Aus der Universitäts-Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer
Sektion Pädiatrische Endokrinologie
Leiter: Professor Dr. M. B. Ranke

Polymorphismen der Promotorregion des Wachstumshormongens bei familiärem Kleinwuchs

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen
vorgelegt von

Lampros Kampouridis

aus

Bad Urach

2002

Dekan :	Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter:	Professor Dr. M. B. Ranke
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. G. Binder

gewidmet

meinem verstorbenen Cousin
und Kollegen

Dr. med. Georgios D. Papadopoulos

αφιερωμένο στον ξάδελφο και συνάδελφο

Γεώργιο Παπαδόπουλο του Δημητρίου

† 2002

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 1

1.1 Historische und gesellschaftliche Aspekte der Körpergröße 1

1.2 Kleinwuchs 1
1.2.1 Definition 3
1.2.2 Ätiologie 4
1.2.3 Kleinwuchs als Normvariante 6

1.3 Wachstumshormon (WH) - Mangel 7
1.3.1 Das Wachstumshormon (WH) und seine neuroendokrine Regulation 7
1.3.2 Physiologische Effekte des WHs 8
1.3.3 Regelkreis der WH-Sekretion 8
1.3.4 Ätiologie des WH – Mangels 10
1.3.5 Diagnostisches Vorgehen bei WH-Mangel 12

1.4 Der WH-Genlokus 14
1.4.1 Promotor des hGH-1-Gens und Regulation der Transkription 14

1.5 Motivation und Problemstellung 15

2 MATERIAL UND METHODEN 19

2.1 Probanden- und Kontrollkollektiv 19

2.2 Material 21
2.2.1 Geräte 21
2.2.2 Verbrauchsartikel 21
2.2.3 Reagenzien 22

2.3 Methoden 24
2.3.1 DNA – Extraktion aus Lymphozyten 24
2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) 27
2.3.3 Gelelektrophorese 33
2.3.4 SSCP (single strand conformational polymorphism) 34
2.3.5 DNA- Sequenzierung 38
2.3.6 Restriktionsverdau 43

3 ERGEBNISSE 46

3.1 DNA – Extraktion 46

3.2 DNA – Amplifikation (PCR) **46**

3.3 SSCP – Analyse **51**

3.4 Sequenzierergebnisse **54**

3.5 Restriktionsverdau **59**

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse **61**

4 DISKUSSION **63**

4.1 Diskussion der Ergebnisse **63**

4.2 Zukunftsperspektiven **66**

4.3 SSCP: eine sensitive Methode zur Detektion von Mutationen **68**

4.4 Zusammenfassung der Diskussion **68**

5 ZUSAMMENFASSUNG **70**

6 LITERATUR **72**

Anlage 1: F14 HGH LCR **81**

Anlage 2: altersspezifische Normwerte für IGF-I und IGFBP-3 im Serum **82**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AGS	=	adrenogenitales Syndrom
BA	=	bone age
bp	=	Basenpaar
(c)DNA	=	(copy) Desoxyribonucleinacid
ddNTP	=	Didesoxynukleotid
gDNA	=	genomic Desoxyribonucleinacid
GHRH	=	growth hormone releasing hormone
GHRIH	=	growth hormone release inhibiting hormone
hCS-A	=	human chorionic somatomammotropin gene A
hCS-B	=	human chorionic somatomammotropin gene B
hCS-L	=	human chorionic somatomammotropin like gene
hGH	=	human growth hormone
hGH-V	=	human growth hormone variant gene
IGF-I	=	insulin-like growth factor I
IGFBP-3	=	insulin-like growth factor binding protein 3
IGHD	=	isolated growth hormone deficiency
KEV	=	konstitutionelle Entwicklungsverzögerung
LCR	=	locus control region
PAGE	=	Polyacrylamidelektrophorese
PCR	=	polymerase chain reaction
SDS	=	standart deviation score
SSCP	=	single strand conformational polymorphism
SW	=	Spannweite
UTS	=	Ullrich-Turner-Syndrom
WH	=	Wachstumshormon

Kapitel 1

1 Einleitung

1.1 Historische und gesellschaftliche Aspekte der Körpergröße

Schon immer interessierten Körpergröße und die Beobachtung des Wachstums die Menschheit.

Angefangen mit Solon im antiken Griechenland über den Grafen Montbeillard (Tanner JM, 1981) im 18. Jahrhundert setzt sich die Beobachtung und Erforschung des menschlichen Wachstums bis heute fort (Tanner et al., 1966; Tanner JM, Whitehouse RH, 1976; Tanner JM, Davies PSW, 1985).

Die Körpergröße spielt nicht nur in physischer, sondern auch in psychischer Hinsicht eine wichtige Rolle. Vor allem in der Pubertät hat die regelrechte physische Entwicklung für die Integration eines Heranwachsenden in einer Gruppe eine bedeutende Stellung. In der Gesellschaft wird häufig noch „groß“ mit Macht und Stärke assoziiert. Hingegen wird „klein“ eher als etwas Negatives oder Minderwertiges angesehen. Zum Glück beweist uns die Geschichte, dass oft das Gegenteil der Fall ist. Ein schönes Beispiel aus der Bibel ist das Duell zwischen David und Goliath.

1.2 Kleinwuchs

Wachstum ist ein die morphologische und funktionelle Entwicklung des Organismus begleitender Prozess der Größenzunahme, welcher seinen Abschluss nach der Adoleszenz findet. Die seit der systematischen Messung von Kindern und Jugendlichen in vielen europäischen Ländern dokumentierte Zunahme der Körpergröße in allen Altersstufen (säkularer Wachstumstrend), reflektiert die bessere Ausschöpfung des genetischen Wachstumspotentials durch günstigere äußere Bedingungen (z.B. Ernährung, Hygiene, Gesundheit). Im Durchschnitt dauert heute der Wachstumsprozess für Mädchen etwa 16 und für Jungen etwa 18 Jahre (+/- 2 J.). Der positive säkulare Wachstumstrend, welcher durch eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit zu einer größeren Körperhöhe in jedem Lebensalter geführt hat, geht auch mit einem größeren Tempo des Wachstums einher.

Abweichungen von dem normalen zeitlichen Rahmen, insbesondere Beginn und Dauer der Pubertät, können die Erwachsenengröße beeinflussen.

Die Pubertät beginnt bei Jungen etwa mit 11 Jahren, bei Mädchen ein Jahr früher (Normbereich:+/- 2 Jahre). Der Anteil des pubertätsspezifischen Wachstums ist beim Jungen etwa 7 cm größer als beim Mädchen. Er ist bei beiden Geschlechtern weitgehend unabhängig vom Zeitpunkt des Pubertätsbeginns. Für das Erreichen der Zielgröße ist ein Pubertätswachstumsspurt nicht nötig, da die Pubertät lediglich das Wachstumstempo beeinflusst (beschleunigt). Da die Sexualhormone, vorrangig Östradiol, zu einem Epiphysenschluss führen, signalisiert der Pubertätsbeginn auch immer das bevorstehende Ende des Wachstums.

Wachstum ist ein multifaktorielles Geschehen. Es steht sowohl unter dem Einfluss verschiedener Gene als auch unter dem der Umwelt (Ernährung, Betreuung des Kindes etc.).

Die genetische Komponente der menschlichen Körpergröße wird auf 50-90% geschätzt. Viele unbekannte Gene sind dabei involviert. Mutationen dieser Gene können zur Folge haben, dass die Produktion und / oder Sekretion vieler Proteinen, welche an der Regulation der Körpergröße beteiligt sind, beeinflusst werden. Ein Vertreter dieser Gene ist das menschliche Wachstumshormongen (hGH-1).

Das differentialdiagnostische Vorgehen beim Kleinwuchs erfordert neben einer ausführlichen Anamnese und anthropometrischen Messungen immer eine komplette klinische Untersuchung. Dabei ist Pubertätsmerkmalen eine besondere Aufmerksamkeit zu widmen. Wachstum ist ein Symptom. Beim Kleinwuchs ist vermindertes Wachstum das Leitsymptom.

Allgemeine Laboruntersuchungen decken okkulte organische oder systemische Störungen auf. Die Zöliakie, die nicht selten als Wachstumsstörung maskiert ist, kann durch Bestimmung spezifischer Laborparameter (Endomysium-, Gliadin-, Transglutaminase-antikörper) diagnostiziert werden. Normale TSH, fT3 und fT4 Werte im Serum schließen eine Hypothyreose aus. Erhöhte Gonadotropine im Blut weisen auf eine Störung mit primärem Hypogonadismus hin. Ebenso ist ein Wachstumshormonmangel unwahrscheinlich, wenn IGF-I und IGFBP-3 im Serum normal sind.

Des weiteren gehört zur Diagnostik die Röntgenaufnahme der (ganzen) linken Hand, welche zur Bestimmung des sogenannten Knochenalters dient. Humangenetische Untersuchungen

und molekulargenetische Techniken sind bei Verdacht auf genetisch bedingte syndromalen Kleinwuchsformen indiziert. Bildgebende Verfahren (CT,MRI) ergänzen die Diagnostik (Ranke MB, 2001).

Zur Diagnosestellung einer Wachstumsstörung kommt die Bestimmung des IGF-I-Wertes (Insulin-like growth Faktor I) als Screeningverfahren zum Einsatz (Clemmons DR and Van Wyk JJ, 1984; Rosenfeld RG et al., 1986; Blum WF, 1992). IGF-I ist ein einkettiges basisches Peptid (70 Aminosäuren), welches dem Proinsulin sehr ähnlich ist. Das WH-abhängige IGF-I stammt hauptsächlich aus der Leber. Es wird jedoch auch in vielen anderen Geweben gebildet. Da die circadianen Schwankungen der IGF-I-Werte gering zu sein scheinen, reicht die einmalige Messung, um einen Mangel nachzuweisen. Die meisten zirkulierenden IGFs binden an spezielle Bindungsproteine (IGFBP-1 bis –6); die vorherrschende Form im Blut ist die des IGFBP-3 (Drop SLS, 1992). Außerdem ist bekannt, dass IGFBP-3 ein weiterer Parameter zur Diagnosestellung eines WH-Mangels ist (Blum et al., 1990). Neben verschiedenen Ursachen (z.B. Alter, Geschlecht, Nahrung, Schilddrüsenhormone, Leber- und Nierenfunktion), welche die Serumwerte von IGF-I und IGFBP-3 beeinflussen (Clemmons DR and Van Wyk JJ, 1984; Blum WF and Ranke MB, 1990), ist das Wachstumshormon der Hauptregulator beider Peptide. Dieser Zusammenhang wird belegt durch niedrige IGF-I und IGFBP-3 Werte bei Kindern mit Wachstumshormonmangel, welche nach Therapie mit rekombinanten WH ansteigen und durch hohe Werte bei Akromegalie, welche unter erfolgreicher Therapie wieder sinken (Blum WF and Ranke MB, 1990; Copeland KC et al., 1980; Jorgensen JOL et al., 1991; Clemmons DR, 1979).

1.2.1 Definition

Kleinwuchs liegt vor, wenn sich die Größe (Länge) eines Kindes bezogen auf Alter, Geschlecht und Ethnizität unter der 3. Perzentile befindet (Ranke; Wollmann, 1992). Dabei sollten, aufgrund des diskriminierenden Charakters, die Begriffe „Zwergwuchs“ und „Minderwuchs“ nicht mehr verwendet werden. Rechnerisch lässt sich eine Größenabweichung als SDS (standard deviation score) ausdrücken:

$$\textbf{SDS} = \frac{\text{Größe des Kindes – mittlere Größe für das Alter}}{\text{1 Standardabweichung für das Alter}}$$

Pathologisches Wachstum kann schon durch verlangsamte Wachstumsgeschwindigkeit bei noch normaler Größe zum Vorschein treten. Die Größe der Kinder wird bis zum 2. Lebensjahr im Liegen, danach im Stehen gemessen. Abgesehen von der Erhebung der Eigen- und Familienanamnese, welche Geburtslänge, Geburtsgewicht, postnatale Wachstumsentwicklung, Größe und Wachstumsentwicklung der Eltern beinhaltet, bedarf es oft einer individuellen weiterführenden Diagnostik (Abb. 1-2).

Zur Bestimmung der familiären Zielgröße, als Maß für die genetische Veranlagung, verwendet man folgende vereinfachte Formel :

$$\textbf{familiäre Zielgröße} = \left(\frac{\text{Größe des Vaters} + \text{Größe der Mutter}}{2}\right) \begin{matrix} - \text{ 6,5 cm für Töchter} \\ + \text{ 6,5 cm für Söhne} \end{matrix}$$

Zur Abklärung von Wachstumsstörungen müssen in der Regel auch das Gewicht, der Kopfumfang und Proportionsmessungen, insbesondere Sitzhöhe und Spannweite mit einbezogen werden. Sie können diagnostisch wegweisend sein. Moderne, populationsspezifische Normwerte sollten sowohl in Form von Perzentilenkurven als auch in Zahlentabellen vorliegen. Die Beurteilung des Wachstums muss auch immer die Pubertätsentwicklung berücksichtigen. Entweder klinisch (Stadien nach Tanner), durch Messungen z.B. des Hoden- bzw. des Ovarialvolumens oder durch Hormonbestimmungen im Blut (Testosteron, Östradiol etc.).

