NaCl, 10,17g MgCl ₂ / l ddH ₂ O
-Hybridisierungslösung	DIG-Sonde in Prähybridisierungslösung
-Maleinsäurelösung	0.1 M Maleinsäure, 0.15 NaCl, pH 7,5
-Neutralisierungslösung	1.5 M NaCl, 0.5 M TrisHCl pH 8,0
-NZY-Medium	5g NaCl, 5g Hefe, 2g MgSO ₄ x 7H ₂ O, 10g Caseinhydrolysat per Liter ddH ₂ O
-Prähybridisierungslösung	50% Formamid, 5xSSC, 50mmol/l NaPO ₄ pH 7.2, 2% Blockierungsreagenz (w/v), 7% SDS (w/v), 0.1% N-Laurylsarkosin
-SM-Puffer	5,8g NaCl, 2g MgSO ₄ x 7H ₂ O, 50ml 1M Tris-HCl pH 7,5, 5ml 2% Gelantin / l ddH ₂ O
-Spüllösung	0.2 M Tris pH 7,5, 2x SSC

-TE-Puffer	10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA
-Waschlösung	0.1M Maleinsäure, 0.15M NaCl, 0.3% Tween 20, pH7.5

2.6. Enzyme

-Bam H I	Life Technologies; Paisley, U.K.
-Eco RI	Life Technologies; Paisley, U.K.
-Kpn I	Life Technologies; Paisley, U.K.
-Not I	Life Technologies; Paisley, U.K.
-Pst I	Life Technologies; Paisley, U.K.
-Sal I	Life Technologies; Paisley, U.K.
-Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	USB; Cleveland, Ohio, U.S.A.
-Sma I	Life Technologies; Paisley, U.K.
-Sst I	Life Technologies; Paisley, U.K.
-T4-DNA-Ligase	Invitrogen; San Diego, Ca, U.S.A.
-Xho I	Life Technologies; Paisley, U.K.

2.7. Kits

-ABI Prism Dye Terminator Ready Reaction Kit	Perkin Elmer
-DIG-DNA-Labeling-Kit	Boehringer Mannheim; Mannheim
-DNA-Gel-Extraction-Kit	QIAGEN; Hilden
-Luciferase-Assay-System	Boehringer Mannheim; Mannheim
1. Luciferase-Assay-Reagenz	
2. Lysierungspuffer	
-Miniprep-High-Pure-Plasmid-Isolation-Kit	Boehringer Mannheim, Mannheim
1. Lysispuffer	
2. Neutralisationspuffer	

3. Resuspensionspuffer	
-PCR-Core-Kit	Boehringer Mannheim; Mannheim
1. Taq-DNA-Polymerase	
2. dNTP-Stammlösung	
3. PCR-Reaktionspuffer mit MgCl ₂ , 10x	
-Plasmid-Maxi-Kit	Promega; Madison, WI, U.S.A.
1. Äquilibrierungslösung	
2. Eluierungspuffer	
3. Lysispuffer	
4. Neutralisierungspuffer	
5. Resuspensionspuffer	
6. Waschpuffer	
-Profection-Mammalian-Transfection- System (Calcium Phosphat)	Promega; Madison, WI, U.S.A.
1. HEBES, 2x	
2. CaCl ₂ , 2M	
-TA-Cloning-Kit	Invitrogen; San Diego, CA, U.S.A.

2.8. Geräte

-Coulter Cell Counter	Coulter Electronics Lim.; U.K.
-Gelkammer	MWG-Biotech; Ebersberg
-Hybridiser HB-ID	Techne; Princeton, NJ, U.S.A.
-Luminometer Lumat LB 9501/16	Berthold; Bad Wildbad
-Mikroskop Olympus CK2	Olympus ; München
-pH-Meter CG 820	Schott Geräte;
-Photometer Ultrospec 3000	Biotech;

-Röntgenfilmentwickler	Kodak; Rochester, N.Y., U.S.A.
-Thermomixer 5436	Eppendorf; Hamburg
-UV-Crosslinker	Stratagene; Heidelberg
-UV-Gel-Kamera	Stratagene; Heidelberg
-Vortex REAX 2000	Heidolph; Kehlheim
-Zentrifugen: Laborfuge M	Heraeus
UNIVAPO 100H	Uniquip
Zentrifuge 5415C	Eppendorf; Hamburg
Zentrifuge GS-15R	Beckmann
Zentrifuge J2-21	Beckmann

2.9. Sonstige Materialien

-Cell Scraper	Costar Corp.; Cambridge, Ma, U.S.
-CO ₂ Inkubator	
-DNA Ladder, 1kB und 100 bp	Life Technologies; Paisley, U.K.
-Filterpapiere, 3mm Chr	Whatman, Kent, U.K.
-Gewebekulturflaschen, TC 650ml	Greiner GmbH; Frickenhausen
-Kulturplatten	Greiner GmbH; Frickenhausen
-Mikroskop Olympus CK2	Olympus
-Nylon Membran	Boehringer Mannheim; Mannheim
-Nylon Rundfilter	Amersham
-Röntgenfilme	Kodak; Rochester, N.Y., U.S.A.
-Sterilbench	Heraeus Instruments

3. Methodik

3.0. Klonierung einer spezifischen DNS-Sonde

3.0.1. PCR mit genomischer DNS und den spezifischen Primern GHS 1U und 1L

10x PCR-Puffer mit MgCl ₂	10 µl
dNTP-Mix (10mM)	2 µl
Primer GHS 1U (25pmol/µl)	1 µl
Primer GHS 1L (25pmol/µl)	1 µl
Genom. DNS (30 ng/µl)	2 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
steriles Wasser	<u>83,5 µl</u>
	100 µl

PCR-Bedingungen:	95°C	5 min	
	62°C	1 min	
	72°C	1 min	35 Zyklen
	95°C	1 min	
	72°C	10 min	

3.0.2. Auswertung der PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auswertung wurde die für ein 1% Gel errechnete Menge an Agarose in 100ml 0,5xTBE aufgekocht und nach der Zugabe von 3 µl Ethidiumbromid zum Erkalten in eine entsprechende Gelkammer gegossen. Die Gelkammer wurde mit 0,5xTBE als Laufpuffer gefüllt. Die Taschen des Agarosegels wurden mit je 10 µl der PCR-Produkte, gemischt mit je 1 µl Ladepuffer (10x), gefüllt. Als Referenz wurde ein 1kb-DNS-Ladder verwendet. Anschließend wurde die Gelelektrophorese gestartet und lief zwei Stunden bei 50 Volt. Nach dem Lauf wurde das Gel zur Dokumentation auf einem UV-Tisch mit Videokamera fotografiert.

3.0.3. Ligation des PCR-Produktes in den pCRII-Vektor

Im 10µl-Ligationsansatz waren enthalten:

Steriles Wasser	3 µl
PCR-Produkt (100 ng DNS)	3 µl
pCRII-Vektor (25 ng/µl)	2 µl
10x Ligationspuffer	1 µl
T4-DNA-Ligase (0,1 U/µl)	1 µl

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 14°C im Wasserbad inkubiert.

Zur folgenden Transformation in kompetente Zellen wurden 3 µl des Ligationsansatzes zu 50 µl One-Shot kompetenten Zellen gegeben. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte für 30 sec ein Hitzeschock bei 42°C und eine weitere Inkubation für 2 min auf Eis. Es wurden 200 µl warmes LB-Medium zugefügt, und die Suspension bei 37°C eine Stunde im Schüttler inkubiert. Je 120 µl des Transformationsansatzes wurden zusammen mit 50 µl IPTG und 50 µl X-Gal auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen, und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.0.4. Bakterienanzucht und Minipräparation

Am folgenden Tag wurden einige der Bakterienkolonien, die das Insert aufgenommen hatten (weiße Kolonien), in 5 ml LB-Ampicillin-Medium überführt und bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator angezchtet. Am nächsten Tag erfolgte die Minipräparation der Flüssigkulturen mit dem High-Pure-Plasmid-Isolation-Kit von Boehringer Mannheim. Dazu wurde nach Abzentrifugieren von 2,5 ml der Bakteriensuspension der Zellniederschlag in 250 µl Suspensionspuffer aufgenommennommen und vollständig gelöst. Es wurden 250 µl Lysepuffer zugegeben, vorsichtig invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der nun viskös-klaren Lösung 350 µl eisgekühlter Bindepuffer hinzugefügt, und 5 min auf Eis gestellt. Die trüb-weiße, flockige Lösung wurde 10 min bei 14000 xg zentrifugiert.

Der Überstand wurde in eine Filter-Säule pipettiert, 30 sec bei 14000 xg zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und 700 µl Waschpuffer zugegeben. Es wurde ca. 1,5 min bei 1400 xg zentrifugiert, um alle Reste des Waschpuffers zu entfernen. Dann wurde der Filter in ein sauberes Reaktionsgefäß eingesetzt, 80 µl Wasser auf den Filter gegeben, eine Minute

inkubiert und 30 sec bei 14000 xg zentrifugiert. Das Eluat enthielt die Plasmid-DNS, deren Konzentration photometrisch bestimmt wurde.

3.1. PCR-Phagen-Screening einer genomischen Genbank (λ FIX II, Stratagene)

3.1.1. PCR des Phagenpools mit den Primern GHS 1u und I

Ansetzen der PCR mit den Phagenpools A bis H und 1 bis 12, sowie einer Negativkontrolle mit ddH₂O und einer Positivkontrolle mit dem zuvor klonierten GHS-Plasmid.

10x PCR-Puffer mit MgCl ₂	5	μ l
dNTP-Mix (10mM)	1	μ l
Primer GHS 1U (25pmol/ μ l)	1	μ l
Primer GHS 1L (25pmol/ μ l)	1	μ l
jeweiliger Phagenpool(10 ³ pfu/ μ l)	4	μ l
Pfu-Polymerase	0,5	μ l
dd H ₂ O	<u>37,5</u>	<u>μl</u>
	50	μ l
PCR-Bedingungen:	95°C	5 min
	62°C	1 min
	72°C	1 min
	95°C	1 min
	72°C	10min
		35 Zyklen

3.1.2. Auswertung der PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese erfolgte wie unter 3.0.2. beschrieben.

Nach der Auswertung wurde eine zweite PCR-Überprüfung der als positiv erkannten Phagenproben vorgenommen. Das Pipettierschema entsprach dem oben beschriebenen, auch das PCR-Programm wurde beibehalten. Es wurden allerdings nur 1,5 μ l der jeweiligen einzelnen Phagenproben (10⁵pfu/ μ l) für die PCR eingesetzt. Die Auswertung der PCR erfolgte erneut in einem Agarose-Gel. Die positiven

Phagenproben wurden auf 1000 pfu pro 1µl in SM-Puffer verdünnt und für das weitere Vorgehen bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.2. Screening der positiven Phagenproben

3.2.1. Bakterienanzucht, Phagenausplattierung

Für das Screening der menschlichen genomischen DNS-Bank wurden auf einer LB-Agar-Platte XL1-P2-Blue-Bakterien ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Von einer der gewachsenen Kolonien wurde in 100ml LB-Medium mit 1ml 20%iger Maltose und 1ml 1M MgSO₄ eine Übernachtskultur bei 37°C im Schüttler angesetzt.

Am nächsten Tag wurde die Bakteriendichte gemessen, und mit 10mM MgSO₄ auf eine optische Dichte von 0,5 bei einer Wellenlänge von 600 nm eingestellt.

Zu 600 µl Bakteriensuspension wurden je 30 µl der PCR-positiven Phagensuspension gegeben und für 15min bei 37°C im Schüttler inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die 630 µl zusammen mit ca. 8ml NZY-Top-Agar auf großen NZY-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die bewachsenen Platten für ca. 4 Stunden im Kühlschrank gelagert, bevor mit ihnen weitergearbeitet werden konnte.

3.2.2. Abklatsch, UV-Crosslinking

Der Abklatsch von den bei 4°C gekühlten Platten erfolgte mit Hilfe von Nylon-Rundfiltern, die beim ersten Abklatsch 2min, beim zweiten 5min auf den Platten zu liegen kamen. Mit einer sterilen Kanüle wurden sowohl die Platten als auch die Membranen durch je eins, zwei und drei Löcher markiert. Nach den zwei bzw. fünf Minuten wurden die Membranen, an denen nun die Phagen-DNS haftete, zunächst zwei Minuten in der Denaturierungslösung, anschließend fünf Minuten in der Neutralisierungslösung und letztlich dreißig Sekunden in der Spüllösung eingetaucht. Dann wurden die Membranen kurz auf Whatman-Papier getrocknet und mit UV-Licht

nach dem „Auto-Crosslink“- Programm des UV-Stratalinkers bestrahlt, um die DNS kovalent an die Nylonmembranen zu binden.