Zur Abschätzung unterschiedlicher Entwicklungstempi wird das sog. Knochenalter bestimmt, welches mittels Röntgen der (ganzen) linken Hand festgestellt werden kann. Das Knochenalter definiert den Reifezustand des Knochens. Am meisten wird das Verfahren nach Greulich und Pyle benutzt, bei dem die Röntgenbilder mit einem alterstypischen Standard verglichen werden. Beim moderneren Verfahren nach Tanner (Mark II) werden bestimmte ossäre Strukturen der Hand nach Größe und Form klassifiziert und dann in einen numerischen Wert transformiert („maturity score"), aus welchem das Knochenalter abgeleitet wird. Das Knochenalter hat eine gewisse natürliche Variabilität, und seine Bestimmung kann erheblichem subjektivem Irrtum unterliegen.

1.2.2 Ätiologie

Die Ätiologie des Kleinwuchses ist vielfältig und eine Einteilung in primären und sekundären Kleinwuchs oft schwierig (Tabelle 1-1). Bei pathologischen Wachstumsstörungen bestehen primär angelegte oder sekundär erworbene Veränderungen der Wachstumsregulation

und/ oder des wachsenden Gewebes. Nach klinischen Kriterien wird ein Kleinwuchs im Kindesalter danach untergliedert, ob die Wachstumsstörung bereits bei Geburt bestand oder nicht. Ferner wird unterschieden, ob die Körperproportionen normal sind oder ob eine Dysproportionierung vorliegt.

Kleinwuchs ist in den meisten Fällen (ca. $^2/_3$ der Fälle) keine Krankheit, sondern eine Normvariante. Krankhaft ist nur ein dauerhaft unzureichendes Wachstum, welches zu einem progredienten Kleinwuchs führt. Die Normvarianten können zu einer permanenten (familiärer Kleinwuchs) oder aber auch transitorischen (konstitutionelle Entwicklungsverzögerung) Größenabweichung führen. Die Ursachen dieser Größenabweichungen sind nicht bekannt, so dass es sich um Ausschlussdiagnosen handelt. Die Terminologie der normvarianten Wachstumsstörungen ist uneinheitlich. Als Arbeitsterminus wird der Begriff „idiopathischer" Kleinwuchs verwendet.

Ätiologie des Kleinwuchses

Primärer Kleinwuchs

- Normvarianten
  (idiopathischer Kleinwuchs)
  Zielgröße von Elterngröße bestimmt :
  - konst. Entwicklungsverzögerung
  - familiärer Kleinwuchs
- Chromosomale Anomalien
  - Down - Syndrom
  - Ullrich - Turner - Syndrom
- Kleinwuchs bei Syndromen
  - Silver - Russel - Syndrom
  - Prader - Willi - Labhart - Syndrom
- Skeletterkrankungen
  - Achondroplasie, Osteogenesis imperfecta
  - Skelettanomalien (Myelozele, Blockwirbel)
- Pränatale Störungen (intrauteriner KW)
  - Mangel-, Fehlernährung der Schwangeren
  - gestörte Funktion der Plazenta
  - toxische Substanzen (Alkohol, Nikotin, Drogen)
  - Infektionen

Sekundärer Kleinwuchs

- Mangel-, Fehlernährung
- Organerkrankungen und Stoffwechselleiden
  - Herzfehler
  - chron. Erkrankungen der Lunge, Niere etc.
  - Zöliakie
  - Diab. mellitus
  - Glykogenspeicherkrankheiten
- Psychosoziale Deprivation
- Endokrine/ hormonelle Störungen
  - Wachstumshormonmangel
  - Hypothyreose
  - Überschuss an Cortisol (Cushing-Syndrom)

Tabelle 1-1: Ätiologie des Kleinwuchses

1.2.3 Kleinwuchs als Normvariante

Minimalkriterien zur Feststellung einer Normvariante sind: normale Geburtsmaße, Proportionen, Ernährung, emotionale Situation, keine Organische Erkrankung und keine hormonelle Störungen. Das Tempo des Wachstums kann normal oder verzögert sein. Familiärer Kleinwuchs und konstitutionelle Entwicklungsverzögerung werden unter dem Begriff „idiopathischer" Kleinwuchs zusammengefasst.

Liegt die Körpergröße für die Population außerhalb des Altersnormbereichs jedoch innerhalb des familiären Zielbereichs, spricht man vom „familiären Kleinwuchs". Diese Patienten zeigen als einziges auffälliges Merkmal die geringe Körpergröße auf. Sie befindet sich unterhalb der 3. Perzentile der Gesamtbevölkerung. Das Knochenalter liegt oberhalb der 10. Perzentile. Der Pubertätsbeginn ist zeitgerecht. Die Wachstumsgeschwindigkeit liegt oberhalb der 25. Perzentile (Ranke MB, 1989). Die Eltern (mind. ein Elternteil) sind ebenfalls kleinwüchsig.

Tempovarianten des Wachstums (konstitutionelle Entwicklungsverzögerung), bei denen die Größe von der Population und dem familiären Zielbereich abweicht, können nur dann sicher definiert werden, wenn Pubertätsmerkmale nicht altersgemäß in Erscheinung treten. Vor dem Pubertätsalter sind diese Diagnosen nach Ausschluss anderer Ursachen lediglich zu vermuten, so dass richtigerweise nur vom „nicht-familiären idiopathischen Kleinwuchs" gesprochen werden kann.

Die KEV ist die häufigste Entwicklungsvariante im Kindesalter. In 60-80% existieren Verwandte ersten Grades (Eltern, Geschwister) mit positiver Anamnese (Bierich JR, 1975; Ranke MB et al., 1982). Es kommt zur Retardierung von Größenwachstum und Skelettreifung (Ranke MB, 1989). Die Größe und das Knochenalter befinden sich unterhalb der 10. Perzentile. Größen- und Knochenalter korrelieren gut miteinander (Bierich JR, 1972). Durch die enge statistische Beziehung zwischen Skelettreifung und sexueller Reifung (Gupta D, 1970; Marshall WA, 1975) kommt es charakteristischerweise zum verspäteten Pubertätsbeginn (♂>14. LJ.; ♀ >12. LJ.). Die Wachstumsgeschwindigkeit liegt oberhalb der 25. Perzentile (Ranke MB, 1989). Die Endgröße wird zwei bis vier Jahre später erreicht. Sie bleibt gewöhnlich im unteren Durchschnitt und entspricht im Mittel der 10. Perzentile in der Gesamtbevölkerung.

1.3 Wachstumshormon (WH) - Mangel

WH ist für das postnatale Wachstum verantwortlich (Binder G, Ranke MB, 1995). Wegweisend für die Diagnose WH-Mangelsyndrom ist die Konstellation aus (fast) normaler Geburtslänge, verminderter Wachstumsgeschwindigkeit, proportioniertem Kleinwuchs sowie retardiertem Knochenalter. Der WH-Mangel ist ein Spektrum von klinisch ähnlichen, jedoch ätiologisch und pathogenetisch unterschiedlichen Störungen. Er umfasst prä- und postnatale sowie hereditäre und nicht-hereditäre Störungen. Ist die Ätiologie nicht bekannt, spricht man vom idiopathischen WH-Mangel. Seine Häufigkeit wird auf 1 von 4-10.000 Lebendgeburten geschätzt (Vimpani GV et al., 1977). Bis zu 30% der Personen mit WH-Mangel haben einen Betroffenen in der Verwandtschaft (Tanner JM, 1972). Es überwiegt das männliche Geschlecht im Verhältnis 2:1.

1.3.1 Das Wachstumshormon (WH) und seine neuroendokrine Regulation

Das Wachstumshormon (WH), auch als Somatotropin bekannt, ist ein Peptidhormon, welches in den somatotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens produziert und sezerniert wird (Wallis M et al., 1985). Die spontane WH-Sekretion ist pulsativ. Die Sekretionsepisoden erfolgen alle 3 Stunden, am konstantesten ca. 60-90 Minuten nach Beginn des Schlafs. In der Regel wird mehr WH in der Schlafphase als während des Wachseins sezerniert. Die WH-Sekretion ist im Säuglingsalter und in der Pubertät am höchsten. Im Erwachsenenalter sinkt die WH-Sekretion bis ins Senium hin ab. Das WH besteht aus 191 Aminosäuren, enthält zwei Disulfidbrücken und ein Molekulargewicht von 22 KD(Abbildung 1-1). Stimuliert wird seine Ausschüttung durch GHRH, ein Peptidhormon aus 44 Aminosäuren.

Abbildung 1-1: Sekundärstruktur des Wachstumshormons

GHRH wird im Hypothalamus gebildet und gelangt auf dem Blutweg in die Hypophyse (Ranke MB, 1989; Ranke MB, Haber P, 1993; Rosskamp R, 1988). Seine Sekretion erfolgt wie die des WH pulsativ und erreicht ihr Maximum während des Schlafes (Ranke MB, Bierich JR, 1987; Tanner JM, 1988). WH hat Ähnlichkeit mit dem hypophysärem Prolaktin. Die Primärstruktur des WH hat eine sehr große Analogie mit dem humanen plazentaren Laktogen (Sherwood LM, 1967).

1.3.2 Physiologische Effekte des WHs

WH hat verschiedene Effekte auf den menschlichen Organismus. WH beeinflusst den Protein-, Kohlenhydrat- und den Lipidstoffwechsel. Die Wirkungen auf den Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel können insulinähnlich oder diabetogen sein (Davidson MB, 1987). Außerdem wirkt es beim Knorpel- und Knochenstoffwechsel mit. Weitere Effekte sind die Proliferation und Differenzierung vieler Zelltypen, wie z.B. Prä-adipozyten, Muskel-, Pankreas-B-Zellen, Lymphozyten und Zellen hämatopoetischer Vorstufen (Isaksson OGP et al., 1985; Wallis M, 1988). Viele dieser Effekte sind nicht direkt, sondern werden durch „Insulin-like growth factor I“ IGF-I vermittelt (Preece MA, Holder AT, 1982).

1.3.3 Regelkreis der WH-Sekretion

Die Synthese und Sekretion von WH wird durch die Balance zwischen growth hormone releasing hormone (GHRH) und growth hormone release inhibiting hormone (GHRIH, Synonym: Somatostatin) gesteuert (Abbildung 1-2). Die Produktion beider hypothalamischer Hormone wird durch äußere und innere Faktoren bestimmt und über Neurotransmitter gesteuert. Sie erreichen über das portale Gefäßsystem die Hypophyse und regulieren die Produktion und Sekretion des WH (Wallis, 1988). GHRH bindet an einen spezifischen G-Protein gekoppelten Rezeptor an der Zelloberfläche und bewirkt über eine cAMP vermittelte Signalkaskade eine Steigerung der WH-Produktion und –Sekretion. Durch GHRIH wird diese gehemmt. Dieser hypothalamisch-hypophysäre Rückkoppelungsmechanismus wird als „short-loop“ bezeichnet. Das aus der Hypophyse sezernierte WH wirkt, nach Bindung an einen spezifischen membrangebundenen Rezeptor und nach Induktion einer intrazellulären Signalkaskade, direkt auf Proliferation, Differenzierung und Metabolismus. WH stimuliert die Synthese der IGFs in der Leber (Jefferson LS et al., 1972), durch welche indirekt der Effekt des WHs auf das Endorgan vermittelt wird. Die IGF-I Konzentration im Blut hängt sowohl vom WH als auch von nutritiven Faktoren und der Leberfunktion ab.

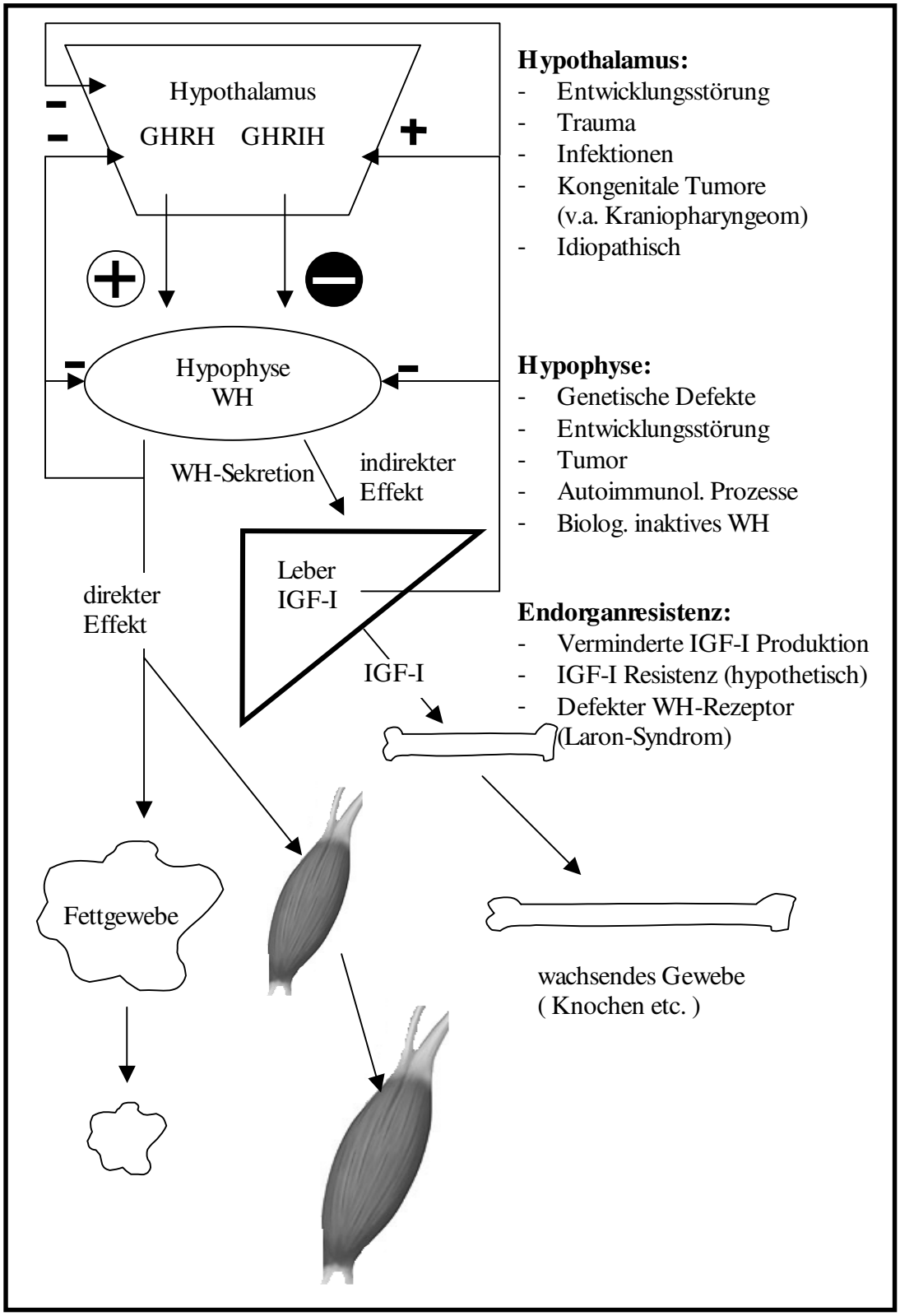


Abbildung 1-2: Neuroendokriner Regelkreis und Ätiologie der Störung der WH-Achse
(✚ = stimuliert, ▬ = hemmt)

IGF-I Konzentrationen in der Zirkulation und die Sekretion des WHs stehen in einem Rückkoppelungsverhältnis zueinander („feed-back"). Man kann sich nun vorstellen, dass in jedem dieser Abläufe ein Defekt vorliegen könnte, durch welchen die Regulation der WH-Sekretion gestört werden würde. Mögliche Defekte auf den drei Hauptebenen der Wachstumsregulation sollen durch diese Abbildung demonstriert werden (Abb. 1-2).