3.2.3. Probenherstellung, Prähybridisierung und Hybridisierung

Die mit DIG-11-dUTP markierte Sonde für die nicht radioaktive Detektion mit dem DIG-Labeling System von Boehringer Mannheim wurde mittels PCR und den unter 3.1. genannten Primern hergestellt. Als Template diente das in 3.0.1. hergestellte Plasmid, für die PCR wurde das gleiche Programm wie für das PCR-Screening angewendet.

Plasmid-DNS	30 ng
Primer GHS 1U	100 ng
Primer GHS 1L	100 ng
10x Puffer	5 µl
Magnesium-Chlorid	1,5 mM
Taq-Polymerase	5 µl
dNTP- Mix (10 mM)	5 µl
DIG-11-dUT	<u>5 µl</u> 50 µl

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines Agarosegels auf den DIG-11-dUTP-Einbau überprüft. Je 20 µl der gelabelten PCR-Produkte wurden zu 20 ml Prähybridisierungs-lösung gegeben. Die so gefertigten Sondenlösungen wurden bei -20°C im Gefrier-schrank gelagert, und konnten mehrere Male zur Hybridisierung verwendet werden. Für die Prähybridisierung wurden der Hybridisierungssofen und die Prähybridisierungs-lösung auf 42°C vorgeheizt, die Filter kurz mit 2xSSC angefeuchtet, anschließend luftblasenfrei in Hybridisierungsröhren gegeben, dann 20 ml der Prähybridisierungs-lösung hinzugegeben und für mindestens eine Stunde im Hybridisierungssofen inkubiert. Vor dem Gebrauch wurde die Hybridisierungslösung ca. 10 Minuten bei 100°C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und nach Abgießen der

Prähybridisierungslösung in die Röhren gegeben. Die Hybridisierung wurde über ca. 14 Stunden durchgeführt; am nächsten Tag schloß sich die Detektion an.

3.2.4. Detektion, Filmexposition

Nach Entfernen der Hybridisierungslösung wurden die Filter/Membranen im ersten Waschschrift 2x 5min bei Raumtemperatur mit ca. 100 ml 2xSSC, 0,1% SDS und im zweiten Schritt 2x 15min bei 68°C mit ca. 100 ml 0,1xSSC, 0,1% SDS gewaschen, in 100 ml Detektionswaschlösung (Maleinsäurelösung mit 0,3% Tween 20) 5 min inkubiert und in 100 ml Maleinsäurelösung 30 min äquibriert. Diese Lösung wurde durch 50 ml Maleinsäurelösung mit 5 µl Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat ersetzt und für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Membranen 2x 15 min in je 100 ml Waschlösung gewaschen, dann für 2 min in 40 ml Detektionslösung 3 äquibriert, und letztlich 5 min in 40 ml Detektionslösung 3 mit 400 µl CDP-Star-Lösung inkubiert. Nach sorgfältiger Entfernung der zuletzt benutzten Flüssigkeit wurden die Membranen in Klarsichtfolie eingeschweißt und für 5 min bis zu mehreren Stunden mit der DNS-Seite auf Röntgenfilm gelegt. Nach der Filmentwicklung wurden der erste und der zweite Abklatsch unter Zuhilfenahme eines Röntgenschirmes auf doppelt-positive Signale hin überprüft.

3.2.5. Picken der positiven Phagenklone, Kontrolle mittels PCR

Mittels einer umgedrehten sterilen Pipettenspitze wurden die als doppelt-positiv erkannten Plaques mitsamt den Agarblöcken herausgestanzt, und in 1ml SM-Puffer mit 20 µl Chloroform überführt. Dieses Gemisch wurde über Nacht bei 4°C gelagert, um den Phagen die Möglichkeit zur Diffusion aus dem Agarblock in den Puffer zu geben. Für die Überprüfung der isolierten Phagenklone mit der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden von der „Phagenlösung“ je 30 µl zu einem 100 µl PCR-Ansatz mit den entsprechenden oben genannten Upstream- und Downstream-Primern gegeben. Das PCR-Programm wurde nicht geändert. Die Auswertung erfolgte über eine Agarose-Gelelektrophorese. Weitergearbeitet wurde nur mit positiven Klonen, die auch in der PCR als solche

bestätigt wurden. Nach weiterer Verdünnung wurde ein zweites Phagenscreening durchgeführt (5 µl der Phagenlösung in 600 µl Bakteriensuspension). Die Isolation der einzelnen Phagenklone nach erfolgreicher Detektion erfolgte in 200 µl SM-Puffer mit 4 µl Chloroform, eine erneute Bestätigungs-PCR schloss sich an.

3.3. Gewinnung der Phagen-DNS

3.3.1. Anzucht der positiven Einzelklone

Für die Anzucht der positiven Einzelklone wurden in einer Übernachtskultur bei 30°C XL1-P2-Blue-Bakterien in 100 ml LB-Medium, welches 1ml 20%iger Maltose und 1ml 1M Magnesiumsulfat enthielt, im Schüttler angesetzt, und am folgenden Tag mit SM-Puffer auf eine optische Dichte von 0,5 bei OD600 eingestellt. Daraufhin erfolgte für 15 Minuten die Inkubation von 100 µl der einzeln gepickten Phagen in 100 µl Bakteriensuspension mit 50 µl 10mM Magnesiumsulfat und 50 µl 10mM Calciumchlorid bei 37°C. Dieses Inkubationsgemisch wurde zu 100 ml NZY-Medium gegeben, und bei 37°C bis zur Lyse geschüttelt.

3.3.2. Phagen-DNS-Extraktion

Das Bakterienlysat wurde mit je 1 ml Chloroform versetzt, für 15 min bei 37°C im Inkubator geschüttelt, und bei 4°C für 20 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Nun folgte die DNS-Extraktion mit dem Qiagen-Lambda-Kit. Zu dem Überstand wurden 200 µl Puffer L1 gegeben, und anschließend bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Nach 30 min wurden 20 ml des eiskalten Puffers L2 hinzugegeben und für 60 min auf Eis inkubiert.

Nach 10minütiger Zentrifugation bei >10000 xg wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 6 ml Puffer L3 gelöst, 6ml Puffer L4 hinzugegeben, gemischt und für 20 min bei 70°C in einem Wasserbad geschüttelt. Nach Zugabe von 6 ml Puffer L5 und sorgfältiger Durchmischung, sowie 30minütiger Zentrifugation bei >15000 xg und 4°C wurde der Überstand unverzüglich in einen neuen Zentrifugenbecher überführt und erneut unter gleichen Bedingungen für 10 min zentrifugiert. Zur Filtration wurden die Qiagen-500-Tips mit 6 ml QBT-Puffer äquilibriert, der klare Überstand hineingegeben und

anschließend mit 20 ml Puffer QC gewaschen. Im folgenden Schritt wurde die DNS mit 8 ml Puffer QF in 15ml-Sarstedt-Röhrchen eluiert, mit 6 ml Isopropanol versetzt und für 30 min bei 4°C und 4800 rpm in einer Beckmann-Kühlzentrifuge präzipitiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, und nach Absaugen des Alkohols und Lufttrocknung in ca. 100 µl ddH₂O über Nacht im Kühlschrank gelöst. Die Bestimmung des DNS-Gehaltes erfolgte am nächsten Tag mit einem Photometer bei 260 nm.

3.4. Verdau der gewonnenen Phagen-DNS mittels verschiedener Restriktionsenzyme

3.4.1. Restriktionsverdau

Der Verdau der gewonnenen Phagen-DNS erfolgte in einem 20µl-Ansatz mit folgenden Restriktionsenzymen:

Bam H I

Eco RI

Kpn I

Not I

Pst I

Sal I

Sma I

Sst I

Eco RI und Not I

Dabei wurden pro Ansatz je 1 µl (5-10 U/µl) der Restriktionsenzyme, je 2 µl des entsprechenden 10xPuffers und je 1 µg DNS verwendet, sowie mit Wasser auf 20 µl Volumen gebracht. Der Verdau wurde im Wärmeschrank für zwei Stunden bei 37°C durchgeführt. Für die anschließende Gelelektrophorese wurde ein 0,6% Agarosegel gegossen, auf welches der gesamte Ansatz mit 2 µl Ladepuffer aufgetragen wurde.

Die Gelelektrophorese lief über Nacht bei 30 Volt.

3.5. Southern-Blot

Für den Southern-Blot wurde das 0,6% Gel 45 min lang mit einer 1,5M NaCl, 0,5M NaOH-Lösung denaturiert, kurz in ddH₂O gewaschen, 30 min in einer 1,5M NaCl/1M TRIS-Lösung (pH 7,5) neutralisiert, die Lösung gewechselt und erneut 15 min neutralisiert, kurz in 20xSSC äquilibriert und auf einem zuvor bereitgestelltem Aufbau über Nacht geblottet.

Der Aufbau bestand aus einer mit 20xSSC gefüllten Schale, über die eine Glasplatte gelegt worden war. Darauf lag ein Streifen Whatman-Papier (3 mm dick), der die Breite des Geles hatte und mit beiden Enden in den Puffer hineinreichte. Hierauf wurde das Gel gelegt und mit einer Nylonmembran bedeckt, die genau auf die Größe des Geles zurechtgeschnitten worden war. Auf dieser lagen vier Streifen mit ddH₂O angefeuchtetes Whatman-Papier in Gelgröße, eine Schicht Cellulose-Tücher von ca. acht Zentimetern Dicke, und letztendlich eine Glasplatte, die mit einem Gewicht beschwert wurde. Für die Auswertung wurde die DNS mittels UV-Crosslinking kovalent an die Membran gebunden, und mit der spezifischen GHS-R-Probe prähybridisiert und hybridisiert, wie unter 3.2. beschrieben. Ebenso erfolgte die Detektion. Die Signale wurden auf Röntgenfilm identifiziert.

3.6. Klonierung und Gewinnung der DNS

3.6.1. Verdau der Phagen-DNS mit einem ausgewählten Restriktionsenzym

Der Verdau wurde nach obigem Schema durchgeführt, und das Gesamtvolumen auf ein 0,7% Agarose-Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte so lange, bis sich die Fragmentbanden eindeutig voneinander trennten und aus dem Gel ausschneiden ließen.

3.6.2. Gel-Extraktion

Die Gel-Extraktion wurde mit dem Qiaex-DNA-Gel-Extraction-Kit durchgeführt. Dazu wurden zur jeweiligen ausgeschnittenen Gelbande in ein Eppendorf-Tube das dreifache Volumen QX1-Puffer, sowie 30 µl der QIAEX II-Suspension gegeben. Dieses Gemisch

wurde für 10 min bei 50°C inkubiert und alle 2 min gevortext. Das Tube wurde 30 sec bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Das Pellet wurde zweimal mit 500 µl PE-Puffer gewaschen. Nach Trocknung des Pellets wurde es in 20 µl ddH₂O resuspendiert und für 5 min bei 50°C inkubiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 13000 rpm für 30 sec. Der Überstand enthielt nun die aufgereinigte DNS und wurde vorsichtig in ein sauberes Tube pipettiert.

3.6.3. Ligation und Transformation in kompetente Zellen

Für die Ligation in kompetente Zellen wurden der SKII-Vektor mit dem gewählten Restriktionsenzym verdaut, anschließend wurde der Vektor dephosphoriliert. Dazu wurde ein 20µl-Verdau mit dem SKII-Vektor und dem Enzym angesetzt und für eine Stunde bei 37°C belassen. Zu dem 20µl-Restriktionsansatz wurden 0,5 µl SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase), 8 µl des entsprechenden Puffers und 71,5 µl Wasser gegeben, und dieser 100µl-Ansatz für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Reaktionsansatz 20 min bei 65°C denaturiert. Im Anschluß erfolgte die Fällung mit Ammoniumacetat.

Ein Volumen 5M Ammoniumacetat wurde zu dem Gemisch gegeben, anschließend vier Volumen kaltes 100% Ethanol, worauf es 30 min bei 18°C und 14000 rpm zentrifugiert wurde. Nach Dekantieren des Überstandes wurden 1,5 Volumen kaltes 70% Ethanol hinzugegeben und für 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt und der Überstand restlos entfernt. Daraufhin wurde das Pellet 3-4 min luftgetrocknet und dann in 40 µl ddH₂O gelöst.