1.3.4 Ätiologie des WH – Mangels

Defekte des Wachstums auf den Ebenen WH, IGF-System und Endorgan, kann man auf unterschiedliche Arten klassifizieren (Laron Z, 1983; Underwood LE, van Wyk JJ, 1985; Mac Gillivray MH, 1986;Brook CGD et al., 1986). Der größte Anteil des WH-Mangels ist idiopathisch. Der Anteil aus der Steißlage entbundener Kinder ist sehr hoch. Moderne bildgebende Verfahren zeigen bei Kindern mit schwerem isolierten WH-Mangel häufig Strukturabweichungen der Hypophyse. Tumore der Rathke-Tasche oder der Hypophyse und seltene angeborene anatomische Störungen der Hypothalamus- bzw. Hypophysenanlage können mittels MRT ausgeschlossen werden. Im Kindesalter sind Kraniopharyngeome und Dysgerminome die häufigsten Ursachen.

Ursachen des WH - Mangels	
A angeborener WH-Mangel	B erworbener WH-Mangel
• idiopathisch • embryonale Defekte • BIG • neurosekretorische Defekte	• idiopathisch • neurosekretorische Defekte • ZNS-Tumore (insb. Kraniopharyngeom) • Traumata: perinataler Insult Kindsmisshandlung Unfall • Infektionskrankheiten • autoimmun • Bestrahlungsschaden • vaskuläre Läsionen • hämatologischer Genese

Tabelle 1-2: Klassifikation des WH-Mangels nach MacGillivray; BIG = bioinaktives WH

Durch Bestrahlungen des ZNS (ca. > 20 Gy) kann die WH-Sekretion (ohne anatomisch feststellbare Veränderungen des Hypothalamus und Hypophyse) vermindert sein. Traumata,

granulomatöse Erkrankungen und Infektionen kommen als Ursache seltener vor. Beim biologisch inaktiven WH handelt es sich um eine funktionelle Störung bei immunologisch normalem WH (inaktiv). Angeborene, genetisch bedingte Formen der WH-Resistenz sind durch eine primäre Störung der IGF-Synthese bzw. –Wirkung bedingt. Das Laron-Syndrom ist durch einen genetischen Rezeptordefekt gekennzeichnet (Tabelle 1-3).

Mögliche Defekte mit WH-Mangel-ähnlichen Symptomen	
A. niedrige IGF-1 Konzentrationen	B. normale oder hohe IGF-1 Konzentrationen
➢ abnorme WH-Struktur	➢ abnormes IGF-1
➢ WH-Rezeptor-Defekte (Laron Syndrom) a) Bindungsdefekt b) Defekt nach der Bindung	➢ IGF-BP-Hemmung der IGF-1 Wirkung a) im Serum b) am Gewebe
➢ Präsenz von WH-Antikörper	➢ IGF-Rezeptor-Defekt a) Bindungsdefekt b) Defekt nach der Bindung

Tabelle 1-3 : WH-Mangel-ähnliche Symptome anderer Ätiologie (Daughaday WH, 1992); IGF = insulin-like-growth-factor; IGF-BP = IGF-Bindungsprotein

Des weiteren können als Ursache des WH-Mangels genetische Defekte mit isoliertem Ausfall bzw. Verminderung der WH-Produktion verantwortlich sein. Diese erblichen Formen des WH-Mangels werden in Tabelle 1-4 dargestellt. Sie haben einen geschätzten Anteil von nur ca. 5 % des hypophysären Kleinwuchses. Bei der autosomal - rezessiv vererbten Form (Typ IA) liegt eine komplette Deletion des GH-1-Gens vor. Diese Patienten haben überhaupt kein WH und entwickeln unter der Therapie mit WH rasch Anti-WH-Antikörper. Beim Typ III besteht außer einem WH-Mangel noch eine Hypogammaglobulinämie.

IGHD	Erbmodus	Hormondefekt
I A	autosomal - rezessiv	kein WH vorhanden
I B	autosomal - rezessiv	WH vermindert
II	autosomal - dominant	WH vermindert
III	x - chromosomal	WH vermindert

Tabelle 1-4: erbliche Formen des hypophysären Kleinwuchses; IGHD = isolierter WH-Mangel

Mutationen des hypophysenspezifischen Transkriptionsfaktors Pit-1, welcher bedeutsam für die Hypophysenentwicklung ist, führen zu einer Kombination aus WH-, TSH- und Prolaktinmangel vor (Pfäffle RW et al., 1996).

1.3.5 Diagnostisches Vorgehen bei WH-Mangel

Wie bei diversen Krankheitssymptomen, gibt es auch beim Kleinwuchs diagnostische Strategien bzw. Algorithmen (Abbildung 1-3), welche die Diagnosestellung bzw. das Aufdecken der Ätiologie erleichtern sollen.

Beim absoluten WH-Mangel ist die Diagnosestellung meist unproblematisch. Schwieriger ist sie häufig bei einer lediglich verminderten WH-Sekretion. Die Labordiagnostik basiert zum einen auf Messungen der WH-abhängigen Faktoren (IGF-I und IGFBP-3), sowie zum anderen auf der Bestimmung des WHs. Da die spontane WH-Sekretion pulsativ ist, sind basale WH-Messungen nicht sinnvoll. Daher ist es erforderlich, das WH nach Stimulation zu messen (z.B. Insulin-induzierte Hypoglykämie, Arginin, Clonidin, L-Dopa). Die Diagnose WH-Mangel gilt als gesichert, wenn in zwei Stimulationstests die WH-Maxima unterhalb des Grenzwertes („cut-off") liegen. Der Grenzwert wird heute bei 10 µg/l angenommen. Des weiteren gibt es Patienten, welche eine erniedrigte spontane WH-Sekretion haben, jedoch eine normale WH-Sekretion (Maxima über dem Grenzwert) in Stimulationstests zeigen. Man spricht bei diesen Patienten von einer neurosekretorischen Dysregulation (NSD) (Ranke MB und Haber P, 1993).

Die Bestimmung der WH-abhängigen Faktoren IGF-I und IGFBP-3 hat für die Diagnostik des WH-Mangels an Bedeutung gewonnen (siehe Kapitel 1.2). Normale IGF-I / IGFBP-3 Werte (ca. 25. Perzentile der Altersnorm) schließen einen WH-Mangel aus. Aus Praktikabilitäts- und Kostengründen hat sich die Bestimmung von IGF-I und IGFBP-3 bewährt. Sie sollte am Anfang eines Algorithmus zur differentialdiagnostischen Abklärung eines WH-Mangels und seiner Varianten stehen.

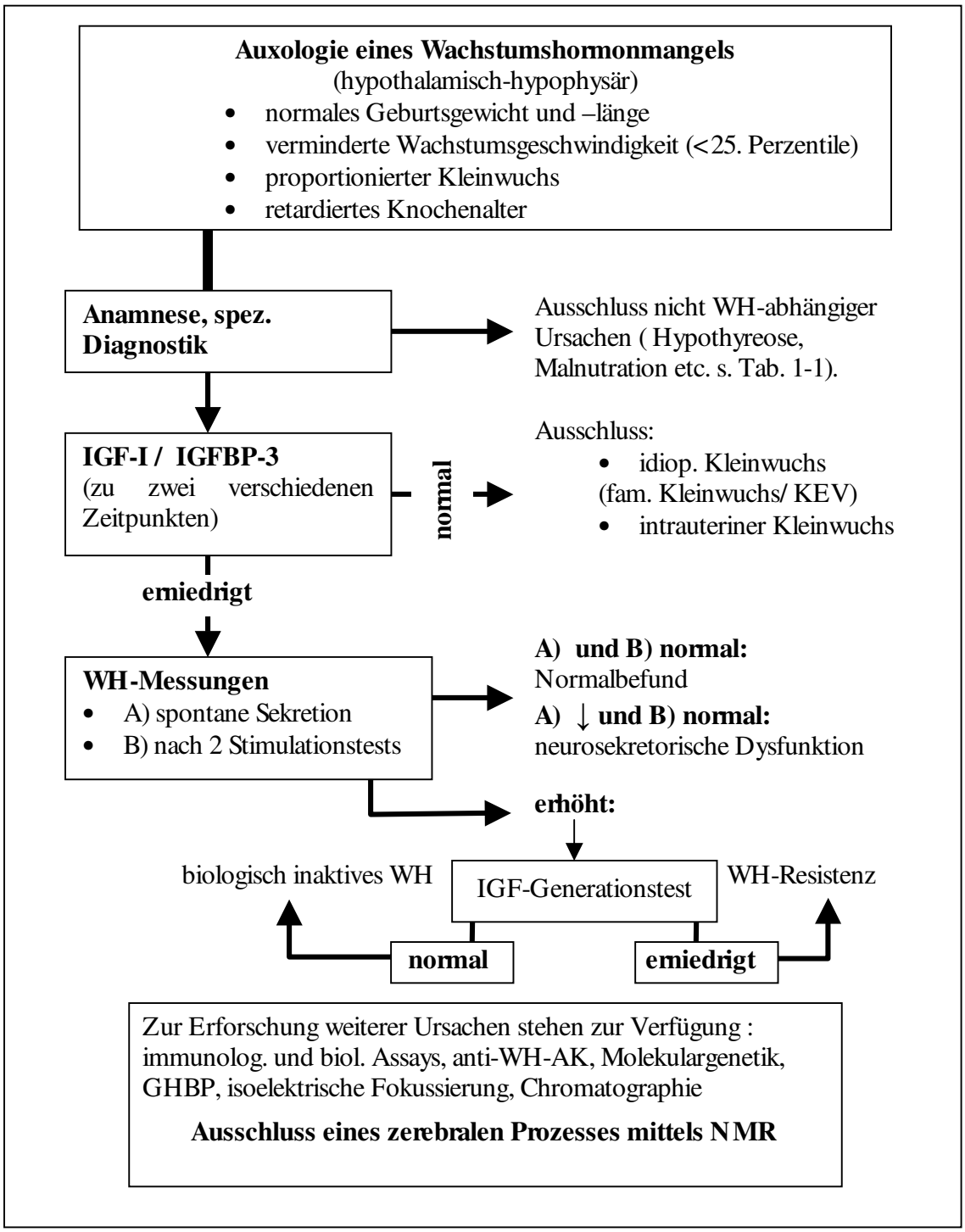


Abbildung 1-3: Diagnostisches Vorgehen beim Wachstumshormonmangelsyndrom (Ranke MB, 1999)

1.4 Der WH-Genlokus

Der hGH-Genkomplex befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 17, auf den Banden q22-24 (Owerbach D et al., 1980; Gerge DL et al., 1981). Er beinhaltet fünf Gene mit einer Länge von insgesamt 66 kb (Abbildung 1-4). Diese fünf Gene sind vollständig sequenziert und sind zu 91-99% sequenzhomolog (Seeburg PH , 1982; Barsh GS et al., 1983; Hirt H et al., 1987; Chen EY et al., 1989).