Für die Ligation wurden je 1µl des dephosphorilierten Vektors mit 1µl T4 DNA-Ligase, 2 µl 10x Ligationspuffer und maximal 10 µl DNS in einem Gesamtvolumen bis zu 20 µl eingesetzt. Die Ligation wurde in einem Wasserbad bei 14°C über Nacht inkubiert. Für die Transformation mit dem TA-Cloning-Kit am folgenden Tag wurden 3 µl des Ligations-ansatzes zu 50 µl auf Eis aufgetauter One-Shot kompetenten Zellen gegeben. Die Transformation erfolgte wie unter 3.0.3. beschrieben.

Je 120 µl des Transformationsansatzes wurden 50 µl IPTG und 50 µl X-Gal auf kleinen LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen, und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.6.4. Bakterienanzucht, Minipräparation und Kontrollrestriktion

Die Bakterienanzucht und die Minipräparation erfolgten wie unter 3.0.4. beschrieben.

Dann wurden zu 7 µl der gelösten Plasmid-DNS 10 µl dest. Wasser, 2 µl 10x Puffer und 1 µl Enzym (Sst I) gegeben, und nach kurzem Mischen für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Das Gesamtvolumen des Verdau wurde auf ein 1% Agarosegel aufgetragen.

Zusätzlich wurde mit 0,5 µl der aus der Präparation gewonnenen DNS eine Überprüfungs-PCR mit den Primern GHS 1l und 1u durchgeführt (siehe 3.0.1.).

3.6.5. Bakterienanzucht, Maxipräparation

Für den Maxipräparationsansatz wurden 100 µl Bakteriensuspension aus den entsprechenden Minipräparationsansätzen zu 100 ml LB-Ampicillin-Medium gegeben und das Gemisch über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Plasmidpräparation wurde mit dem Plasmid-Extraktions-Kit von Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zuerst wurden die 100 ml Medium mit der über Nacht gewachsenen Bakterienkultur 15 min bei 4°C mit 6000 xg in einer Beckmann-Zentrifuge zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 und 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden 10 ml eisgekühlter Puffer P3 hinzupipettiert und nach guter Durchmischung 20 min auf Eis inkubiert. Nach dieser Zell-Lyse erfolgte die zweimalige Zentrifugation bei 4°C mit >15000 xg für 30 min, um die Zelldebris gründlich zu entfernen. Ein Qiagen-Q-Tip-500 wurde mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert und dann mit dem Überstand beschickt. Nach zweimaliger Waschung der Säule mit je 30 ml QC-Puffer wurde die DNS mit 15 ml QF-Puffer in ein 50ml-Falcon-Röhrchen eluiert, mit 10,5 ml Isopropanol versetzt und durch Zentrifugation bei 4°C mit >15000 xg für 30 min präzipitiert. Das Pellet wurde mit 10 ml kaltem 70% Ethanol gewaschen, ca. 15 min luftgetrocknet und schließlich in 100 µl

ddH₂O gelöst. Der DNS-Gehalt wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm mit einem Photometer bestimmt.

3.7. Sequenzierung der Promotorregion

Eine PCR für die Sequenzierung der unter 3.7. gewonnenen DNS wurde mit dem ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion Kit von Perkin Elmer mit den unter 2.1.2. aufgelisteten Primern durchgeführt.

20µl-Ansatz:	Terminator Big Dye Ready Reaktion Mix	4 µl
	Doppelsträngige DNS	500 ng
	Primer	10 pmol
	ddH ₂ O	q.s.

PCR-Programm:	96°C	30 sec	
	50°C	15 sec	25 Zyklen
	60°C	4 min	
	25°C	hold	

Die Sequenzierungs-Produkte wurden durch eine Ethanol-Präzipitation aufgereinigt.

Dazu wurde für jeden PCR-Ansatz ein 1,5ml-Eppendorf-Tube mit 2 µl 3M Natriumacetat (pH 5,5) und 50 µl 95% Ethanol beschickt, die 20 µl PCR-Produkt hinzugegeben, gevortext und 10 min auf Eis gestellt. Es erfolgte eine 30minütige Zentrifugation bei 4°C mit 14000 rpm. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen und ein zweites Mal unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde der Alkohol entfernt, und es schloß sich eine Zentrifugation von 6minütiger Dauer in einer Vakuumzentrifuge an. Der Gellauf in einem Polyacrylamidgel wurde in einem Servicelabor durchgeführt, das die Sequenzinformation in elektronischer Form lieferte. Die Sequenzierung der Promotorregion erfolgte schrittweise durch Primer, die aus dem jeweils neu sequenzierten Abschnitt herausgesucht wurden.

3.8. Herstellung von Promoterkonstrukte mittels PCR

3.8.1. Konstrukt-PCR

Für die Konstruktherstellung wurden die unter 2.2.4. genannten Primer für eine PCR mit dem Endvolumen von 50 µl eingesetzt.

Dazu wurde nach diesem Pipettierschema vorgegangen:

dNTP-Mix (10mM)	1 µl
10x Pfu-Puffer	5 µl
Pfu-Polymerase (5 U/ul)	0,4 µl
Antisenseprimer (GP-P16)	25 pmol
Senseprimer	25 pmol
ddH ₂ O	bis zum Endvolumen von 50 µl.

Für die PCR wurden folgende Annealing-Temperaturen eingestellt:

GP-P16 mit GP-P 9 bei 64°C

GP-P16 mit GP-P11 bei 64°C

GP-P16 mit GP-P12 bei 64°C

GP-P16 mit GP-P14 bei 62°C

GP-P16 mit GP-P17 bei 66°C

GP-P16 mit GP-P18 bei 64°C

GP-P16 mit GP-P19 bei 66°C

GP-P16 mit GP-P20 bei 66°C

GP-P16 mit GP-P22 bei 58°C

PCR-Bedingungen:	95°C	5min	1 Zyklus
	x°C (s.o.)	1min	
	72°C	1min	35 Zyklen
	95°C	1min	
	20°C	hold	

Zur Überprüfung der erwarteten Länge der PCR-Produkte wurden je 10 µl des PCR-Produktes mit je 1µl Ladepuffer auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe eines 1kb DNS-Längenmarkers gemessen.

3.8.2. Ligation und Transformation der Konstrukte in kompetente Zellen

Für die Ligation wurde der pCR-Blunt-Vektor ausgewählt, da mit der Pfu-Polymerase glatte DNA-Enden in der PCR entstehen, und der pCR-Blunt-Vektor ebenfalls glatte Enden aufweist. Dieser Vektor trägt eine Kanamycin-Resistenz.

Für die Ligation der Konstrukte aus dem Startprimer GP-P16 und GP-P9, GP-P14, GP-P17, GP-P18, GP-P19, GP-P20 und GP-P22 wurden je

5 µl	Konstrukt-PCR-Produkt
1 µl	pCR-Blunt-Vektor (25 ng/µl)
1 µl	10x Ligationspuffer
1 µl	Ligase (5 U/µl)
und 2 µl	steriles Wasser

in einem Reaktionsansatz zusammenpipettiert. Die Reaktionsansätze wurden über Nacht in einem Wasserbad bei 14°C belassen. Am nächsten Tag konnte die Transformation wie unter 3.0.3. beschrieben durchgeführt werden. Es wurden Kanamycin-Agar-Platten verwendet, auf denen 200 µl Transformationsansatz ausgestrichen wurden.

3.8.3. Überprüfung der gewachsenen Kulturen mittels Minipräparation und Restriktionsverdau

Zur Überprüfung der gewachsenen Kolonien wurden mehrere Kulturen in Kanamycin-LB-Medium angesetzt. Die Minipräparation erfolgte wie unter 3.0.4. beschrieben.

Die DNS wurde in 50 µl dd H₂O aufgenommen.

Der Verdau wurde entsprechend dem unten genannten Schema zusammenpipettiert:

DNS in dd H ₂ O	5 µl
10x Enzympuffer	2 µl

Enzym Eco RI (10 U/ μ l)	0,5 μ l	
Steriles Wasser	12,5 μ l	in einem Ansatz von 20 μ l.

Die Auswertung erfolgte durch einen Elektrophoreselauf auf einem 1% Agarosegel. Es wurde mit der Plasmid-DNS weitergearbeitet, die das erwartete Insert enthielt.

3.8.4. Umklonierung der Konstrukte in den pGL3-Luciferase-Vector

Verdau der Plasmid-DNS mit den Restriktionsenzymen KpnI und XhoI

Es wurde nachstehendes Schema für einen 20 μ l-Ansatz benutzt:

DNS aus der Minipräparation	6 μ l
10x Puffer 4 von Gibco BRL	2 μ l
KpnI (10U/ μ l)	0,5 μ l
XhoI (10U/ μ l)	0,5 μ l
Steriles Wasser	11 μ l

Ebenso wurden 4 μ g des pGL3-Luciferase-Vectors geschnitten.

Der Verdau wurde zwei Stunden bei 37°C im Wärmeschrank durchgeführt. Anschließend wurde das Gesamtvolumen des Verdau mit 2 μ l Ladepuffer auf ein 0,8% Agarosegel aufgetragen. Nach genügender Auftrennung der Banden wurde nach deren Exzision die DNA-Gel-Extraktion mit dem Qiagen-Kit vorgenommen.

3.8.5. Ligation der Konstrukte in den Luciferase-Vector, Transformation und Minipräparation

Die Ligation wurde mit einem Vector / Insert-Verhältnis von 1:3 durchgeführt. Der Ligationsansatz enthielt 4 μ l der verdauten Konstrukt-DNS, 1 μ l dephosphorilierten, verdauten Luciferase-Vector, 1 μ l 10x Ligasepuffer, 1 μ l T4-Ligase und 3 μ l steriles Wasser, und wurde über Nacht bei 14°C im Wasserbad belassen. Am nächsten Tag wurde die Transformation wie unter 3.0.3. mit DH5-alpha kompetenten Zellen durchgeführt. Danach wurden die positiven weissen Kolonien gepickt, in 5ml LB-Ampicillin-Medium überführt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank geschüttelt. Die

Präparation erfolgte wie in 3.2. mit dem Qiagen-Kit. Die Orientierung der PCR-Amplifikate zum Vektor wurde durch PCR mit oben genannten Antisense- und Senseprimern und dem Transmenbrandomänenprimer T7, sowie durch folgende Sequenzierung überprüft.

3.8.6. Verdau und Maxipräparation

Für den Verdau wurden je 10 µl der aus der Minipräparation gewonnenen DNS zusammen mit 2 µl 10x Puffer, 0,5 µl KpnI (10U/µl), 0,5 µl XhoI (10U/µl) und 7 µl ddH₂O für zwei Stunden bei 37°C im Wärmeschrank angesetzt.

Zur Auswertung wurden je 10 µl des Verdaues mit 1 µl Laufpuffer auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Danach wurde mit 1 ml der Bakterienstämme, die das Luciferase-Promotor-Konstrukt aufgenommen hatten, eine Maxipräparationskultur mit 100 ml LB-Ampicillin-Medium angeimpft. Die Kulturen wuchsen über Nacht bei 37°C im Schüttler. Am nächsten Tag erfolgte die Plasmid-Maxipräparation mit dem Qiagen-Kit wie unter 3.6.5. beschrieben. Die Konzentration der gewonnenen DNS wurde photometrisch bestimmt.

3.8.7. Sequenzierung der Konstrukte

Die Sequenzierung der Konstrukte erfolgte wie unter 3.2.8. beschrieben. Die Luciferase-Konstrukte wurden jeweils mit den pGL3-Vektor-spezifischen Primern GL3 und RV3 sequenziert, die das Insert flankieren, sowie weiteren internen Primern.

3.9. Transfektion

Die Transfektionsexperimente erfolgten an vier aufeinanderfolgenden Tagen. An Tag 1 fand die Aussaat der Zellen, an Tag 2 die Kalzium-Phosphat-Transfektion von GHRP-Promotor-Konstrukten in verschiedene Zelllinien, an Tag 3 der Glycerol-Schock und an Tag 4 die Lyse der transfizierten Zellen mit Protein-Gewinnung und dem Luciferase-Assay statt.

3.9.1. Aussaat der Zellen

Die Zellen wurden mit 1xPBS gewaschen, Trypsin/ EDTA-Lösung (Ausnahme GH4-Zellen: 1xPBS / EDTA 5 mM) dazugegeben und die gelösten Zellen in bereits mit 5 ml FCS-Medium beschickte 15ml-Röhrchen gegeben. Danach wurde die Zellsuspension 4 min bei 4000rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen mit 10 ml FCS-Medium resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden je 100 µl in einen Meßbecher mit 18 ml Isoton-Lösung gegeben und die Zellen zweimal mit dem Coultercounter gezählt. Dann wurden die Zellen in 6-well-Platten in 2 ml Medium mit 5×10^5 Zellen pro Well ausplattiert und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ in den Brutschrank gestellt.

Am folgenden Tag wurde Medium mittels Wasserstrahlpumpe entfernt und stattdessen je 2 ml 10% FCS/DMEM-Medium hinzugegeben.

Die Transfektion sollte von diesem Zeitpunkt an nach 2 bis 2,5 Stunden durchgeführt werden.

3.9.3. Calcium-Phosphat-Transfektion mit dem „Profection Mammalian Transfection System“ von Promega

Zuerst wurde die Transfektionslösung nach folgendem Schema angesetzt:

Röhrchen 1:	-Luciferase-Reportergen-Konstrukt (1µg/µl)	3 µl
	-β-Galaktosidase-Kontroll-Konstrukt (0,75µg/µl)	2 µl
	-Calcium-Chlorid-Lösung 2M	24 µl
	<u>-dest. Wasser (bis zum Endvolumen)</u>	<u>171 µl</u>
	- pro Well total	200 µl
Röhrchen 2:	-2xHEPES-Puffer	200 µl

Anschließend wurde der Inhalt aus Röhrchen 1 unter gleichzeitiger konstanter Luftzugabe tropfenweise in Röhrchen 2 pipettiert.

Nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Röhrchen gevortext und

in Triplikaten je 400 µl Reaktionsansatz pro Well pipettiert, und anschließend im Brutschrank bei 37°C für 16 Stunden inkubiert.

3.9.4. Glycerol-Schock

Die Zellen wurden 1x mit 2 ml 1xPBS-Medium gewaschen, anschließend mit 1 ml 15% Glycerollösung (15% Glycerol+ 85% 1xPBS) pro für genau 2 min inkubiert, dann 1x mit 2 ml 10% FCS/DMEM gewaschen und mit 2 ml 10% FCS/DMEM pro Well bei 37°C über Nacht im Brutschrank belassen.

3.9.5. Extraktion der Proteine

Die Zellen wurden einmal mit 2 ml PBS gewaschen, und dann pro Well 200 µl 1x Reporter-Lysis-Puffer hinzugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Zell-Lysat mit einem Zellschaber vorsichtig gelöst und in vorbereitete Eppendorf-Tubes transferiert. Das Lysat in den Tubes wird sodann 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Röhrchen transferiert.

3.9.6. Luciferase-Assay

Für den Luciferase-Assay wurden 20 µl Zellextraktions-Überstand in Meßtubes transferiert, je 100 µl Luciferase-Reagenz hinzugegeben und sofort bei 1-3 sec Meßzeit die RLU (Relative Light Units) im Luminometer gemessen.

4. Ergebnisse

4.0. Klonierung eines spezifischen GHS-R-DNS-Fragments zur Sondenherstellung und als Positivkontrolle

Das mit Hilfe der spezifischen Primer GHS 1u und GHS 1l hergestellte PCR-Amplifikat hat eine zu erwartende Länge von 149 Basenpaaren. Dies entspricht den Nukleotiden 67-215 der kodierenden Region des GHS-Rezeptors, welche für beide Rezeptorvarianten 1a und 1b identisch ist. In der Auswertung der PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese bestätigte sich diese Länge.

Zur weiteren Überprüfung wurde das PCR-Produkt in den pCRII-Vektor (3,9 kb) kloniert und mittels Sequenzierung bestätigt.

4.1. Isolation eines GHS-R-positiven genomischen Klons

Für das PCR-Pool-Screening wurde eine menschliche genomische Plazenta-DNS-Bank in mehrere Fraktionen getrennt (A bis H und 1 bis 12), die dann in die 96 Wells einer Mikrotiterplatte amplifiziert wurden, so daß man eine Anreicherung der Phagenklone (10^6 PFU/ Well) erhielt. Diese 24 Pools wurden mit dem Primerpaar GHS1 Upper und Lower durch eine PCR unter konstanten Bedingungen auf positive Klone untersucht. Die Auswertung mit der Agarose-Gelelektrophorese ergab bei folgenden Phagenpools Signale:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	x				x			x	x	x	x	x
B	x				x			x	x	x	x	x
C												
D												
E												
F												
G												
H	x				x			x	x	x	x	x

Es wurde eine erneute PCR unter den gleichen konstanten Bedingungen durchgeführt, diesmal jedoch mit jenen gekreuzten Phagenproben, die ein positives Signal zeigten (siehe Tabelle 1), wodurch die Zahl der im folgenden konventionell zu screenenden Phagenklone auf ein Minimum reduziert wurde.

Bei der folgenden Auswertung mittels Agarose-Gelelektrophorese ergab die PCR des gekreuzten Phagenprobe A11 das deutlichste Signal.

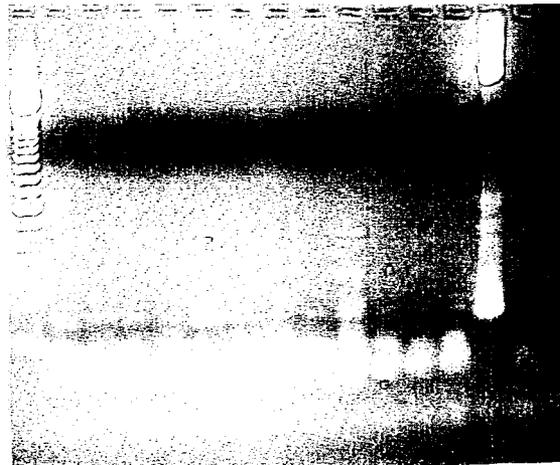


Fig.1 PCR der gekreuzten Phagenproben mit Primer GHS 1u und 1l (von links): A5/ A8/ A9/ A10/ A11/ B1/ B5/ B8/ B9/B10/ B11/ H8/ Plasmid und als Molekulargewichtsmarker die 100bp-Leiter

Zu einer Bakteriensuspension wurden Phagen der positiven Probe A11 gegeben, worauf eine Anzucht auf NZY-Top-Agar-Platten erfolgte.

Zur Auswertung wurde ein doppelter Abklatsch dieser Platten mit Nylon-Rundfiltern durchgeführt.

Diese Nylonmembranen wurden mit der spezifischen DIG-11-dUTP markierten Sonde über Nacht hybridisiert. Bei der anschließenden Detektion und Filmexposition zeigte sich auf zwei der 15 Platten ein doppelt-positives Signal. Zur Überprüfung der ausgestanzten und in 1ml SM-Puffer diffundierten Phagen wurde eine PCR mit der

„Phagenlösung“ durchgeführt, wobei beide Klone ein positives Signal bei der zu erwartenden Länge von 149 bp gaben.

Zur Isolierung eines einzelnen positiven Phagenklones wurde die „Phagenlösung“ 1:4000 verdünnt, so dass sich die einzelnen Kolonien auf den Agarplatten deutlich voneinander unterscheiden ließen. Nach der Detektion zeigte sich auf einer von sechs Platten ein doppelt positives Signal, woraufhin dieser Klon in 200 µl SM-Puffer aufgenommen wurde. Um den Klon zu bestätigen, wurde erneut eine PCR durchgeführt.

In Folge wurde die Phagen-DNS extrahiert und mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Es wurden die einzelnen Restriktionsenzyme Bam H I, Eco RI, Kpn I, Not I, Pst I, Sal I, Sma I und Sst I, sowie die Kombination Eco RI und Not I verwendet.

Anschließend erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese, die bis zur vollständigen Auftrennung der Banden über Nacht bei 30 Volt lief. Die Auswertung erfolgte mittels Southern-Blot.

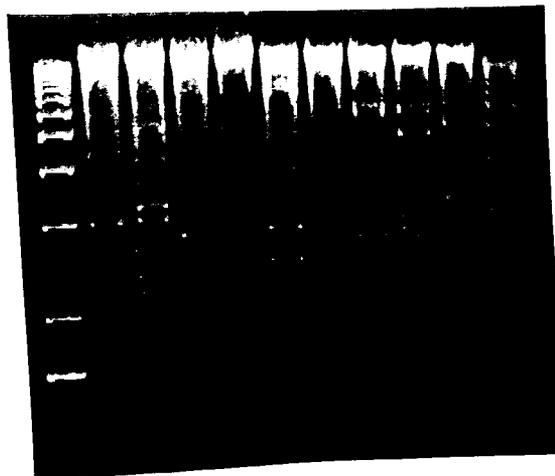


Fig2 Verdau der Phagen-DNS mit den Restriktionsenzymen BamI, EcoRI, KpnI, NotI, PstI, Sall, SmaI, SstI, EcoRI mit NotI (von links) und als Molekulargewichtsmarker die 1Kb-Leiter

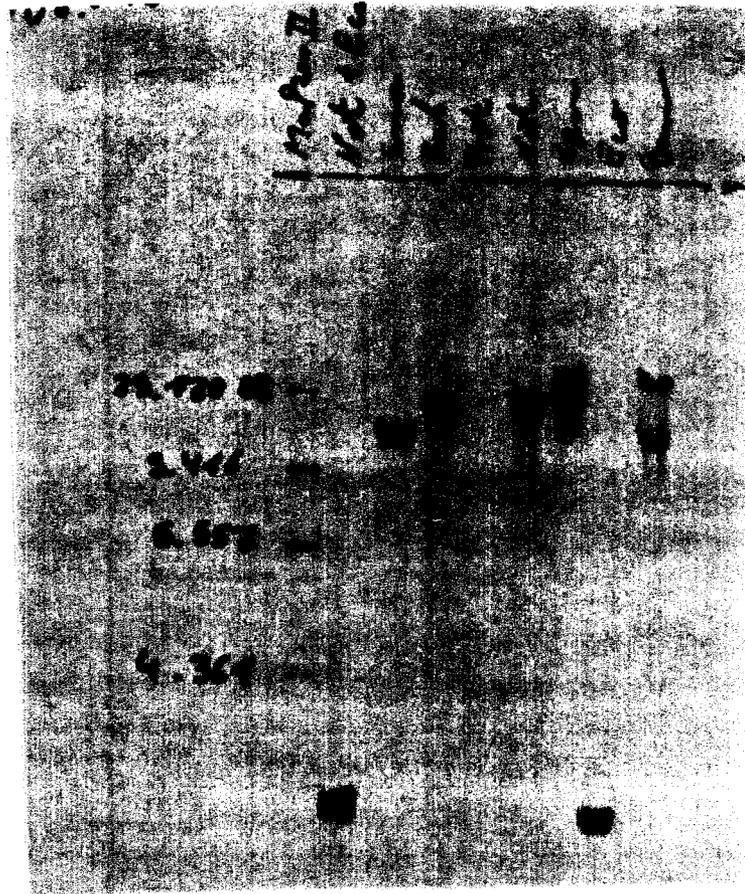


Fig 3 Southern Blot eines Phagenverdaus mit den Restriktionsenzymen NotI u. EcoRI, SmaI, SalI, PstI, NotI, KpnI, EcoRI und BamI mit dem DIG II-Marker

Das Restriktionsenzym Not I setzte das etwa 18 kb große genomische DNS-Fragment aus dem Phagen frei.

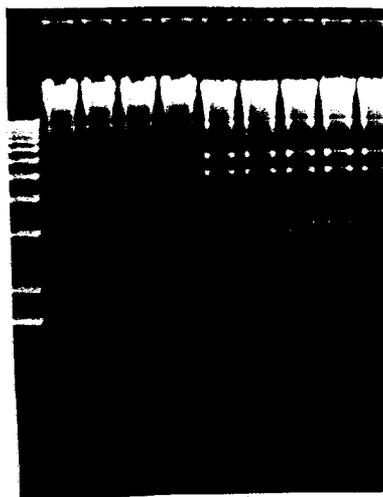


Fig.4 Verdau der Phagen-DNS mit den Restriktionsenzymen Not I (links) und Sst I (rechts) und der 100bp-Leiter, wobei SstI die genomische DNS in fünf kleinere Banden schneidet

4.2. Charakterisierung des genomischen Klons

Zur weiteren Arbeit wurde das Restriktionsenzym Sst I ausgewählt. Es schnitt die genomische DNS im Sst I-Verdau in fünf deutlich voneinander abzugrenzende Banden mit Größen von 1,6 kb, 2,8 kb, 3 kb, 4,8 kb und 5,5 kb, sowie die Lambda-Phagenarme mit ihrer Größe von 23 kb und 9 kb. GHS-R-positive DNS-Fragmente wurden mittels Southern-Blot identifiziert.