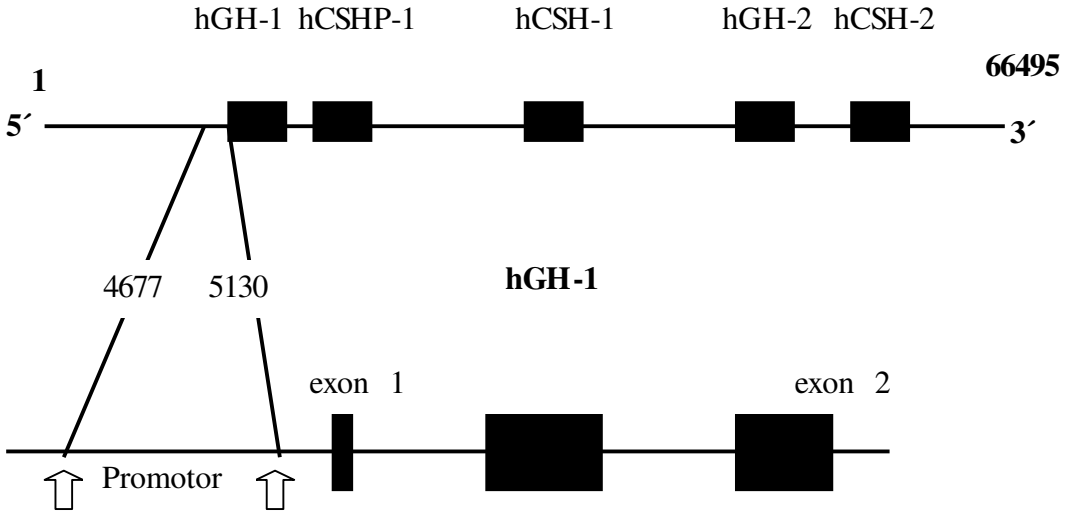


Abbildung 1-4: hGH - Genkomplex (oberes Schema, Vierecke stehen für die Gene); hGH 1-Gen (unteres Schema); die Lokalisation beruht auf der Nukleotidsequenz von Chen et al. (1989).

Trotz dieser hohen Sequenzhomologie, wird jedes Gen gewebsspezifisch exprimiert. In den somatotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens wird das hGH-1 und in den Synzytiotrophoblasten der Plazenta hGH-2, hCSH-1 und hCSH-2 exprimiert (Parks JS et al., 1989; Phillips III et al., 1995; Misra-Press A et al., 1994).

1.4.1 Promotor des hGH-1-Gens und Regulation der Transkription

Die Regulation der Transkription des hGH-1-Gens wird durch Interaktion gewebsspezifischer und anderer ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktoren (sog. trans-Faktoren) beeinflusst. Transkriptionsfaktoren sind im Zellkern vorkommende Proteine, die die Expression von Genen steuern. Sie binden an meist vor den Genen

gelegene Regulations-Sequenzen (sog. cis-Elemente), die in ihrer Gesamtheit als Promotor bezeichnet werden. Transkriptionsfaktoren bewirken, dass die RNA-Polymerase die Gene „abliest". Dabei wird die DNA in ein Botenmolekül, die messenger-RNA umgeschrieben, die dann - im Zytoplasma der Zelle - an den Ribosomen in Proteine „translatiert" wird. Transkriptionsfaktoren sind nicht nur für die Expression eines Gens, sondern für die eines ganzen Gen-Satzes verantwortlich. Verschiedene „cis-trans-Verbindungen" scheinen sowohl gewebespezifische Expression als auch Induktion oder Hemmung der Gentranskription zu erlauben. Sequenzveränderungen sowohl in trans-Faktoren als auch in cis-Elementen können die Ursache verminderter Transkriptionsaktivität in verschiedenen Genen sein (Theill LE and Karin , 1993).

Die Promotorregion, welche dem hGH-1-Gen vorgeschaltet ist, ist ungefähr 300 bp lang. Sie beinhaltet zwei cis-Elemente für den Hypophysen-spezifischen Transkriptionsfaktor Pit-1. Pit-1 bindet als Dimer an den zwei cis-Elementen des Promotors. Er ist essentiell für

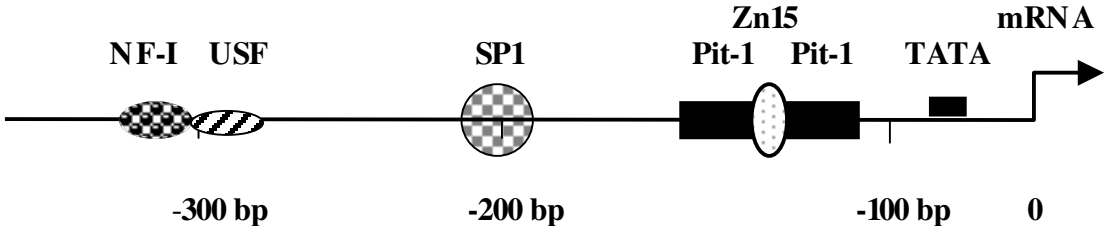


Abbildung 1-5: Transkriptionsfaktoren welche an den cis-Elementen des Promotors des hGH-1 bindet. Die Skalierung bezieht sich auf die Entfernung vom Transkriptionsbeginn.

die Expression des Wachstumshormons. Jedoch scheint Pit-1 allein nicht ausreichend für die Regulation der WH-Expression zu sein (Lira SA et.al., 1993). Des weiteren wurden cis-Elemente für ubiquitär vorkommende Transkriptionsfaktoren wie ZN-15, SP1, USF und NF-1 beschrieben (Abbildung 1-5). Die funktionelle Bedeutung dieser Regionen für die menschliche WH-Expression wurde jedoch bisher noch nicht untersucht.

1.5 Motivation und Problemstellung

Warum gibt es große und kleine Menschen? Warum haben die einen mehr und die anderen weniger Wachstumshormon?

Seit der Untersuchung von Blum WF et al.(1993) weiß man, dass kleine Kinder niedrige IGF-I und IGFBP-3 Werte und große Kinder hohe Werte im Serum haben. In dieser Studie wurde der Zusammenhang zwischen spontaner WH-Sekretion und IGF-I bzw. IGFBP-3 Serumwerte erforscht. Untersucht wurden 114 gesunde Kinder. Ausgeschlossen wurden organische Erkrankungen, sowie andere Hormonstörungen und Zöliakie. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Kinder mit isoliertem WH-Mangel. Es zeigte sich, dass die Serumwerte von IGF-I und IGFBP-3 die spontane WH-Ausschüttung in gesunden Kindern widerspiegeln. Außerdem wurde belegt, dass IGF-I-Werte auf die WH-Ausschüttung empfindlicher reagieren als IGFBP-3-Werte. Es wird postuliert, dass diese Empfindlichkeit an der unterschiedlichen Kinetik beider Peptide liegt (Blum WF et al., 1990; Jorgensen JOL et al., 1991; Blum and Ranke, 1990; Blethen SL et al., 1982). Des weiteren wurde in der Pubertät ein Anstieg der Sensitivität der IGF-I-Regulation durch das WH im Vergleich zum präpubertären Stadium beschrieben. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass eine große Anzahl der kleinen Kinder IGF-I Werte unter der 5. Perzentile (altersbezogen) und große Kinder hohe IGF-I-Werte hatten. Die meisten Kinder hatten IGFBP-3 Werte, welche im Normbereich zwischen der 5. und 95. Perzentile lagen. Jedoch hatten kleine Kinder niedrige und große Kinder hohe IGFBP-3 Werte. Diese Tatsache trägt zum besseren Verständnis der Variabilität der Körpergröße in einer gesunden Bevölkerung bei. Die gute Reproduzierbarkeit der IGFBP-3 Werte in Wiederholungstests macht dieses Peptid zu einen interessanten Parameter zur Beurteilung der WH-IGF-Achse.
In diesem Zusammenhang wollten wir mit unserer Studie folgende Fragen klären:

Welche Ursache hat die geringe Körpergröße beim familiären Kleinwuchs?

Wieso haben die einen mehr und die anderen weniger Wachstumshormon?

Kodierende Regionen und Introns des hGH-1-Genes wurden in der Vergangenheit schon intensiv untersucht. Zu Studienbeginn lag noch keine Arbeit vor, welche die Promotorregion des hGH-1-Genes systematisch auf Mutationen untersucht hatte. Diese Region ist für die Regulation der Transkription verantwortlich und beinhaltet sog. cis-Elemente, an welche die verschiedenen trans-Faktoren (NF-I, SP1, Pit-1 und Zn15) binden (siehe Kapitel 1.4.1). Genetische Veränderungen in dieser Region könnten die Transkriptionsaktivität und damit die Produktion des Wachstumshormons beeinflussen.

Promotor und Krankheit:

Promotorstudien gewinnen immer mehr an Bedeutung und es gibt zahlreiche Studien, welche sich mit ähnlichen Fragestellungen beschäftigten. Ein Beispiel dafür ist die verminderte corticotropin-releasing-hormone-(CRH)-Produktion bei Patienten mit rheumatoider Arthritis. Der Polymorphismus (T→C) an Position 2942 der Promotorregion des CRH-Gens führt zur Veränderung der spezifischen Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors GH-CSE2. Dieser Basenaustausch kann für die verminderte CRH-Produktion bei rheumatoider Arthritis verantwortlich sein (Baerwald CG et al.,1997). Des weiteren ist der Einfluss der Promotorregion (Promotor-Element-1) des Angiotensinogen -Gens(AGTE1) beschrieben, welche die Transkription des Angiotensinogens reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass der Haplotyp C-18 T im AGTE1 einen genetischen Risikofaktor für essentielle Hypertonie in der japanischen Bevölkerung darstellt (Sato N et al.,1997). In einer weiteren Studie (Pojoga L et al., 1998) wurde der Zusammenhang zwischen Polymorphismen der Promotorregion des Aldosterongens und deren Auswirkung auf den Plasma-Aldosteronspiegel bei Patienten mit essentieller Hypertonie untersucht. Es wurde ein Polymorphismus in der Promotorregion (T-344C) und einer im 7. Exon des Aldosteron-Synthase-Gens beschrieben. Die Präsenz des Allels –344C war mit erhöhten Aldosteronwerten assoziiert (90+/-8 pg/ml für den Haplotyp T/T; 110+/-6 pg/ml für den Haplotyp T/C; 129+/-10 pg/ml für den Haplotyp C/C). In der Arbeit von Leviev I. und James RW. (2000), wurde der Zusammenhang zwischen Promotorpolymorphismen des humanen Paraoxonase (PON I) Gens und der Aktivität bzw. der Konzentration dieses Enzyms gezeigt. Es wurden 3 Polymorphismen detektiert (C-107T; A-824G;C-907G). Dabei zeigte sich, dass die Variante –107 C eine etwa doppelt so hohe Aktivität wie die Variante –107 T hatte. Die Variante –824 A wies eine etwa 1,7-fache Aktivität wie die Variante -824 G auf. Des weiteren waren die Varianten -107T/-824G/-907C mit niedrigen Serumwerten des Paraoxonase-Enzymes und die Varianten -107C/-824A/-907G mit höheren Werten assoziiert.

Neuere Studien beschäftigen sich weiterhin mit der Fragestellung, in wieweit Polymorphismen in der Promotorregion diverser Gene die Transkriptionsaktivität, die Affinität von Transkriptionsfaktoren und die Hormonsekretion beeinflussen (Morgan K et al., 2001; Le Van TD et al., 2001; Cattaneo M et al., 2001; Brophy VH et al., 2001; Forsberg L et al., 2001).

Unser Ziel war es die Promotorregion des hGH-1-Gens bei Probanden mit familiärem Kleinwuchs systematisch auf Mutationen zu analysieren. Dabei wollten wir untersuchen, ob bestimmte Polymorphismen in dieser Region existieren, vor allem in Regionen mit cis-Elementen, welche zur Folge haben könnten, dass Transkriptionsfaktoren nicht oder nicht gut binden können. Veränderungen in dieser, dem Wachstumshormongen vorgeschalteten Region, können unmittelbar die Expression vom Wachstumshormon steuern und indirekt das Wachstum beeinflussen.

Kapitel 2

2 Material und Methoden

2.1 Probanden- und Kontrollkollektiv

Die Einschlusskriterien der Promotorstudie bei familiärem Kleinwuchs waren: Körpergröße der Mutter < 155 cm und die des Vaters < 168 cm, die Körpergröße der Kinder sollte < -2 SDS betragen. Als Ausschlusskriterien wurden nicht kaukasische Abstammung und familiäre Erkrankungen, welche Kleinwuchs verursachen, definiert.

Untersucht wurde die Promotorregion acht kleinwüchsiger Kinder und ihrer kleinwüchsigen Eltern (8 Familien=23 Personen). Die Probanden wurden ambulant im Wachstumszentrum der Universität Tübingen betreut. Die durchschnittliche Größe der Mütter betrug -3.0 Größen SDS , die der Väter -1.8 Größen SDS und die der Kinder -3.1 Größen SDS. Es handelte sich also um ein Kollektiv extrem kleinwüchsiger Personen. Intrauterine Wachstumsverzögerung, klassischer WH-Mangel, Hypothyreose, organischer oder syndromaler Kleinwuchs und primäre Skeletterkrankungen wurden bei den Kindern ausgeschlossen.
Die IGF-I Werte der Kinder lagen zwischen 49 und 198 ng/ ml (-5.06 – (+)1.54 SDS), die IGFBP-3 Werte lagen zwischen 2123 und 3648 ng/ ml (-1.74 – (+)2.35 SDS). Das Durchschnittsalter Betrug 6.7 Jahre (2.5-10 Jahre). Das Knochenalter lag im Schnitt bei 5,7 Jahren. In Tabelle 2-1 sind die auxologischen Daten der Kinder und ihrer Eltern zusammengefasst.

Die Kontrollgruppe bestand aus insgesamt 60 Personen. Davon hatten 20 Personen ein adrenogenitales Syndrom (AGS) und 40 ein Ullrich-Turner-Syndrom (UTS). Beim adrenogenitalen Syndrom handelt es sich um einen Enzymdefekt in der Nebennierenrinde. Das Ullrich-Turner-Syndrom ist ein chromosomaler Defekt. Beide Erkrankungen gehen auch mit Kleinwuchs einher, jedoch liegt die Ursache nicht im Wachstumshormonmangel.

Für die Untersuchung der DNA lag eine Einverständniserklärung der Eltern vor.

Familie	Geschlecht	Alter (Jahre)	BA	Gewicht (kg)	SW (cm)	Sitzhöhe (cm)	IGFI/ BP3 (ng/ ml) (SDS)	Größe (cm) (SDS)	Größe (cm) Vater/ Mutter (SDS)	Geburtsmaße (cm/ kg/ cm)
1	w	4.0	3.5	13	89.1	52.2	149/ 2123 (1.09/ -0.27)	89.6 (-3.6)	166/ 142 (-1.8/ -3.8)	40/ 2920/ 47
2	w	11.7	8.8	23.5	122.9	66.9	100/ 2706 (-2.98/ -0.85)	122 (-3.8)	170/ 143 -1.2/ -3.7)	41/ 3200/ 50
3	w	2.5	-	10.7	-	-	73/ 2175 (-3.11/ -1.74)	81.7 (-3.3)	-/ 146 (-/ -3.1)	36/ 2200/ 43
4	m	10.0	8.0	20.2	127	66.5	90/ 3648 (-1.76/ 1.01)	123.4 (-2.7)	164/ 148 (-2.0/ -2.8)	39/ 2510/ 47
5	m	7.5	4.5	16.8	108.6	60.7	145/ 2792 (-0.43/ -0.37)	109.4 (-3.3)	164/ 153 (-1.9/ -3.0)	40/ 2790/ 49
6	m	5.5	4.0	17.8	107.4	56.0	49/ 3116 (-5.06/ -0.23)	102.0 (-2.5)	165/ 147 (-1.9/ -3.0)	42/ 3640/ 52
7	m	9.2	8.0	25.3	121	64.6	198/ 3648 (-2.83/ 1.01)	118.5 -2.9)	160/ 150 (-2.6/ -2.5)	-------
8	w	3.4	3.0	11.3	85.5	53.2	154/ 3627 (1.54/ 2.35)	90.9 (-2.2)	169/ 143 (-1.3/ -3.7)	36/ 1900/ 43
Durchschnitt		**6.7**	**5.7**				**108.5 / 2979.38 (-1.69 / 0.11)**	**104.7 (-3.1)**	**165.4/ 146.5 (-1.8/ -3.0)**	

Tabelle 2-1: Auxologische Daten der untersuchten Probanden und ihrer Eltern; BA = Knochenalter (bone-age), SW = Spannweite, Geburtsmaße (Kopfumfang/ Gewicht/ Körpergröße)

2.2 Material

2.2.1 Geräte

Beckman Ultrazentrifuge Modell L5 65B	Beckman Instruments GmbH, München, D
Cybertech CS1 (Datenverarbeitung)	Hitachi, Japan
Elektrophoresekammer	BioRad, München, D
Gel Blotting Papier GB 002	Schleicher & Schuell, Dassel, D
Geltrockner Modell 543	BioRad, München, D
Magnetrührer	Ika-Werk Staufen i. Br.
Membran Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim, D
PhastSystem™	Pharmacia Biotech
pH-Meter	WTW, Weilheim, D
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettierhilfe	Tecnomara, Zürich, CH
Quarzpräzisionsküvetten	Hellma
Sequenzierapparatur Model S2	Gibco BRL, Eggenstein, D
Spannungsgerät	Camag, CH
Spannungsgerät Model 9009	Gibco BRL, Eggenstein, D
Sterile Werkbank: Heraeus LaminAir	Heraeus-Christ GmbH, Osterode, D
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg, D
Trio Thermoblock	Biometra, Göttingen, D
Varifuge K	HA2448
Vortexgerät	Bohemia, New York, USA
Waagen	Sartorius, Göttingen, D
Wasserbad	Kötterman, Greut, D
Zentrifuge 3200, 5402, 5415C	Eppendorf, Hamburg, D

2.2.2 Verbrauchsartikel

Combitips plus 0,5ml/ 50ml	Eppendorf, Hamburg, D
Frischhaltefolie	The Dow Chemical Comp., USA
Kodak , New York, USA	BioMax MR Film
PhastGel homogeneous12.5 % / 20 %	Pharmacia Biotech
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße (Safelock 0,5ml/ 1,5ml)	Eppendorf, Hamburg, D

2.2.3 Reagenzien

$\alpha[^{35}S]$-dATP	Amersham, Cleveland, USA
25 mM ddNTP	Promega, Madison ,USA
Agarose	Serva, Heidelberg, D
Ampuwa	Fresenius AG, Bad Homburg
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
BSA	Sigma, Diesenhofen, D
Buffer Strips	Pharmacia, Upsala, Schweden
Chloroform	Fluka, Neu-Ulm, D
DNA –Molekulargewichtsmarker V, VI	Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim D
Dulbeccos PBS,	Sigma, Diesenhofen, D
Dynabeads M280 - Streptavidin	Dynal A.S., Oslo, Norwegen
EDTA - dinatriumdihydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ethanol 70 %,	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg, D
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, D
Formamid	Merck, Darmstadt, D
Genomix Scale-up Kit	Talent srl, Triest, I
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, D
Glycerol	Merck, Darmstadt, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
MgCl	Promega, Madison ,USA
Mineralöl	Sigma, Diesenhofen, D
NaAcetat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
NaOH	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxidplätzchen	Merck, Darmstadt, D
PBS spezial (ohne Mg^{++})	Sigma, Diesenhofen, D
Primer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D

Salzsäure	Merck, Darmstadt, D
Sequenase Version 2.0	USB, Cleveland, USA
Silbernitrat	Sigma, Diesenhofen, D
Taq-Polymerase	Promega, Madison, USA
TEMED	Pharmacia, Upsala, Schweden
Thermobuffer (10x) MgCl frei	Promega, Madison ,USA
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Tris-hydrochlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Trypanblau	Sigma, Diesenhofen, D
Ultrapure Sequagel (concentrate, diluent, buffer)	National Diagnostics, Atlanta, USA
Xylencyanol	Merck, Darmstadt, D

Allgemeine Bemerkung zu den molekulargenetischen Methoden:

Beim Arbeiten mit DNA wurden grundsätzlich immer – wie bei sämtlichen Tätigkeiten in der Molekulargenetik –Handschuhe getragen. Außerdem wurden alle Pipettierschritte unter einer Sicherheitswerkbank (clean bench) durchgeführt, um Kontaminationen, sowohl mit der DNA des Untersuchers als auch mit der amplifizierten DNA, zu vermeiden.
Soweit technisch möglich wurden alle verwendeten Lösungen und Arbeitsmaterialien durch Autoklavieren sterilisiert.

2.3 Methoden

2.3.1 DNA – Extraktion aus Lymphozyten

Prinzip:

Alle DNA- Extraktionsmethoden basieren auf einer Denaturierung und nachfolgender Präzipitation der Nukleinsäure mit Ethanol in der Anwesenheit von Kationen.

Durchführung:

Bestandteile des Genomix Blood Scale-up Kits ®:

- Blutwaschlösung
- Lösung 1 (zur Blutzelllyse)
- Lösung 2 (Fällungslösung)
- Lösung 3 (Ionenaustauschlösung)
- Zentrifugenröhrchen mit Gel-Barriere

A. Leukozytengewinnung (Blut waschen)

Nachdem das EDTA-Blut mindestens 2 h bei –20° C aufbewahrt worden war, wurde die DNA aus 3,5 – 8 ml EDTA-Blut mit Hilfe des Genomix Blood Scale-up-Kits extrahiert.
Um den kompletten Verlust der Leukozyten zu verhindern, war ein Auftauen des EDTA-Blutes über eine Dauer von mindestens 40 min bei 37° C – bis alle Erythrozyten lysiert waren– notwendig. Nach dem Hinzufügen von exakt 2 Volumenteilen der Blutwaschlösung und vorsichtigem Mischen wurde dieses bei 3300 U/ min und 4° C 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das verbleibende Pellet in 1 ml der Blutwaschlösung vollständig resuspendiert. Anschließend wurde die Lösung 3 x 15 sec geschüttelt (Vortex-Maschine).

B. Komplettes Lysieren der Leukozyten und ihrer Nuklei

Der leukozytenhaltigen Mischung wurde 1ml Ampuwa-H_2O zugefügt. Nach nochmaligem Schütteln und Zugabe von 4 ml Lösung 1 erfolgte das Erhitzen der Proben im Wasserbad bei 68° C für 10 min. Unter dem Abzug wurden 6,5 ml Chloroform (Trichlormethan) in ein zwei Phasen enthaltendes Reaktionsgefäß (Zentrifugenröhrchen mit Gel-Barriere) pipettiert,

zu welchem das erwärmte Lysat gegeben wurde. Auf die vollständige Vermischung der zwei Phasen durch kräftiges Schütteln folgte eine Zentrifugation bei 3500 U/ min und 4°C (15min). Als Resultat wurden drei Phasen sichtbar, von denen die oberste in ein neues Röhrchen übernommen wurde.

C. DNA-Präzipitation

Ein Aliquot von 8 ml Lösung 2 wurde langsam hinzugefügt. Die DNA präzipitierte unter vorsichtigem Hin- und Herwenden des Gefäßes. Bei Ausbleiben der Ausfällung bewährte sich eine erneute Zugabe von 1 ml Lösung 2. Blieb auch dies ohne Erfolg, wurden dem Ausgangsvolumen (11 ml) 23 ml 99%iges Ethanol und 3,5 ml Na Acetat (3 M, pH 5,2) aus dem Kühlschrank (4° C) hinzugegeben und die Proben für eine bessere Ausbeute auf Eis positioniert. Nach der nun folgenden Zentrifugation (für 5 min bei 3700 U/ min und 4° C) wurde der Überstand dekantiert und das Reaktionsgefäß mit der ausgefällten DNA für 2 min auf Filterpapier getrocknet.

D. Resuspension der DNA in Pufferlösung

Das Pellet wurde in 4 ml Lösung 3 für 30-60 min auf dem Schütteltisch resuspendiert. Nachdem das Präzipitat vollständig in Lösung gegangen war, erfolgte ein erneutes Ausfällen in zwei Schritten: Die DNA-haltige Lösung wurde mit 8 ml 99%igem Ethanol versetzt, 5 min bei 2200 U/ min und 4° C zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Danach wurde das Pellet mit 2 ml 70%igem Ethanol gewaschen, dann 2 min mit den gleichen Einstellungen zentrifugiert und nach dem Dekantieren 2 min auf Filterpapier getrocknet. Die präzipitierte DNA wurde in 400 µl TE-Puffer aufgenommen und über Nacht auf dem Schütteltisch resuspendiert. Die gelöste DNA wurde bei 4° C aufbewahrt.
Anschließend erfolgte die spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte mit einem Spektralphotometer und beruht auf den unterschiedlichen Absorptionsmaxima von Nukleinsäuren und Proteinen. Da das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm und das der Proteine bei 280 nm

liegt, gibt das Verhältnis der Extinktion von 260 nm zu 280 nm Aufschluss über den Reinheitsgrad der Nukleinsäure. Der Wert sollte zwischen 1,7 und 2,0 betragen, ist er kleiner so liegt eine Kontamination mit Proteinen vor.

Für die Konzentrationsbestimmung gelten folgende Näherungsgleichungen:

Nukleinsäure	Absorptionseinheit (1 A^{260})
Doppelsträngige DNA (double-stranded DNA = ds DNA)	1 OD^{260} = 0,05 µg ds DNA/ ml
Einzelsträngige DNA (single-stranded DNA = ss DNA)	1 OD^{260} = 0,033 µg ss DNA/ ml

Tabelle 2-2: Näherungsgleichungen für die Absorptionseinheiten der Nukleinsäuren

Die Messung der optischen Dichte (OD) wurde in Präzisions-Quarzküvetten mit 10 mm Schichttiefe und einem Volumen von 1 ml bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm (inklusive 260/ 280 nm Ratio) gegen Wasser als Leerwert durchgeführt. Für die DNA und die PCR-Primer-Konzentrationsbestimmung wurden 4 µl der zu untersuchenden Lösung zu 996 µl H_2O in eine Küvette gegeben (Verdünnungsfaktor 250). Da bei der Konzentrations-bestimmung der Sequenzierprimer 25 µl Primerlösung zu 975 µl H_2O pipettiert wurden, betrug der Verdünnungsfaktor in diesem Fall 35.

Allgemeine Formel für die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration:

$$\textbf{Konz. (µg/ ml)} = \textbf{OD}^{260} \textbf{ x Verdünnungsfaktor x } \textbf{A}^{260}$$

Die Konzentration der DNA sollte zwischen 0,2 und 0,5 µg/ µl liegen, PCR-Primer wurden auf 1 µg/ µl und die Sequenzierprimer auf 150 ng/ µl verdünnt.

2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde 1985 von Mullis in die Molekularbiologie eingeführt und nimmt heute unter den rekombinanten DNA-Technologien unumstritten den ersten Platz ein(Saiki RK et al., 1985; Mullis KB, Faloona FA, 1987). Die PCR hat die Molekularbiologie revolutioniert. Sie ermöglicht die Synthese einer enormen Anzahl von Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz. Nahm früher die Amplifikation einer bestimmten DNA-Menge durch das Klonieren mehrere Tage in Anspruch, werden heute mittels PCR in wenigen Stunden vergleichbare Mengen amplifiziert. Ihr Anwendungsbereich ist sehr groß. Sie wird z.B. in der Genklonierung, Kartierung und Sequenzierung ganzer Genome und zur Diagnose menschlicher Erbkrankheiten eingesetzt.