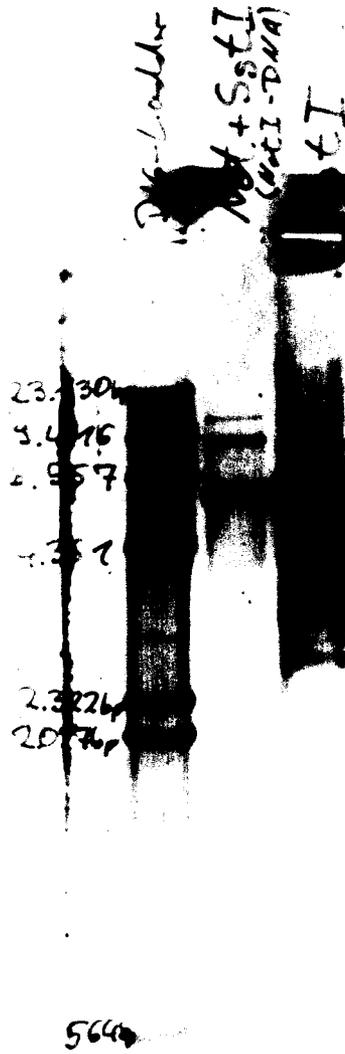


Fig.5 Southern-Blot der SstI-Fragmente aus der genomischen DNS mit der DIG-Leiter als Molekulargewichtsmarker

Das 18kb-NotI-Fragment sowie das 5.5kb-SstI-Fragment enthielten GHS-R-positive DNS. Es ließen sich DNS-Fragmente mit einer Länge von 1,6 kb, 3 kb und 5,5 kb klonieren.

Die Nukleotidsequenz der DNS-Fragmente wurde in einem automatischen Sequenzierer bestimmt und mittels Lasergene-Software (DNASTAR, Madison, WI,

USA) ausgewertet (Fig.6)

```

+1 ATGTGGAACG CGACGCCAG CGAAGAGCCG GGGTTC AAC TCACACTGGC CGACCTGGAC TGGGATGCTT CCCC GGCAA CGACTCGCTG GGCGACGAGC
   M W N A T P S E E P G F N L T L A D L D W D A S P G N D S L G D E
   ... ..

+701 TCATCGGCAG GAAGCTGTGG CGGAGGAGGC GCGGCGATGC TGTCGTGGGT GCCTCGCTCA GGGACCAGAA CCACAAGCAA ACCGTGAAAA TGCTGGGtgg
   L I G R K L W R R R R G D A V V G A S L R D Q N H K Q T V K M L G G
+801 gtctcagcgc gegctcaggc tttctctcgc gggctctatc ctctccctgt geettctccc ttctctctga gtctccatct ctatttcccc ctgagctgct
   S Q R A L R L S L A G P I L S L C L L P S L .
+901 acctctttct tcagtttctc tgggctctctg tctctctcgc tttctctcaa ttattctctc ctcttgcttt cttgagtgat gtttttgatc tctcaatctt

+1001 tctctctgtc tctgtctctc tctctctctc ccttttactt cgtcagtgtc tttcttaccg tctctatctc tttgtgtctc tttcttctg tctctctctt
+1101 ctctctttca tgcaaaaatg tcccatatct gatttccctt aaaataaatt ttatatcagc ccagaaaactc cactttaaaa atcgagatat cttataaaag
+1201 tccattgtgg tctttaagcg ttaaaagtga ggactgactt cctgcctcaa gtaggatttg tgaatatcta agttacatta agaaaagcag ggtttggatc
+1301 tagaaaagcgt tcagcggtaa attcaaccaa agacatgac aatttgata atcctcttag agattattca ttttcttctc aatattgtga tttgtttctt
+1401 gccctgcatt ttttcagata attgcatcaa tctgtttac cctgctgctg ttcatacagc tttgtaagga agtcagtgac aaatcagtg agtctcattt
+1501 gtttttatga ttacctgcct cttcaggtag gatagactag gataaggtaa ggataaacta gattaaacaa agctccaaca ggaggaaaag agactttgtg
+1601 gaaaccaaca gaattcacta ctctcccaaa tgaccttca ggaacatctg ggcaaatgt cataactgga tttgtctgaat gtttattgca caaattcagc
+1701 tctcttaagt atatgtgttt ggtacaagtg aagtaataat aaataggtt acagcccagc aaaatattaa ctctacttgc attttcaaaa ccaaggtctg
+1801 tatattttat tatttagata ttatagtaa gacttcatac ttaatggcat attttaagc tcttagaag ccattccagg atgatttcat atttccaatt
+1901 ttacagttcc tggactctcc atattaaagt gatagagttt attcaaggaa tgtcaaagat tttattttct ggaccgggta ttctctgtat atgactcata
+2001 ggttataaac ctgctagtgt cctccaaggg atcctaagct ctcacctacg agagtcacat tgttactgtg gcagttaagt tgctactata caacttagtt
+2101 ttaaggataa gtttaataat tctctcaat tttattttca agccattaat ttcttcattg gtgtctcaac accaatgta actttcttct tctttgacaa
+2201 tttgaagggg atcactaaag tgttacaacg actaaaaaat tatttggat tatttttccc tgatttctga atttaaaaa atctaaacat ttagacatca
+2301 ttaaaaatta tcttacatag gcaaaatgaa gacttggatg gatgataatt tatatgagtt ggtttaataa tagccttact tatgtctatt gtaagtggca
+2401 tagaatcatt catctcagtg attcttaac ctaactgtat attcaatctc ctgtgaaact taaaaaaaaa aaagagaaga taaaacat atgctctgatc
+2501 ccctcttaga gatttaaat gactgagctc atactacatc caaggaatct gcattgtttt aaaaagtgcc ccaggagact cggatacaca gctatgggtg
+2601 agtacaacca ctttacctcg taagtgtgtc tgttgtgctt aacacataaa aactgctgga ctattgtgaa taaatggctc agtcagttga gtcaatgtgt
+2701 caactcagta caaaatcact cagatagttg ttaaatagaa atgactgggg agctcagtaa aaattgttga actgtttggtc cagacagact gaatctttgt
+2801 taaatgttg gaacaggaag agcaggacac aatgtttctc tgaagtcaat ggtcatagac catgaaacaa aaacaaagtc ttaaaaatg aatgtgattt
+2901 gctgtgacat tctctgagct gactatctct ctcccattgt ccttttagct GTAGTGGTGT TTGCCTTCAT CCTCTGCTGG CTCCCCCTCC ACGTAGGGCG
   ... .. A V V V F A F I L C W L P F H V G R
   ... ..

+3201 CTCTGAAAGA TGAAGTCTCT CGGGCCTGGA CAGAACTAG TATTAATACA TGAcctagca cattgcgagt acagtcaccg cttattactc taaaccggaa
   T L K D E S S R A W T E S S I N T
+3301 gacatagcac agcagaactt gggaggaagc tgaaggttaa ttttggaaat aggaacacat agatccggaa acatctggga gggaaaaaag atatcatttg
+3401 taggggtgta gcagtttgat ttgatcgcac aattatcagt gctctcatac actatttctg catatttact gtctatgatt ttgcattctg ctgctgggtg
+3501 tgggtgagggc tttgcaatc agagaaagga ggaagagcag agtgagcaat tagggcactt cttggtaggt aaatacaaat ttgctttgct ttttcataat
+3601 gatcaaaatt atttggtaa aagaatgaca ttacaatata aaatttaaaa tgtaactttt aaaaactagc tattttcata aagctctaga gcagtgtat
+3701 ccaagagaaa tataacatga ggcacgtgag caatcagtac aaaaattatt aaaaaggaat ttacattctt tttttcaca ctaagtcttt gaaatctggc
+3801 atgcttttta cacttacaga aacctcaat ttggacacta agttttcatt ggtaatattt gatgtattta gatttcataa aatttacaga taaaaagtag
+3901 attcaacaat ctaagtgtgc taagcacact taaaagtttt ccagtaactg aaacaacggt aaacctttaa acttaaaatt aattaaagt aaaaattcag
+4001 ttcttcagtt gcactagtca catttcaagt atccagtagc tcgaggttac cactcagaac agtacagctc tagagtatat acaaaactta tcaatcactt
+4101 tatatqaaat gtttaaaat aaactactgtt tccctaaat gtttttatag tgatgttcc acagcagaat tttagagtga tgaactacta aaatcacacc

```

Fig. 6 Teil der genomischen Sequenz der GHS-Rezeptorsubtypen 1a und 1b. Die Translationsstartstelle ist als +1 definiert. Die kodierende Sequenz von GHS-R 1a ist durch Großbuchstaben gezeigt, die Intronsequenz und die 3'-

Region in kleinen Buchstaben. Splicing-Positionen sind durch vertikale Linien markiert.

Die Sequenzierung ergab, daß das offene Leseraster der cDNS des Subtypes Ib (Nukleotide 1-870) von einem einzigen Exon kodiert wird, das vollständig in dem klonierten Fragment 5,5 kb/SKII enthalten war (Fig.7).

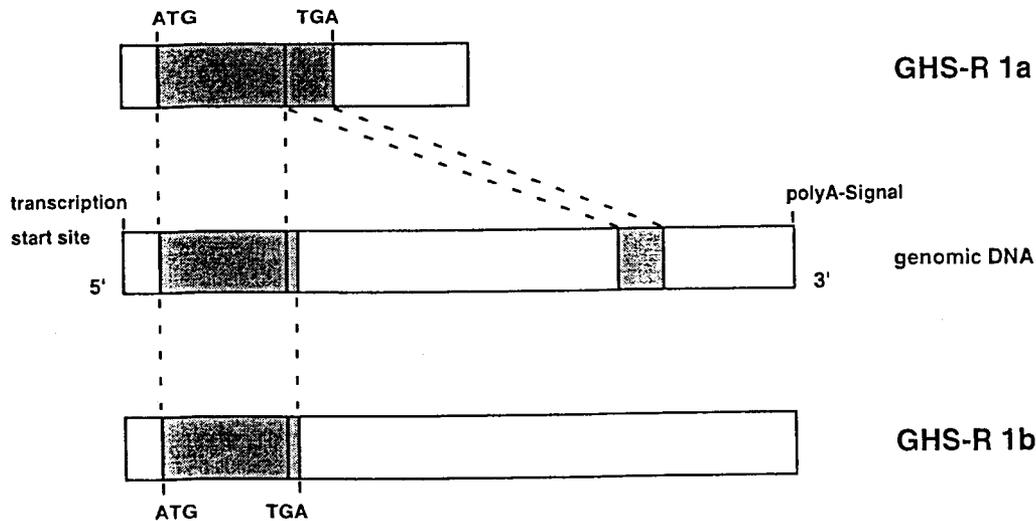


Fig. 7 GHS-R Typ 1a ist durch zwei Exons kodiert, GHS-R Typ 1b durch ein Exon

Die Nukleotide 1-796 des offenen Leserasters des Types Ia sind identisch mit denen des Types Ib. Das Fragment 5,5 kb /SKII enthält weiterhin 1955 Nukleotide eines folgenden Introns. Weitere 196 Nukleotide der Intronsequenz sind im Fragment 3 kb/SKII enthalten, folgend von den Nukleotiden 797 bis 1101 des Subtypes Ia und ca. 2 kb der 3`-flankierenden Region.