Prinzip:

Der Ablauf einer PCR entspricht der Replikation von DNA in einer Zelle (Gibbs RA, 1990). Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase entlang einer Nukleinsäurematrix den dazu komplementären Strang. Die eingebauten Nukleotide bilden jeweils ein Watson-Crick-Basenpaar mit dem gegenüberliegenden Nukleotid der DNA-Matrix. In der Zelle benötigt das Enzym einen RNA-Primer, der mit dem Matrizenstrang hybridisiert und von der Polymerase als Startermolekül genützt wird. *In vitro* werden dafür chemisch synthetisierte Oligonukleotide verwendet. Diese Primer flankieren den zu amplifizierenden Bereich der DNA.

Für die Reaktion werden benötigt: eine DNA-Matrix, eine thermostabile DNA-Polymerase, Desoxynukleotide, zwei Oligonukleotide als Primer und ein geeignetes Puffersystem. Die in allen Reaktionen verwendete Taq-Polymerase, die aus dem Bakterium Termus aquaticus aus einem Geysir des Yellowstone-Nationalparks isoliert und weiter modifiziert wurde, synthetisiert in 5´-3´- Richtung. Sie besitzt zwar eine 5´-3´-, aber keine 3´-5´-Exonukleaseaktivität (Innis MA et al., 1988; Saiki RK et al., 1988; Rabinow, 1996; Pingo und Urbanke, 1997). Diese 5´-3´- Aktivität aller Polymerasen ist Voraussetzung für die PCR.

Der Zyklus der Synthese besteht aus drei Teilschritten:
Im ersten Schritt wird das DNA Ausgangsmaterial durch Hitzedenaturierung bei 90 - 95° C in Einzelstränge überführt. Danach wird durch Abkühlung des Reaktionsgemisches auf 50 –70 ° C die Anlagerung (Annealing) der Primer an die komplementäre DNA ermöglicht.

Bei ca. 72° C erfolgt im letzten Schritt die Polymerisation (Extension) des jeweiligen Gegenstranges (Eisenstein BI, 1990). In jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge des von den Primern eingegrenzten Fragments und dient im nächsten Zyklus zusätzlich als DNA-Matrix, so dass nach n Durchläufen 2^n Produkte vorhanden sind. Der Zyklus wird 25- bis 35- mal wiederholt, wobei aufgrund sinkender Effizienz (teilweise bedingt durch die Denaturierung des Enzyms) ab etwa 30 Folgen nur noch eine lineare Zunahme stattfindet.
Die Reaktionsbedingungen einer PCR können durch Konzentrationsveränderungen der einzelnen Substrate mannigfaltig variiert werden. Ebenso wichtig ist die Auswahl der Primer und der Temperatur sowie die Dauer der einzelnen Teilschritte.
Die Schmelztemperatur wird vor allem durch den Guanin(G)/ Cytosin(C)-Gehalt bestimmt. Daher erfordern G/ C-reiche Sequenzen eine höhere Denaturierungszeit. Eine unvollständige Denaturierung bewirkt eine schnelle Renaturierung der Matrize und damit eine ineffektive Primerhybridisierung, was eine verminderte Produktausbeute zur Folge hat.
Die Temperatur und Inkubationszeit für das Annealing werden durch Basen-zusammensetzung, Länge und Konzentration der Primer bestimmt. Die Temperaturen sollten 2 – 10° C unter der berechneten Schmelztemperatur des Primers liegen (Micheli und Bova, 1997). Geeignete Temperaturen liegen zwischen 50 und 70°C, wobei die höchstmögliche Vorzuziehen ist, um die Spezifität der PCR zu fördern.
Bei der Polymerisation, die meist bei 72° C erfolgt, ist zu beachten, dass zu lange Synthesezeiten die Bildung unspezifischer Nebenprodukte begünstigen.

Primerdesign:

Die Länge eines Primers für Humansequenzen sollte mindestens 18, aber nicht mehr als 30 Nukleotide enthalten. Der G/ C-Gehalt beträgt idealerweise 50 %. Längere Folgen von Purin- oder Pyrimidinbasen sind ebenso zu vermeiden wie repetitive Sequenzen und solche, die Sekundärstrukturen bilden können (Micheli MR. und Bova R., 1997). Bei paarweisen Primern sollte auf eine Ähnlichkeit von Länge, Schmelzpunkt und Nukleotidratio geachtet und komplementäre Sequenzen vermieden werden (Roux KH, 1995). Um die DNA-Amplifikate bei der sich anschließenden Sequenzierungsreaktion über den Biotin-Streptavidin-Mechanismus binden zu können, wurden die entsprechenden Primer am 5´-Ende mit Biotin markiert.

PCR-Strategie:

Es wurden 4 PCRs mit den Primerpaaren P1/ P2, P3/ P4, P5/ P6 und P1/ P4 etabliert. Das amplifizierte PCR-Produkt hatte eine Länge von insgesamt 453 bp (Genort 4677-5130). Die amplifizierte Fragmente beinhalten die Konsensussequenzen der cis-Elemente der Promotorregion des hGH-1-Gens, an welche Transkriptionsfaktoren (wie SP-1, Pit-1 etc.) binden (siehe Abbildung 1-5).

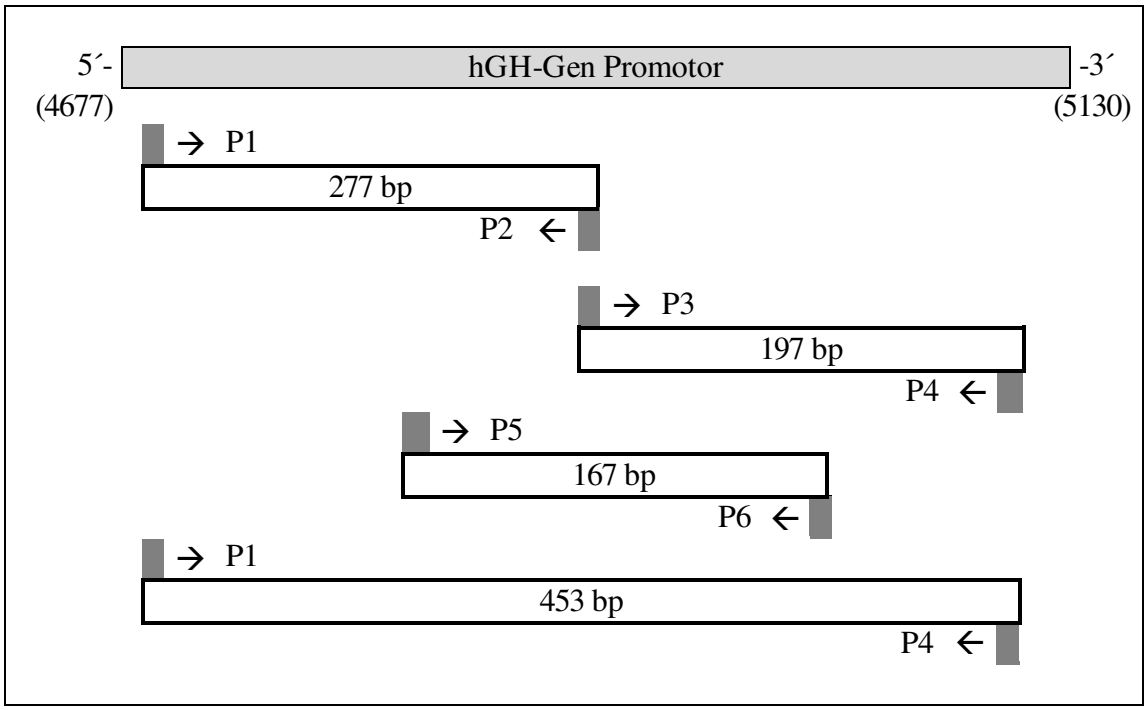


Abbildung 2-1 : PCR-Strategie des hGH-1-Promotors (Primer)

Sequenzen der Primer:

Die Primer wurden gemäß der publizierten Nukleotidsequenz des humanen Wachstumshormongenortes entworfen (Chen et al., 1989). Die Abstände zwischen PCR-Primern und Sequenzier-Primern durften nicht zu klein gewählt werden, damit die Sequenz der Promotorregion nach dem Sequenzieren vollständig lesbar war.

PRIMER	SEQUENZ	GENORT
P1	5'-AGGACTGAATCGTCCTCA-3'	4677-4694
$P1_{Biotin}$	5'-CAGGACTGAATCGTCCTCAC-3'	4676-4695
P2	5'-CAGAGTGTCAGCCAGAGATA-3'	4953-4934
$P2_{Biotin}$	5'-CAGAGTGTCAGCCAGAGATA-3'	4953-4934
P3	5'-TATCTCTGGCTGACACTCTG-3'	4934-4953
$P3_{Biotin}$	5'-CTCTGGCTGACACTCTG-3'	4937-4953
P4	5'-TGGCCCCTTCTCTCCCACTG-3'	5130-5111
$P4_{Biotin}$	5'-TGGCCCCTTCTCTCCCA-3'	5127-5111
P5	5'-ACATCCTTCTCCGCGTTCAG-3'	4847-4866
P6	5'-ATGCCCCCTGGCTTGTCATC-3'	5013-4994

Tabelle 2-3: Sequenz der verwendeten Primer

Auflösen der Primer:

Alle Primer wurden von der Firma Roth synthetisiert und in lyophilisiertem Zustand geliefert. Mit Hilfe spektralphotometrischer Kontrolle wurden die Primer für die PCR auf die Konzentration von 1 µg/µl und die Sequenzierprimer auf 150 ng/µl mit Ampuwa-Wasser aufgelöst.

Protokolle:

Es wurden vier verschiedene PCR-Protokolle modifiziert. Die Angaben beziehen sich jeweils auf eine spezifische PCR für je ein Fragment (siehe Abbildung 2-1). Die mit Biotin markierten Fragmente wurden für die Sequenzierung verwendet (siehe Abbildung 2-2).

PCR P1/ P2 (Biotin): Buffer 5µl, Mg 3 µl, dNTP 0.4 µl, (anti-)sense Primer je 0.4 µl, Taq-Polymerase 0.6 µl, H_2O 39.2 µl, gDNA 1 µl.

	TEMP. (° C)	DAUER (SEK.)
Denaturierung	95	60
Annealing	70	"
Extension	72	"

X 33

nach 33 Zyklen(Zyklus= Denaturierung-Annealing-Extension) für 6 Min. bei 72 °C.

PCR P3/ P4 (Biotin): Buffer 5µl, Mg 3 µl, dNTP 0.4 µl, (anti-)sense Primer je 0.4 µl, Taq-Polymerase 0.6 µl, H_2O 39.2 µl, gDNA 1 µl.

	TEMP. (° C)	DAUER (SEK.)	
Denaturierung	95	60	X 33
Annealing	68	"	
Extension	72	"	

nach 33 Zyklen für 6 Min. bei 72 °C.

PCR P5/ P6: Buffer 5µl, dNTP 0.4 µl, (anti-)sense Primer je 0.4 µl, Taq-Polymerase 0.6 µl, H_2O 42.2 µl, gDNA 1 µl.

	TEMP. (° C)	DAUER (SEK.)	
Denaturierung	95	60	X 33
Annealing	70	"	
Extension	72	"	

nach 33 Zyklen für 6 Min. bei 72 °C.

PCR P1/ P4 (Biotin): Buffer 5µl, Mg 3 µl, dNTP 0.4 µl, (anti-)sense Primer je 0.4 µl, Taq-Polymerase 0.6 µl, H_2O 39.2 µl, gDNA 1 µl.

	TEMP. (° C)	DAUER (SEK.)	
Denaturierung	95	60	X 30
Annealing	70	"	
Extension	72	"	

nach 30 Zyklen für 6 Min. bei 72 °C.

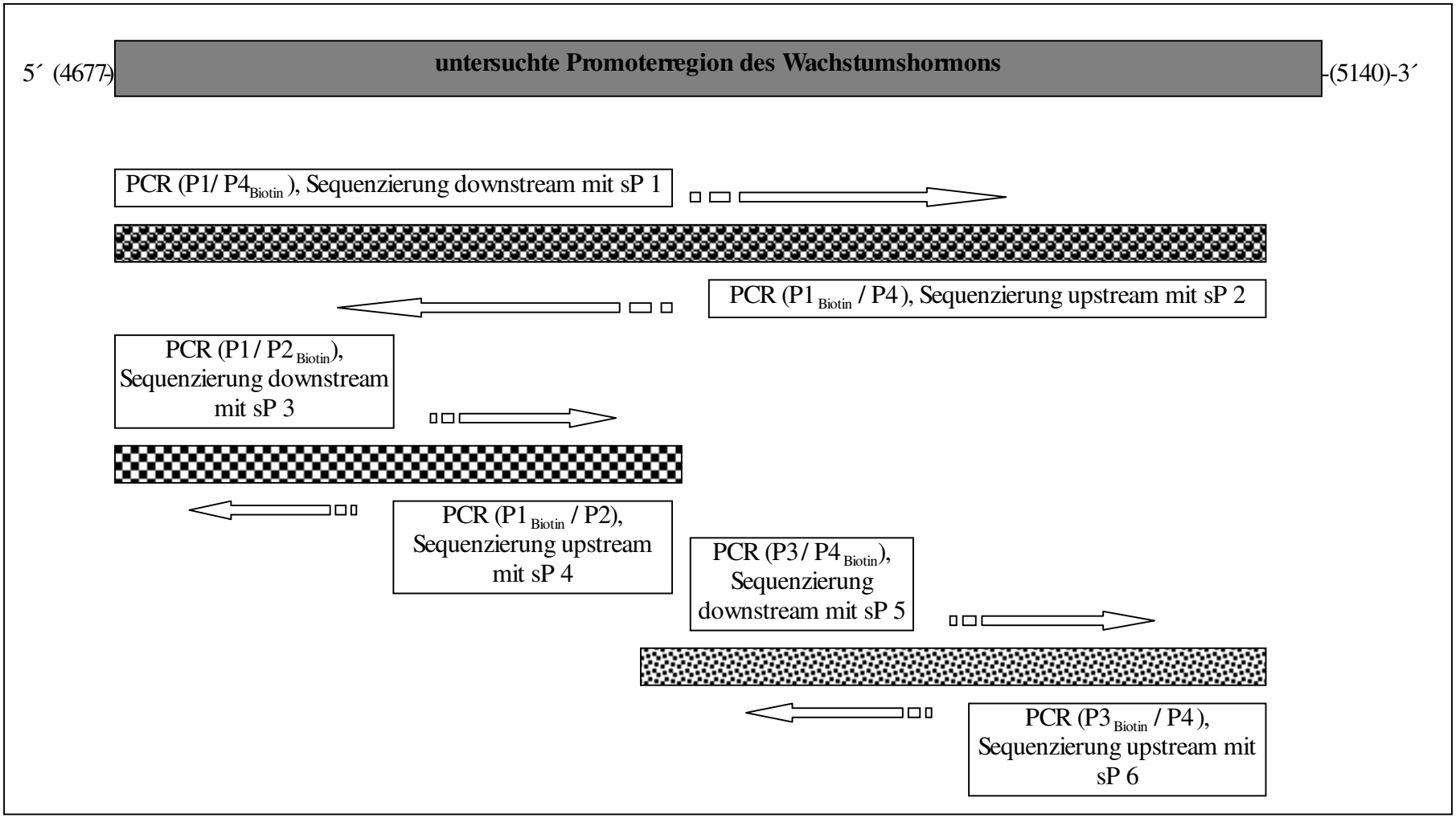


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Sequenzierung der Promotorregion (downstream= 5´-3´-Richtung, upstream= 3´-5´-Richtung)

2.3.3 Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente zu trennen und zu identifizieren, macht man sich die Elektrophorese mittels Polyacrylamid- oder Agarose-Gel zu Nutze. Das Polyacrylamidgel erreicht eine gute Auftrennung bei kleineren Fragmenten (5-500 bp), während das Agarosegel sich für größere Fragmente (200-5000 bp) eignet (Sambrook et al., 1989). Für die Zuordnung der Basenpaarlänge der DNA-Fragmente wurde parallel zu den Proben ein standardisierter Molekulargewichtsmarker appliziert.

Verwendet wurden die Molekulargewichtsmarker V (8-587 bp) und VI (0,15-2,1 kbp)der Firma Boehringer Mannheim (Roche). Nach der Auftrennung mittels Elektrophorese wird das Gel mit einer 1 %iger Lösung des fluoreszierenden Farbstoffes Ethidiumbromid gefärbt und unter ultraviolettem Licht betrachtet. Dadurch können DNA-haltige Banden detektiert und eventuell für weitere Untersuchungen exzidiert werden.

Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Das Monomer Acrylamid (CH_2=CH-CO-NH_2) wird in der Anwesenheit von freien Radikalen, welche durch Ammoniumpersulfat gestellt und durch TEMED (N,N,N,N-Tetra-methylethylendiamin) stabilisiert werden, in einer Kettenreaktion zu langen Ketten polymerisiert. Das bifunktionale TEMED (CH_2=CH-CO-NH-CH_2-NH-CO-CH=CH_2) agiert bei der Polymerisation zusätzlich als Komonomer oder Vernetzer. Durch unterschiedliche Gewichtsverhältnisse von Monomer zu Komonomer lässt sich die Porengröße des Gels variieren.

Bei vorliegender Arbeit wurde für die PCR-Darstellung ein 8 %iges (für Fragmente zwischen 100 und 500 bp) nicht denaturierendes Polyacrylamidgel (Page) verwendet. Für den Restriktionsverdau wurde ein 20%iges Page eingesetzt. Das Gel wurde in den von zwei Spacern gebildeten Raum zwischen zwei Glasplatten gegossen und nach Polymerisation und Einspannen in die Gelkammer mit 1x TBE-Puffer (Tris - Base, 0,1 M EDTA und Borsäure) übergossen. Nach Mischen von 8 µl Probe (PCR–Produkt), 2 µl Bromphenol-haltigen Farbstoffs und deren Zentrifugation, wurden die Geltaschen beladen (inklusive je eine Tasche für den DNA-Längenstandard IV bzw. VI, ebenfalls mit Farbstoff). Die DNA wurde bei 80 –120 Volt über 2 –3 h aufgetrennt und anschließend die Gele 10 min in einer 1 %igen Ethidiumbromidlösung gefärbt. Danach wurden sie in destilliertem Wasser für 10 min

gebadet und unter UV-Licht zur Dokumentation fotografiert.

	4 % PAGE	8 % PAGE	20 % PAGE
Acrylamid 30 %	6,6 ml	13,3 ml	33 ml
5x TBE	10 ml	10 ml	10 ml
Ampuwa-H_2O	38,2 ml	31,5 ml	11,8 ml
Ammoniumpersulfat (10 %)	350 µl	350 µl	350 µl
TEMED	60 µl	60 µl	60 µl

Tabelle 2-4: Mengenangaben für die Herstellung eines 4-/ 8- und 20 %igen PAGEs

2.3.4 SSCP (single strand conformational polymorphism)

Einleitung:

SSCP ist eine schnelle Methode, um kleinste Sequenzveränderungen in der DNA aufzuspüren . SSCP- Analysen wurden zum ersten Mal von Orita beschrieben (Orita M. et al., 1989). Die SSCP-Technik ermöglicht die Detektion sowohl bekannter als auch unbekannter Punktmutationen und Polymorphismen aus einem PCR-Produkt. Diese wurde benutzt, um ursächliche Genveränderungen für zahlreiche Erkrankungen aufzufinden (Orita M. et al., 1989; Dean M. et al., 1990; Cawthon R.M. et al., 1990; Ainsworth P.J. et al., 1991; Sugimoto K. et al., 1992).

Prinzip:

Bei dieser Technik wird die Doppelstrang(ds)-DNA, welche aus dem PCR-Produkt gewonnen wird, zu einer Einzelstrang(ss)-DNA denaturiert und die Produkte werden unter nicht denaturierenden Bedingungen mittels Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (siehe Abbildung 2-3). Dabei kommt es idealerweise zur Darstellung von zwei (homozygot) bzw. vier (heterozygot) Banden. Die für eine Sequenz spezifische Konformation entsteht durch Faltung der ss-DNA, indem sich zwischen den Basen Brücken bilden. Kommt es zu Sequenzveränderungen (ein einzelner Nukleotidersatz genügt), entsteht eine andere Konformation (Sekundärstruktur) der ss-DNA, welche eine Mobilitätsänderung in der

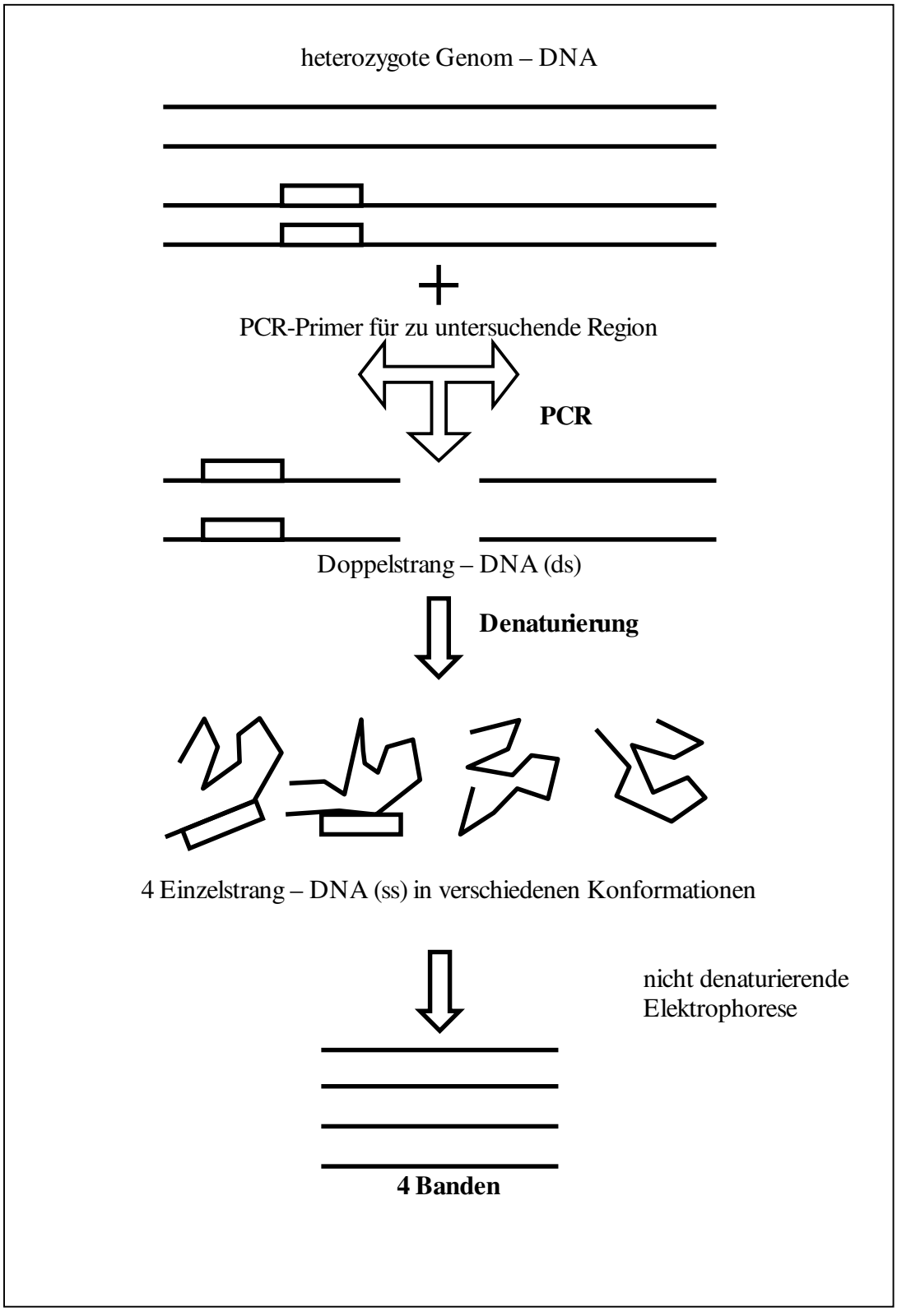


Abbildung 2-3: Vereinfachtes Schema der SSCP-Analyse

Elektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen bewirkt. Diese Mobilitätsänderung demonstrierte als erster Kanazawa in Studien mit E.coli F1-ATPase (Kanazawa H. et al., 1986). In unserer Studie wurde das PhastSystem™ der Firma Pharmacia verwendet. Diese Methode ist bei der Detektion zahlreicher Punktmutationen auf Genen wie Phenylalaninhydroxylase(PAH)-Gen, Regulatorgen der Transmembran bei zystischer Fibrose (CFTR) und F9 verwendet worden (Dockhorn-Dworniczak B. et al., 1991; Mohabeer A.J., 1991;Bakker E. et al., 1992;McMahon R. et al., 1992).

Durchführung:
Zuerst wurden die dafür benötigten PCR durchgeführt. Danach wurde das entsprechende Gel (für 277 bp das 12.5%ige-Gel, für 194/ 167 bp das 20%ige-Gel) in die Elektrophoresekammer platziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt denaturiert. Als nächster Schritt folgte die Applikation der Proben. Nach dem automatischen Auftrennen wurden die Gele in einer speziellen Kammer einer Silberfärbung unterzogen.

Vor dem Start

- Einlegen des PhastGels (Gel und Pufferstreifen) in das PhastSystem
- Einstellen der stand-by-Temperatur (siehe Protokoll)
- Vorbereitung eines Eiswasserbades

Denaturierung des PCR-Produktes

- Vermischen von 1µl PCR-Produkt mit 1µl Denaturierungslösung (=98%Formamid, 0.05% Bromphenolblau, 0.05% Xylen-Cyanol) und für 3 Min. bei 95°C inkubieren.
- Sofortiges Kühlen der Proben im Eiswasserbad und bis zur Applikation dort belassen.

Applikation der Proben

- Laden der Proben auf einen speziellen Applikator
- Applikator ins PhastSystem einbringen

Trennung der Proben nach folgendem Protokoll:

Vorlauf	400 V	10mA	2.5 W	8°C	165 Vh
Applikation	400 V	1 mA	2.5 W	8°C	3 Vh
Trennung	400 V	10 mA	2.5 W	8°C	330 Vh

Tabelle 2-5: Protokoll für SSCP auf 12.5%igem Gel für PCR-Produkt mit 277bp

Vorlauf	400 V	10mA	2.5 W	15°C	50 Vh
Applikation	400 V	1 mA	2.5 W	15°C	1 Vh
Trennung	400 V	10 mA	2.5 W	15°C	400 Vh

Tabelle 2-6: Protokoll für SSCP auf 20%igem Gel für PCR-Produkt mit 197 / 167 bp

Silberfärbung

Nach dem Auftrennen werden die Gele zur Darstellung der Banden in einer speziellen Kammer mittels einem Verfahren zur Silberfärbung eingefärbt. Man kann dabei einen Kit der Firma Pharmacia (PhastGel Silver Kit) benutzen oder wie wir in dieser Studie, die Färbungsreagenzien selber herstellen. Benötigt wurden, eine Fixierlösung, ein Sensitizer, eine Farblösung, ein Entwickler und eine Stop-Lösung. Die Anleitung zur Herstellung dieser Lösungen und das Färbungsprotokoll werden im Weiteren beschrieben.