Das offene Leseraster von GHS-R Typ Ia wird somit von zwei Exons a1 und a2 kodiert, unterbrochen durch ein 2151 Nukleotide großes Intron. Die direkt Abfolge von 5,5 kb/SKII und 3 kb/SKII konnte durch die Sequenzierung eines überlappenden, genomischen DNS-Fragmentes bestätigt werden (s.umseitig Fig.8).

```

-2700          agtg ccattaaatg gctggctatt ttagctaaCa tgaaaatfff tttatcaca atagttttgg
                                     Oct1
-2600 tggtttttgt tttcagtttt ttcaactatc agccatagct ttagactcga gtagactaga aatatatccc acaatatfff cctgattctc agtcttaggc
-2500 aataacttcc catagtattc tgatttatcc cagtccactt tctctccctt tctttccaca tacatcaa cc tactgataat ataggctcagg gagtaacaga
                                     ER
-2400 gttattgatt aaataaaaac ttgtttgraa ttggtagttt gacttagctg taataacttaa aaaatagt ag tctgaaatta atgtttfaaa aactcaattt
                                     Oct1 AP1 Oct1
-2300 ggggcccggc acagtggctc acggctgtaa tcccagcact ttgggagacc gaggcgggca gatcacgagg tcaggagttc gagacaagac tggccagtat
                                     Oct1 SP1 USF NF1
-2200 ggtgaaaccc tgtctcttct aaaaatacaa aaaaaaatt atccaggcgt ggtggcacac gctgtagtc ccagctacta gagagactga ggcagaagag
                                     SP1 AP4
-2100 ttgcttgaac cgggacttat gcgctcagaa gtccaaacgg gtgggagatc caatactggg aggcggagcgt tgcagtgagc agagatcgcg ccaactgact
                                     SP1
-2000 ccagcctggg cgacagaggg agactccgtc tcaaaacaaa acaaaacaaa accagcaaaa caaaacaaa caaagcaaaa cgaacaaaaa ctcagtttgg
-1900 tccaatgtct aacacaccag cggcaaccaa accactatgt taaattctgt gtatcaaaact tctctcatgt agtaatttac tgcattggagt ctttcacgca
                                     AP4 Brn2 Oct1
-1800 tttgtgcaca cattcagctc taggtctttg tggactttta agtattaaca atttaggtag tagaggtggt acaaactgtc tgtgaaaggc aagtacaaac
-1700 gcattcaact gagggggata ctctctcata cacagtacgt ggtatctcat cgggtgagcg ccgatgtgta tggccaaggc agtgactaac gccggcctgt
                                     AP1
-1600 gcttcgtggg agtctgcctt gctctccgtt ggggtaggac tgaggcgta gaagcgcaag ttaaaaaagg tgggagtgc agggaaagcca ttctccagc
                                     AP1 AP4
-1500 ggcgctttgc ggtaggatgg atgtggcgtt gggcacagtg ctgaatatgt tcttggggcg gtcccagcgt cggtggggcg ggaagggcggt gtcggatttg
                                     GR
-1400 tgaattcgct gccaactggc agtctcatgc ctccgggtgc tgatttctgg ctctgagcag gagacgca ca gaccgcgtcc agagggctcac cttgctagt
                                     NF1 NF1 ER
-1300 taggggtggc ctttgacctg ttcccacggg cacagcttct acttctcaac agcaacgctt ctctattta ttgagtgcct ccggtgggtcc ctgacacttg
                                     NF1 AP4 AP1
-1200 atatcacccc cagtggctcg cacaaatcat tgcaattcaa agaaaaagac gtaatgctca ggaggtgaa gaccttgccc aaggaatac ggctactaaa
                                     Oct1
-1100 tggctgatct ctctcagtta tgctcaaaa aatgtttcct gctcactctc gacgcgccag cctccacagcc tcttctctac ttgccgcctc cacacacctc
-1000 caaccctgcc ttttctctt ctctcttcc ctccctgacc aacgtcggca ccccgccacc aggtttgcat caagcaaaa taatatacc tacagcagag
                                     AP1 Oct1 AP4
-900 tctctaccac taccgagtga tacaaggac tgggattctg gacagggttt actcacatat cttgcccctg tgcgctcaga agtcccacc ggggtgggaga
-800 tccgacactg gtccccgagt cccagctcg ctgtgtgacc ttggacaagt agtcacatcg ctgaacctgg gtctataac tgcgtgagac tattctttgg
                                     AP4 AP1
-700 tgctcaccgg tatgaataca aacacaaggt cttcttttc tctctctatc cccctccca agtcagcttg tcaagctcg ctttttcttt ccaccagggc
                                     BR
-600 catagccagc tgcagccttg tggaggaaga aatcaggtcc cagctgctaa aggtgtctc cccaccgcca ccgtcgtctt caccceccacc cccgggtgtg
                                     AP4
-500 acctgtcctt ccggggcaca ctagtccagc gtcgcccagg gcttcggaga gagcgcctca cgctcccgt tcgcgggcgc tggctccctc ggtccccact
                                     AP1
-400 cgctgcgacg ctttgggaag tgcgagatgg aactggatcg agaacgcaaa tgcgaggcag ggctggtgac aggtatgctt gtgggcccg gccggaggat
                                     AP1
-300 gtgttgggag aaactttggg ggagttggtg ggggaaaggg gaggtgtcag agaaagcagt gggtcac tct ctcaccgact gaaccaecagt ctctctccct
                                     AP1 ER
-200 ctctcttctc cccatctcac cttctctc ggtctctgcc tctcacctcc ctctctttct tctccaa gca tctctccctc gcgtctgac ccgtctctcc
-100 ctgcacacct cccgccccta agcggactc ctccgggagc agctcgttcc agcctcccag cgcagtcacg tcccagagcc tgttcagctg agccggcagc
+1 ATG

```

Fig.8 Nukleotidsequenz von 2,7-kb der 5'-flankierenden Region der GHS-R. Die Translationsstartstelle ist definiert als +1. Die Nukleotidpositionen sind links gezeigt.

Insgesamt ist das den GHS-Rezeptor kodierende Gen ca. 4,1 kb groß. Die Sequenzierung von 800 Nukleotiden der 3'-angrenzenden Region ergab ein typisches Polyadenylierungssignal mit der Sequenz AATAAA an Position +4118 relativ zur Translationsstartstelle, welche das Ende der mRNA definiert.

Zur Untersuchung transkriptionell aktiver Elemente wurden 2 kb der 5'-flankierenden Region sequenziert. Die Sequenzierung der Promotorregion erfolgte schrittweise durch Primer, die aus dem jeweils neu sequenzierten Abschnitt herausgesucht wurden.

4.3. Untersuchung der Promotoraktivität im Zellsystem

Eine PCR zur Herstellung verschieden großer Abschnitte der 5'-flankierten Region ergab bei folgenden Primerpaarungen die zu erwartende Länge:

GP-P16 mit GP-P17	168 bp
GP-P16 mit GP-P18	309 bp
GP-P16 mit GP-P19	460 bp
GP-P16 mit GP-P9	643 bp
GP-P16 mit GP-P20	951 bp
GP-P16 mit GP-P14	1137 bp
GP-P16 mit GP-P22	1745 bp



Fig.9 PCR der Promotorkonstrukte -168GHSR, -309GHSR, -460GHSR, -643GHSR, -951GHSR, -1137GHSR und -1745GHSR (von links) aus dem Luciferase-Plasmid mit der 100bp-Leiter

Als bewährte Strategie für die DNS-Fragment-Klonierung wurde die Blunt-End-Klonierung mit dem pCR-Blunt-Vektor (3,5 kb) angewendet, welcher als genetischen Marker eine Kanamycin-Resistenz enthält. Nach der Überprüfung der Transformation mittels Minipräparation und Restriktionsverdau mit Eco RI erfolgte die Umklonierung der Konstrukte in den pGL3-Luciferase-Vektor (4,8 kb). Zur Überprüfung erfolgte erneut ein Enzymverdau, diesmal mit Kpn I und Xho I.

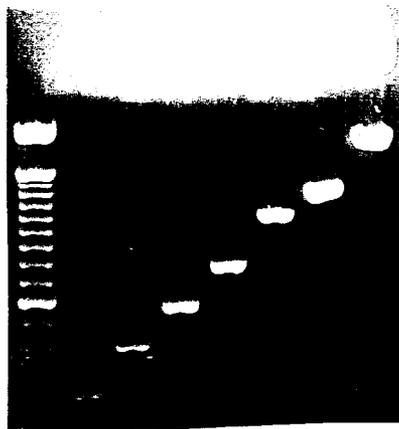
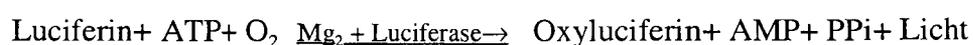


Fig.10 Verdau der Promotorkonstrukte nach Umklonierung in den pGL3-Vektor mit den Restriktionsenzymen KpnI und XhoI und der 100bp-Leiter als Molekulargewichtsmarker

Die Plasmid-DNS wurde zur Überprüfung sequenziert.

Die Gen-Expression in transfizierte eu- oder prokaryontische Zellen wird im allgemeinen durch das „Linking“ einer Promotor-Sequenz mit einem leicht zu detektierenden „Reporter“-Gen untersucht. In diesem Fall wurde das Gen für die Luciferase des Glühwürmchens, *Photinus pyralis*, verwendet. Die Luciferase katalysiert folgende Reaktion:



Die Lichtemission wurde dann im Luminometer nach einer Sekunde Meßzeit gemessen.

Alle sieben Luciferase-Promotor-Konstrukte, welche das gleiche 3`-Ende und variable 5`-Enden (von -168 bis -1745 bp) besitzen, wurden in eine GH 4-Zelllinie transfiziert. GH 4-Zellen entstammen einer klonalen Linie einer Ratten-Hypophysen-Tumorzelle, welche GH sezerniert.

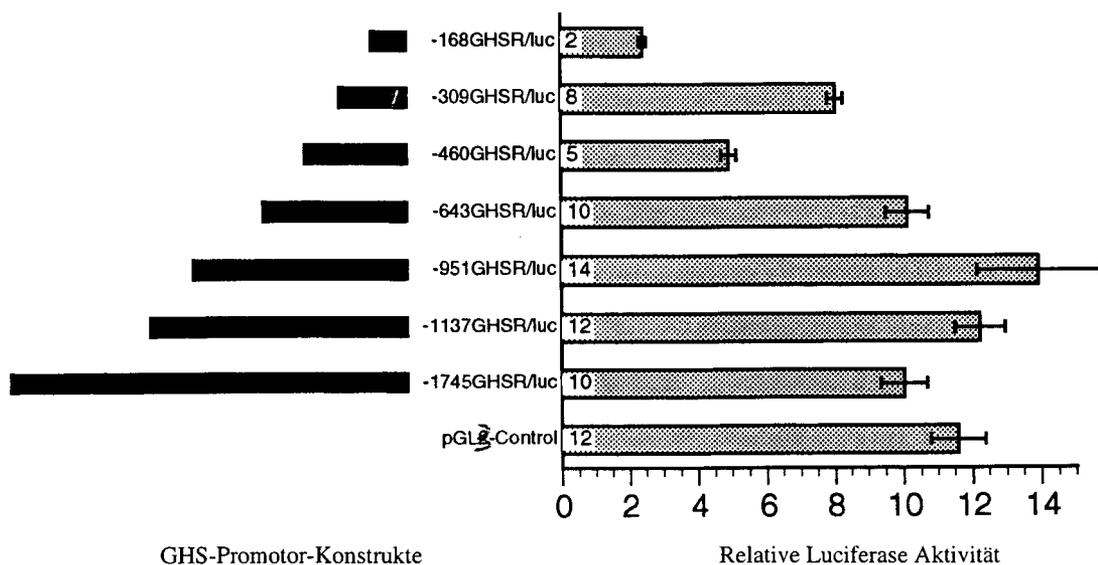


Fig.11 Promotoraktivität der verschiedenen Deletionskonstrukte der GHS-R-5` flankierenden Region in GH4-Zellen. Links die GHSR-Promotor-Luciferasegene Plasmidchimären mit variablen 5`-Enden und identischem 3`-Ende. Rechts der pGL3-Basisvektor als Kontrolle

In den durchgeführten Transfektionsexperimenten zeigte sich, daß in den -309bp der 5`-flankierenden Region Elemente enthalten sein müssen, die eine Genexpression in Hypophysenzelllinien fördern. Das kleinste -168bp-Promotorkonstrukt zeigte keine signifikante Transkription. In dem Abschnitt zwischen Nukleotid -309 und -460 scheint ein Repressorelement enthalten zu sein, ebenso zwischen Position -951 und -1754. Einen signifikanten Anstieg der Transkription konnte man wiederum zwischen den Konstrukten -460 und -643, sowie -643 und -951 beobachten.

5. Diskussion

5.1. Charakterisierung des GHS-Rezeptorgens und -promotors

In der vorliegenden Arbeit wurde eine menschliche genomische Plazenta-Genbank auf das Vorhandensein der beiden bekannten menschlichen GHS-Rezeptor-Subtypen untersucht. Verwendet wurde dafür ein PCR-Poolscreening und eine nichtradioaktive Detektionsmethode mit einer für beide Typen spezifischen DNS-Sonde. Da für beide GHS-R-Subtypen ein gemeinsamer positiver Klon detektiert werden konnte, wurden Sequenzierungs- und Transfektions-experimente angeschlossen, um zudem die Promotorregion des Genes genauer charakterisieren zu können.

Der menschliche GHS-Rezeptor ist durch ein Gen kodiert, das ca. 4,1 Kilobasen umfaßt.

Die Ergebnisse der Sequenzierung des Klons lassen darauf schließen, daß beide Subtypen durch unterschiedliches „Splicing“ einer Prä-mRNS gebildet werden.

Durch das „Splicing“ eines 2,2 kb großen Introns an Position 796/797 entsteht der für 366 Aminosäuren kodierende Leserahmen des Subtypes 1a mit den typischen sieben Transmembranregionen. Der aus 289 Aminosäuren bestehende Subtyp 1b entsteht durch Translation der unveränderten Prä-mRNS und weist nur fünf transmembrane Domänen auf.

Diese beiden Subtypen wurden mit einer großen genetischen Homologie bei Mensch, Schwein, Ratte und Maus identifiziert (Howard et al.,1996; McKee et al.,1997; Yokote et al., 1998). Bisher fand sich keine signifikante Homologie zu anderen Rezeptoren. Eine nahe Verwandtschaft mit ca. 60% Homologie fand man lediglich zum Neurotensin- und TRH-Rezeptor.

Die Transkription eines Genes stellt einen wichtigen Mechanismus dar, mit dem das Genprodukt kontrolliert wird. Sie ist abhängig von einem bestimmten Nucleotidsegment, dem Promotor, welcher von der RNS-Polymerase erkannt und gebunden wird, worauf die RNS-Synthese beginnt. Der Promotor steht am Anfang

eines Operons, d.h. einer Gruppe von benachbarten Genen, die gemeinsam in ein einziges mRNA-Molekül umgeschrieben werden. Die Isolation des GHSR-Klones erlaubte die Charakterisierung von ca. 2,7 kb der proximalen Promotorsequenz.

Eine für einen Promotor typische TATA-Box ließ sich in dem Bereich der untersuchten 2 kb der 5'-flankierenden Region nicht nachweisen. Auch eine CAAT-Box oder eine GC-reiche Region oder andere bekannte Initiatorelemente der Transkription wurden nicht gefunden. Wie auch für mehrere andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beschrieben, bleibt der Prozeß der Transkriptionsinitiierung für diesen Rezeptor zur Zeit unklar (Petersenn et al., 1998). Transkriptionsfaktorbindungsstellen, die gewebe-spezifische Expression und hormonelle Regulation des GHS-Rezeptors erlauben, werden zur Zeit charakterisiert. Durch weiterführende Experimente konnte gezeigt werden, das eine Haupttranskriptionsfaktorbindungsstelle 227 Nukleotide 5' des ATG-translationsinitierenden Codons lokalisiert ist (Petersenn et al., 1999). Kaji et al. beschreiben dagegen eine Haupttranskriptionsfaktorbindungsstelle an Position -453 durch 5'RACE-Analyse (Rapid Amplification of 5'cDNA-Ends) von Hypophysen-DNS.

In den durchgeführten Transfektionsexperimenten mit einer GH4-Zelllinie zeigte sich, daß in den -309bp der 5'-flankierenden Region Elemente enthalten sein müssen, die eine Genexpression in Hypophysenzelllinien fördern, ebenso in den Abschnitten zwischen den Konstrukten -460 und -643, aber auch -643 und -951. Das kleinste -168bp-Promotoronstrukt zeigte sich neutral. In dem Abschnitt zwischen Nukleotid -309 und -460 scheint ein Repressorelement enthalten zu sein, ebenso zwischen Position -951 und -1754.

In den Transfektionsexperimenten von Kaji et al. mit einer GH3-Zelllinie enthielt das kleinste Promotorkonstrukt 475 Nukleotide der 5'-flankierenden Region. In dieser Arbeitsgruppe wurde lediglich eine herabgesetzte Aktivität durch Konstrukte, welche die -475, -531 oder -608 Nukleotide der 5'-flankierenden Region enthielten,

festgestellt. Eine signifikante Aktivität konnte bei -669 Nukleotiden beobachtet werden. Weiter wurden Repressorelemente zwischen Position -734 und -1224 gefunden. Man kann nicht ausschliessen, dass ursächlich für diese Ergebnisse eine Differenz der transkriptionalen Aktivität des GHS-R-Promotors in GH3- und GH4-Zelllinien ist.

5.2. Hormonelle Regulation

Die Expression des GHSR unterliegt der äußeren Kontrolle positiv wirkender Effektoren wie z.B. dem GH-Mangel, oder auch negativer regulierender Repressoren wie starker GH-Sekretion. Auch durch den eigenen Liganden, also GHS, kann die Synthese des GHS-Rezeptors herunterreguliert werden (Kineman et al., 1999).

Bisher ging man immer von zwei der GH-Ausschüttung übergeordneten Botenstoffen aus: Dem GHRH und dem Somatostatin. Seit der Entdeckung der unterschiedlichen GHS und ihrer beiden Rezeptorsubtypen nahmen die Hinweise zu, daß sie für einen dritten Regelkreis verantwortlich sein müssen. Da der GHSR in vielen Bereichen des ZNS wie natürlich Hypophyse und Hypothalamus, aber auch in Cortex, Hippocampus, Medulla und Plexus choroideus exprimiert wird, ging man davon aus, das es einen unidentifizierten endogenen Liganden für diesen Rezeptor gibt, der die GH-Sekretion kontrolliert (Muccioli et al., 1998). Auch in peripheren Geweben wurde der GHS-Rezeptor gefunden: In Niere, Nebenniere, Herz, Ovar, Lunge, Skelettmuskel, Epiphyse und Schilddrüse (Ghigio et.al., 1998). Wie zu erwarten war, konnte die Expression des GHSR auch in einigen neuroendokrinen Tumoren wie in Karzinoiden, Gastrinomen, Insulinomen und Bronchialkarzinomen nachgewiesen werden (Korbonits et al., de Keyser et al.).

Erst die AG um Kojima und Kangawa konnte 1999 den endogenen Liganden, das sogenannte Ghrelin, identifizieren. Das Ghrelin ist ein Peptid mit 28 Aminosäuren, in welchem das an dritter Stelle stehende Serin überraschenderweise octanoliert ist, was

bei Peptiden bisher nicht bekannt war. Das gefundene Gen kodiert ein Prä-Ghrelin aus 117 Aminosäuren, welches eine 82% Homologie zwischen Mensch und Ratte aufweist. In wie weit die gleichen Regulationsmechanismen für Ghrelin und GHS gelten, bleibt in weiteren Experimenten zu untersuchen. Auch werden für das Ghrelin weitere Rezeptorsubtypen postuliert.

Essentiell ist auch die Wechselwirkung mit anderen neuroendokrinen Regelkreisen. Im Hinblick auf die GHS selbst wurde gezeigt, daß diese eine ACTH-Ausschüttung bewirken, was nach bisherigen Erkenntnissen durch eine zentrale hypothalamische Kontrolle unter Einfluß des Vasopressins bewirkt wird, und nicht durch einen direkten Effekt auf die Hypophyse (Korbonits et al., 1999). Hingegen haben GHS keinen Einfluß auf die Modulation der LH- und FSH-Sekretion, was in klinischen Studien (Shah et al., 1999), aber auch in Experimenten mit der hypothalamischen LHRH-Maus-Zelllinie nachgewiesen werden konnte (Petersenn et al., 1999).

Der Insulin-like-growth-factor 1 (IGF-1) bewirkt eine Hemmung der GH-Antwort auf GHS beim Menschen (Ghigo et al.,1999).

Umgekehrt ist die Regulation des GHS-Signalweges durch andere Regulationssysteme interessant, so gibt es z.B. in bezug auf Glucocortikoide widersprüchliche Ergebnisse im Hinblick auf die Expression des GHS-Rezeptors. So wurde beim Menschen die Ausschüttung von GH nach GHS-Gabe durch eine Stoßinjektion von Dexamethason gesteigert (Pinto et al. 1999). Dagegen bewirkt eine chronische Gabe von Glucokortikoiden eine herabgesetzte Antwort auf GHS (Gertz et al. 1994, Meachem et al. 1999) oder sogar keinen Effekt (Borges et al.1997, Giustina et al. 1995). Bei Patienten mit Cushing-Syndrom war die durch GHS induzierte GH-Sekretion herabgesetzt (Borges et al. 1997, Leal Cerro et al. 1994), wogegen bei Patienten mit Addison-Syndrom die durch GHS stimulierte GH-Sekretion vergleichbar mit gesunden Probanden war (Arvat et al. 1999). Die Ursache für diese widersprüchlichen Ergebnisse bleibt zunächst noch unklar. In weiteren die Transkriptionsfaktor-bindungsstellen betreffenden Untersuchungen fand sich jedoch ein negativ auf

Glucokortikoide antwortendes Element 3' bp 309, sowie ein positiv reagierendes Element an Position -1464 (Petersenn et al. 1999). Auch Kaji et al. zeigten eine Hemmung des GHS-R-Promotors durch Glucokortikoide in GH3-Zellen. Dabei bewirkte jedoch ein -961-Promotorkonstrukt eine signifikante Hemmung der Aktivität, ein -734-Konstrukt zeigte hingegen keinen Effekt. Die zugrundeliegenden Mechanismen dieser differenten Ergebnisse können bisher aber nicht definiert werden. Östrogene dagegen haben eindeutig einen positiven Einfluß auf die Aktivität des GHS-R-Promotors, wobei ein positiv auf Östrogen antwortendes Element 3' des -168 Nukleotides gefunden wurde (Petersenn et al., 1999).

Auch die Wechselwirkung mit den für Wachstumsvorgängen essentiellen Schilddrüsen-hormonen wurde untersucht. So zeigte sich bei hypothyreoten Patienten eine abgeschwächte GH-Sekretion nach GHS-Gabe (Pimentel-Filho et al., 1997), wohingegen die GHS-stimulierte GH-Ausschüttung bei gesunden und hyperthyreoten Probanden gleich war (Ramos-Diaz et al., 1996).

GHRH-Infusionen bei Ratten bewirkten einen Anstieg der GHS-R-mRNA, welcher unabhängig von zirkulierendem GH war (Kineman et al., 1999). TPA wiederum, welches ein wichtiger Aktivator der Protein-C-Kinase ist und somit ein essentieller Bestandteil der Signalkaskade der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, zeigte in folgenden Transfektionsexperimenten keine signifikante Veränderung der GHS-R-Promotoraktivität des -1745GHSR/luc-Konstruktes in GH4-Zellen (Petersenn et al., 1999). Es ist jedoch noch zu untersuchen, ob dieser Effekt wirklich transkriptionellen oder auch posttranskriptionellen Mechanismen unterliegt.

Untersuchungen an männlichen und weiblichen Ratten in bezug auf die Rezeptorexpression von GHRH und GHS haben gezeigt, daß diese Expression auch durch die Geschlechtshormone moduliert wird (Kamegai et al., 1999).

5.3. Klinische Relevanz und Möglichkeiten der GHS-Rezeptors

Klinische Untersuchungen haben ergeben, daß eine inadäquate GH-Sekretion oft auf einer Imbalance im komplexen neuroendokrinen Regelkreis beruht, der die Ausschüttung von GHRH, GH-S und Somatostatin reguliert.

In erster Linie spielen die GHS eine wichtige Rolle in der Diagnostik von GH-Mangelzuständen. In der Pädiatrie übliche Testverfahren sind die Stimulation der GH-Ausschüttung durch Belastung, Clonidin oder L-Dopamin. In der Erwachsenenmedizin werden Tests mit L-Arginin oder GHRH durchgeführt. Standard ist hier jedoch der Insulin-Hypoglykämie-Test. Dieser Test erfordert eine aufwendige Überwachung und ist für die Patienten sehr belastend. Eine alternative Möglichkeit wäre die Stimulation der Wachstumshormonausschüttung durch GH-Secretagogues oder auch durch eine Kombination von GHS mit GH-Releasing-Hormone. Momentan befinden sich diese Alternativen der Diagnostik noch in einer klinischen Testphase.

Eine zentrale Frage in Hinblick auf Therapie und Diagnostik ist, in wie weit der GHS-Rezeptor im Hypothalamus exprimiert wird, so daß eine übergeordnete Wirkung der GHS auf die hypophysäre GH-Sekretion besteht (Muccioli, 1998).

Durch Untersuchungen an Erwachsenen mit funktioneller Hypophysenstieldurchtrennung konnte gezeigt werden, daß eine bei gesunden Probanden durch GHRP-6 ausgelöste GH-Ausschüttung völlig blockiert ist, und das nur eine minimale direkte Wirkung auf die Hypophyse besteht (Casanueva, 1996). Auch die gleichzeitige Gabe von GHS und GHRH, die durch ihren Synergismus die GH-Sekretion wirkungsvoller steigern als jeweils allein, bewirkt bei diesen Patienten keine Aktivität, so daß diese Untersuchungen daraufhinwiesen, daß Strukturen auf hypothalamischem Niveau im neuen Regelkreis aktiv werden.

Bei Kindern bewirkt eine zu geringe GH-Ausschüttung einen hypophysären Minderwuchs. Bei Erwachsenen kommt es zu einer altersabhängigen Abnahme des GH-Spiegels, wodurch es zu einer Abnahme der Muskelmasse und der Knochendichte sowie zu einer Zunahme des Körperfettes kommt. Bei

nachgewiesenem GH-Mangel findet man als klinische Korrelate zudem eine erhöhte Kälteintoleranz, reduzierte Muskelkraft, erhöhte „waist-to-hip-ratio“, trockene Haut und objektivierbare psychische Erscheinungen.

Bei GH-Mangelzuständen kann dieses gentechnisch hergestellt und subkutan zugeführt werden. Diese Hormon-Injektionen entsprechen jedoch nicht der physiologischen pulsativen Ausschüttung des GH (Hartmann et al., 1993, Smith et al., 1996). Eine Alternative wäre die Verwendung von GH-Secretagogues, die neben einer intravenösen, subkutanen und intranasalen Anwendung auch oral verfügbar sind, und eine eher physiologische Ausschüttung von GH mit Pulsation sowie zirkadianer Rhythmik bewirken. GHS sind auch dem GHRH vorzuziehen, da sie eine stärkere Antwort der GH-Sekretion bewirken und weniger Nebeneffekte haben. Zudem fand man bei kontinuierlicher GHS-Gabe eine Desensibilisierung der GH-Antwort nur in bezug auf die Amplitudenhöhe, nicht jedoch in einer Abnahme der Frequenz der pulsativen Ausschüttung (Jaffe et al., 1993).

Indiziert ist eine Therapie mit GH bei Patienten mit hypothalamisch-hypophysären Erkrankungen und auch bei partiellem Ausfall des Hypophysenvorderlappens. Bei Restfunktion der Hypophyse wäre alternativ eine Therapie mit GHS möglich.

Noch fraglich ist die Therapie mit GH bzw. GHS bei Patienten auf Intensivstationen mit negativem Katabolismus, mit „Wasting Syndrom“ bei AIDS, mit dilatativer Kardiomyopathie oder auch bei alternden Menschen. Bei GH-Mangel im Alter ist z.B. keine Überstimulation zu erwarten, da dort ein normaler negativer Feedback des GH-Systems zur Verfügung steht.

Bekannte Nebenwirkungen der GHS-Therapie sind eine geringe dosisabhängige Prolactin-, ACTH- und Cortisolausschüttung, wobei diese Nebenwirkungen von einer intakten Hypothalamus-Hypophysen-Achse abhängig sind (Hickey et al., 1996).

6. Zusammenfassung

Nachdem Anfang der 80er Jahre synthetische Hexapeptide in Ableitung vom Met-Enkephalin entwickelt worden waren, die wirkungsvoll die pulsative Ausschüttung von GH durch die Hypophyse anregen konnten, wurden nach und nach die Effekte dieser sogenannten GH-Secretagogues entschlüsselt. 1996 konnte der G-Protein gekoppelte GHS-Rezeptor kloniert werden. Dabei wurden zwei Splicing-Varianten der c-DNS des Rezeptors beschrieben: GHS-R 1a und 1b. Erst 1999 wurde der endogene Ligand des GHS-R, das Ghrelin identifiziert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, mit Hilfe molekularbiologischer Arbeitsweisen die genomische Struktur der beiden GHS-R-Subtypen genauer zu charakterisieren und die Promotorregion zu identifizieren. Durch ein PCR-Poolscreening und nichtradioaktive Detektionsmethoden wurde eine menschliche genomische Plazenta-Genbank mit einer für beide Rezeptorsubtypen spezifischen DNS-Sonde untersucht. Ein gemeinsamer positiver Klon von 18kb konnte detektiert werden, so dass Sequenzierungs- und Trans-fektionsexperimente angeschlossen werden konnten.

Das den GHS-R kodierende Gen zeigte sich ca. 4,1 kb groß. Typ 1a ist von zwei Exons kodiert, der kürzere Typ 1b dagegen nur von einem Exon. Die Transkriptionsfaktorbindungsstelle zeigte sich an Position -227 der 5'-flankierenden Region.

Zur Untersuchung transkriptional aktiver Elemente wurden ca. 2 kb der 5'-flankierenden Region sequenziert. Die transkriptionale Regulation wurde durch Transfektionsexperimente in GH4-Rattenhypophysenzelllinien untersucht, indem Promotorkonstrukte mit Größen von 168 bp bis 1745 bp verwendet wurden.

So sollte ein Beitrag zum besseren Verständnis der komplexen Regulationsmechanismen von Wachstumshormon in der Hypophyse geleistet werden.

7. Literaturverzeichnis

Bücher:

Sambrook, Fritsch, Maniatis „Molecular Cloning, A Laboratory Manual“ 1-3,

2. Edition, CSH

Schettler / Greten „Innere Medizin“, 9. Aufl. 1998, Thieme

Watson, Gilmann, Witkowski, Zoller „Rekombinierte DNA“, 2.Aufl., Spektrum

Originalarbeiten:

Arvat et al. „Corticotropin-Releasing Effect of Hexarelin, a Peptidyl GH Secretagogue, in normal Subjects pretreated with a Glucocorticoid Receptor Antagonist, and in Patients with Addison`s disease" *Neuroendocrinology* 70:200-6, 1999

C.Y.Bowers „Growth hormone-releasing peptide (GHRP)“, *CML* 5.54 (1998)

Nargund R.P. et al. „Peptidomimetic Growth Hormone Secretagogues. Design Considerations and Therapeutic Potential“, *J Med Chemistry* 41; 17, 3103-27, 1998

Borges et al. „Different effects of growth hormone releasing peptide (GHRP-6) and GH-releasing hormone on GH release in endogenous and exogenous hypercortisolism" *Clin Endocrinol (Oxf)* 46:585-89, 1997

Bowers C.Y. et al. „On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone“ *Endocrinology* 114: 1537-45, 1984

Casanueva et al. „Role of the New Growth Hormone-Releasing Secretagogues in the Diagnosis of Some Hypothalamopituitary Pathologies“, *Metabolism* 45: 123-26, 1996

Codd E.E. et al. „Binding of a growth hormone-releasing hexapeptide to specific hypothalamic and pituitary sites“ *Neuropharmacology* 28: 1139-44, 1989

De Keyser et al. „Widespread transcription of the growth hormone-releasing peptide receptor gene in neuroendocrine human tumors“ *Eur J Endocrinol* 137:715-8, 1997

Dieguez / Casanueva „Ghrelin: a step forward in the understanding of somatotroph pulsatile GH secretion in normal men“ *J clin Endocrinol Metab* 77: 1641-47, 1993
cell function and growth regulation“ *Eur J Endocrinol* 142:413-417, 2000

Gertz et al. „L-692,429, a nonpeptide growth hormone secretagogue, reverses glucocorticoid suppression of Gh secretion“ *J Clin Endocrinol Metab* 79:745-9, 1994

Giustina et al. „Comparison of the effects of growth hormone-releasing hormone and hexarelin on growth hormone secretion in humans with or without glucocorticoid excess“ *J Endocrinol* 146:227-32, 1995

Ghigo / Arvat / Camanni „Orally active growth hormone secretagogues: state of the art and clinical perspectives“, *Ann Med* 1998; 30: 159-68

Ghigo et al. „ Effects of recombinant human IGF-I administration on GH secretion, both spontaneous and stimulated by GH-releasing hormone or hexarelin, a peptidyl GH secretagogue, in humans“, *J Clin Endocrinol Metab* 84:285-90, 1999

Hartmann et al. „Oral administration of growth hormone (GH-) releasing peptide stimulates GH secretion in normal men“, J Clin Endocrinol Metab 1992; 74: 1378-84

Hickey et al. „Mediation by the central nervous system is critical to the in vivo activity of the GH secretagogue L-692,585“, J Endocrinol 1996; 148: 371-80

Howard et al. „A Receptor in Pituitary and Hypothalamus That Functions in Growth Hormone Release“, Science Aug.1996; Vol.273

Jaffe et al. „Effects of a prolonged growth hormone-releasing peptide infusion on pulsatile GH secretion in normal men" J Clin Endocrinol Metab 77:1641-47, 1993

Kaji et al. „Cloning and characterization of the 5' flanking region of the human growth hormone secretagogue receptor gene" J Biol Chem 273:33885-88, 1998

Kamegai et al. „Growth hormone-releasing hormone receptor (GHRH-R) and growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) mRNA levels during postnatal development in male and female rats“ J Neuroendocrinol 11:299-306, 1999

Kineman et al. „Growth hormone-releasing hormone (GHRH) and the GH secretagogue (GHS), L692,585, differentially modulate rat pituitary GHS receptor and GHRH receptor messenger ribonucleic acid levels“ Endocrinology 140: 3581-6, 1999

Kojima et al. „Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach“, Nature, Vol. 402: 656-60, Dec.1999

Korbonits / Grossmann „Growth Hormone Releasing Peptide and its Analogues“
TEM Vol.6, 1995

Korbonits et al. „Expression of the growth hormone secretagogue receptor in pituitary adenomas and other neuroendocrine tumors“ J Clin Endocrinol Metab 83:2997-3000, 1998

Korbonits et al. „The growth hormone secretagogue hexarelin stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis via arginine vasopressin“ J Clin Endocrinol Metab 84: 2140-50, 1999

Leal Cerro et al. „Inhibition of growth hormone release after the combined administration of GHRH and GHRP-6 in patients with Cushing`s syndrome" Clin Endocrinol Oxf 41:649-54, 1994

McKee et al. „Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors“ Mol Endocrinol 11:415-23, 1997

Meacham et al. „Preservation of growth hormone secretion in response to growth hormone-releasing peptide-2 during prednisone therapy" Metabolism 48:585-9, 1999

Muccioli et al. „Specific receptors for synthetic GH secretagogues in the human brain and pituitary gland“ J Endocrinol 157:99-106, 1998

Petersenn et al. „Structure and Regulation of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene“ Mol Endocrinol 12; 2: 233-47, 1998

Petersenn et al. „Genomic structure and transcriptional regulation of the human growth hormone secretagogue receptor“ , presented in part at the 81st Annual Meeting of The Endocrine Society in San Diego, 1999

Pimento-Filho et al. „Growth hormone responses to GH-releasing peptide (GHRP-6) in hypothyroidism“ Clin Endocrinol (Oxf) 46:295-300, 1997

Pinto et al. „Acute dexamethasone administration enhances GH responsiveness to GHRP-6 in man" Clin Endocrinol (Oxf) 51:409-14, 1999

Popovic et al. „Growth hormone secretagogues in pathological states: diagnostic implications“, Acta Paediatr Suppl 1997; 432: 97-101

Ramos-Dias et al. „Different growth hormone response to GH-releasing peptide and GH-releasing hormone in hyperthyroidism“ J Clin Endocrinol Metab 81:1343-6, 1996

Shah N. et al. „Tripartite neuroendocrine activation of the human growth hormone axis in women by continuous 24-hour GH-releasing peptide infusion. Pulsatile, entropic and nyctohemeral mechanisms“ J Clin Endocrinol Metab 84:2140-50, 1999

Smith RG et al. „Modulation of pulsatile GH release through a novel receptor in hypothalamus and pituitary gland“ Recent prog Horm Res 51: 261-85, 1996

Thomas et al. „Activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by Growth-Hormone Secretagogue GHRP-6 in rats“ Endocrinology 1997; 138: 1585-91

Yokote R. et al. „Molecular cloning and gene expression of growth hormone-releasing peptide receptor in rat tissues“ Peptides 19:15-20, 1998

Lebenslauf

Name: Martina Penschorn

Geburtsdatum: 22.08.1973

Geburtsort: Rotenburg / Wümme

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung: 1978-82 Grundschule Lünzen
1982-89 Kooperative Gesamtschule
Schneverdingen mit Sekundarstufe I
des Gymnasialzweiges
1989-92 Gymnasium Soltau
1992 Abitur

Studium der Medizin: 1992-99 Medizinische Fakultät der
Universität Hamburg
1996-99 Doktorandin am IHF an der
Universität Hamburg
07/ 1999 Drittes Staatsexamen
10/ 1999- 03/ 2001 Ärztin im Praktikum, Abt.
für Innere Medizin des KH Soltau

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H.M. Schulte danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. F.A. Leidenberger möchte ich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die ich am Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung angetroffen habe, danken.

Meinen besonderen Dank an Herrn PD Dr. med. Stephan Petersenn für seine fortwährende und geduldige Unterstützung, sowie für seine optimistische Begeisterung für dieses Thema.

Auch den Mitgliedern des IHF, insbesondere der AG Petersenn, gilt mein Dank für das herzliche Willkommen und für den Beistand mit Rat und Tat während meiner Zeit am Institut.