<u>Reagenzien:</u>

- Fixierlösung : 100 g Trichloressigsäure in 500 ml dest. Wasser
- Sensitizer : 200 ml 25%ig Glutaraldehyd plus 400 ml dest. Wasser
- Farblösung : 2.5 g Silbernitrat gelöst in 500 ml dest. Wasser
- Entwickler : 30 ml frisch hergestelltes 12.5%iges Hydrogenkarbonat, 60 µl 37%iges Formaldehyd auf 150 ml mit dest. Wasser auffüllen
- Stop-Lösung: 25 ml Essigsäure (glacial)
- Preserver : für 12.5%iges Gel→ 25 ml 100%iges Glycerol plus 475 ml dest. Wasser
  für 20 %iges Gel→ 60 ml 100%iges Glycerol plus 440 ml dest. Wasser

Färbungsprotokoll:

Schritt - Nr.	Lösung	Zeit (Min.)	Temperatur (°C)
1.	Fixierlösung	5	20
2.	Sensitizer	6	40
3.	Dest. Wasser	2	40
4.	Dest. Wasser	2	40
5.	Farblösung	19	30
6.	Dest. Wasser	2.5	20
7.	Dest. Wasser	0.5	20
8.	Dest. Wasser	0.5	30
9.	Entwickler	0.5	30
10.	Entwickler	2.5	30
11.	Stop-Lösung	5	30
12.	Preserver	3	30

Tabelle 2-7: Protokoll für Silberfärbung

2.3.5 DNA- Sequenzierung

Prinzip:

Die Sequenzierung der DNA erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger F et al., 1977). Hierbei kann zirkuläre oder lineare DNA (einzel- oder doppelsträngig) als Matrize für die Reaktion der DNA- abhängigen DNA - Polymerase eingesetzt werden.

Es wurde die im Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit® der Firma USB (Cleveland, USA) enthaltene T7 DNA- Polymerase (Tabor S, Richardson CC, 1987) verwendet. Der komplementäre Strang wird aus den Monomeren dCTP, dGTP, dTTP und dem radioaktiven α[^{35}S]-dATP synthetisiert, und zwar in vier verschiedenen Ansätzen. Diese enthalten jeweils die 2´ ,3-Didesoxynukleotide (ddNTPs) ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP. Die Didesoxy-Analoga der Desoxynukleotide werden von der DNA- Polymerase an Stelle der normalen Desoxynukleotide akzeptiert, in die wachsende Oligodesoxynukleotidkette eingebaut, aber nicht mehr verlängert, da sie keine 3´-OH-Gruppe besitzen. Da es je nach relativer Konzentration von ddNTP zu dNTP früher oder später zum Kettenabbruch kommt, kann

durch die Variation der Konzentration dieser der „Lesebereich“ einer Sequenzierung beeinflusst werden.

Die sich anschließende Elektrophorese wird in Gegenwart von 8 M Harnstoff bei ca.50-65°C durchgeführt, um Sekundärstrukturen aufzulösen und eine Renaturierung zu verhindern. Da die DNA durch $\alpha[^{35}S]$-dATP radioaktiv markiert wurde, kann nach Exposition des getrockneten Gels auf einem Röntgenfilm die Sequenz direkt abgelesen werden.

Um die Sequenzreaktion zu vereinfachen, wurde in der vorliegenden Arbeit das PCR-Produkt durch Bindung an eisenhaltige Kügelchen (beads) immobilisiert. Diese Bindung erfolgt über den Biotin-Streptavidin-Mechanismus, wobei sich die mit Biotin markierten Primer mit dem Streptavidin der magnetisierbaren Kügelchen verbindet (Hultmann et al., 1989).

Ist der sense Primer (5`-Primer) der PCR mit Biotin markiert, so muss der Sequenzierprimer antisense Ausrichtung haben, und umgekehrt. Im ersten Fall ist die Leserichtung upstream im umgekehrten Fall downstream gerichtet.

Durchführung:

Bestandteile des Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kits®:

- Sequenasepuffer (5x konzentriert; 200 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM $MgCl_2$; 250 mM NaCl)
- Dithiothreitol 0,1 M
- Labeling Mix (5x konzentriert; 7,5 µM dGTP; 7,5 µM dCTP; 7,5 µM dTTP)
- ddG Termination Mix (80 µM dGTP,80 µM dATP, 80 µM dCTP, 80 µM dTTP, 8 µM ddGTP, 50 mM NaCl)
- ddA Termination Mix (80 µM dGTP,80 µM dATP, 80 µM dCTP, 80 µM dTTP, 8 µM ddATP, 50 mM NaCl)
- ddC Termination Mix (80 µM dGTP,80 µM dATP, 80 µM dCTP, 80 µM dTTP, 8 µM ddCTP, 50 mM NaCl)
- ddT Termination Mix (80 µM dGTP,80 µM dATP, 80 µM dCTP, 80 µM dTTP, 8 µM ddTTP, 50 mM NaCl)
- Stopp Lösung (95 % Formamid, 20 mM EDTA, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol FF)

- Sequenase Version 2.0 T7 DNA Polymerase 13 U/ µl in 20 mM KPO_4 (pH 7,4), 1mM DTT, 0,5 mg/ ml BSA

PCR-Produkt	Sequenzier – Primer	Sequenz	Lokalisation (bp)
P1/ P4 $_{Biotin}$	sP 1	5´-AGAATGGGATGTGGTCGGTA-3´	4801 – 4820
P1 $_{Biotin}$ / P4	sP 2	5´-ATGCCCCCTGGCTTGTCATC-3´	5003 – 4994
P1/ P2 $_{Biotin}$	sP 3	5´-TTGGCTGTGCTTGGCCCCTTTT-3´	4711 – 4732
P1 $_{Biotin}$ / P2	sP 4	5´-GTCCTCTCTTTAAGGGTCACGT-3´	4922 – 4900
P3/ P4 $_{Biotin}$	sP 5	5´-CACAACCCTCACAACACT-3´	4955 – 4973
P3 $_{Biotin}$ / P4	sP 6	5´-TTGCCCCCACCTGTTTCT-3´	5110 – 5093

Tabelle 2-8: Übersicht der verwendeten Sequenzierprimer, ihrer zugehörigen PCR-Produkte und die Lokalisation des Lesebereichs auf der Promotorregion des Wachstumshormongens

Zur Vorbereitung wurden 20 µl PCR- Produkt, 2 ml 3 M Natriumacetat (= 1/ 10 Volumenanteil) und 40 µl 99,8 %iges Ethanol (= 2 Volumenanteile) in ein steriles 1,5 ml Eppendorf®-Reaktionsgefäß pipettiert, geschüttelt und mindestens 24 h bei – 20° C gelagert.

A. Bead-Koppelung

Die Proben mit der nun präziptierten DNA wurden 30 min bei 14000 U/ min und 4° C zentrifugiert, der Überstand über dem Pellet abpipettiert und durch 300 µl 70 %igem Ethanol ersetzt, ohne dass das Pellet in Lösung ging. Nach erneutem Zentrifugieren (15 min bei 1400 U/ min und 4° C) und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 20 µl DEPC H_2O aufgenommen und durch Vortexen vollständig gelöst.
Die eisenhaltigen Kügelchen (beads) wurden mit einer Lösung aus 10 mM Tris (pH 7,5), 2 mM EDTA und 4 M NaCl gewaschen und anschließend in gleichem Volumenverhältnis (20 µl) zu jeder Probe gegeben. Die Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur mit gelegentlichem vorsichtigem Durchmischen diente der Bindung der DNA an die beads über den Biotin-Streptavidin-Mechanismus. Durch Positionierung der Reaktionsgefäße in einen speziellen Magneten konnte der Überstand leicht entfernt werden, da die eisenhaltigen

Kügelchen an der Wand des Gefäßes hafteten. Um eine möglichst reine DNA zu erhalten, wurde das Sediment in 40 µl frisch hergestellter 0,15 M NaOH-Lösung resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Auf das Entfernen des Überstandes folgte eine weitere Reinigung mit Natronlauge und nochmals eine dreimalige mit DEPC H_2O.

B. Anlagerung des Sequenzierprimers (Annealing)

Nach vollständigem Entfernen des Überstandes wurde zu den Beads 6,5 µl H_2O, 2 µl 5x Sequenasepuffer und 1 µl des jeweiligen Sequenzierprimers hinzugefügt. Für die Anlagerung des Primers an die DNA wurden die Proben für 1 min bei 70° C in den Thermoblock positioniert und anschließend im ausgeschalteten Thermoblock belassen, bis dieser auf 30 – 35° C abgekühlt war.

C. Radioaktive Markierung (Labeling)

In der Zwischenzeit wurden die Didesoxynukleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP), DTT, Stopp Lösung, DEPC H_2O, Labeling Mix und der radioaktive Schwefel (auf Eis) aufgetaut. Außerdem wurden pro Probe in doppelter Ausführung vier verschiedene – am besten farblich codierte – Eppendorf®-Reaktionsgefäße mit „A" für den Ansatz mit ddATP usw. beschriftet. In den ersten Satz dieser Reaktionsgefäße wurde dann 2,5 µl des jeweiligen Didesoxynukleotids pipettiert. Die konzentrierten Lösungen des Labeling Mixes und der T7 DNA Polymerase wurden verdünnt, indem jeweils 16 µl H_2O zu 4 bzw. 3 µl der Stammlösungen hinzugegeben wurde.
Nach kurzer Zentrifugation der abgekühlten Proben wurde zu jedem Reaktionsansatz 1 µl DTT, 2 µl des verdünnten Labeling Mixes und 0,5 – 1 µl $\alpha[^{35}S]$-dATP (je nach Alter der Substanz) unter ständigem Durchmischen mit der Pipette hinzugefügt. Mit der sich anschließenden Zugabe von 2 µl des verdünnten Enzyms und 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur begann der Bau des komplementären Stranges.

D. Beendigung der Prolongation (Termination)

Unter gutem Mischen wurden je 3,5 µl der inkubierten Probe in das Didesoxynukleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP) enthaltende Reaktionsgefäß pipettiert, welche zuvor

für 1 min im Wasserbad bei 37° C aufgewärmt worden waren. Durch erneute Inkubation für 5 min im 37° C warmen Wasserbad, wurden die ddNTPs in den Strang eingebaut und somit der Kettenabbruch herbeigeführt. Da Formamid durch das Lösen von Wasserstoffbrückenbindungen die DNA denaturiert und so die Doppelstrangstruktur lockert, aber nicht vollständig spaltet, beendet das Hinzufügen der Formamid-haltigen Stopp Lösung sowie das Positionieren der Proben auf Eis die Polymerisation. Dieses Verfahren erleichtert beim anschließenden Erhitzen für 2 min im Thermoblock bei 70° C die Trennung der Stränge. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben abschließend in den Magneten gestellt und der Überstand, welcher die unterschiedlich langen Polymerisationsprodukte enthielt, in den zweiten Satz der beschrifteten Reaktionsgefäße überführt. Die Aufbewahrung dieser erfolgte bei – 20° C.

Die Reste der eisenhaltigen Kügelchen eines PCR- Produkts wurden mit 100 µl H_2O mehrmals gewaschen und in 40 µl H_2O aufbewahrt. An die recycelten Kügelchen mit der gekoppelten DNA konnte nun bei Wiederverwendung direkt der Sequenzierprimer angelagert werden (s. B. Annealing).

E. Gelelektrophoretische Auftrennung der Sequenzierproben

Da die aufzutrennenden einzelsträngigen Fragmente sich lediglich in der Länge eines Basenpaars unterscheiden, ist es notwendig für die optimale Auftrennung ein sehr dünnes und langes denaturierendes PAGE zu verwenden.

Die Glasscheiben wurden zuerst mit detergenzienhaltiger Waschlotion gewaschen, dann mit Isopropanol und abschließend mit 70 %igem Ethanol poliert, wozu keine Fussel bildenden Tücher (Kimwipe) verwendet wurden. Nach Platzieren der Abstandhalter (Spacer) zwischen den Glasplatten wurden diese in Form einer schiefen Ebene gelagert. In einem 500 ml Erlenmeyerkolben wurde das 6 %ige PAGE mit 8 M Harnstoff durch Zusammengeben von 45 ml Sequagel 20 % – concentrate – , 90 ml Sequagel – diluent – , 15 ml Sequagel – ultrapure buffer – (10x TBE), 60 µl TEMED und 500 µl frisch hergestelltem 10 %igem Ammoniumpersulfat vorbereitet. Die fertige Gellösung wurde vorsichtig – Luftblasenbildung war unbedingt zu vermeiden – zwischen die Glasplatten gegossen. Diese wurden, sobald die Flüssigkeitsfront das Ende der Platten erreichte, flach hingelegt und der „Haifischzahnkamm“ umgekehrt eingesetzt. Die Glasplatten wurden mit Klammern aufeinander gepresst, bis das Gel über Nacht vollständig polymerisiert war.

Nachdem die Glasscheiben abgespült und Gelreste entfernt worden waren, wurde der „Haifischzahnkamm“ mit der Zahnung nach unten eingesetzt und di e Zinken ca. 1-2 mm in das Gel geschoben. Das polymerisierte Gel wurde in die Vertikal-Elektrophorese-Apparatur eingespannt, wobei die obere Kammer mit Grieß und 1,5 %iger Agarose zusätzlich abgedichtet wurde. Nach Füllen der oberen und unteren Kammer mit 1x TBE, Freispülen der Geltaschen und Einpipettieren von Farbstoff in einige Taschen, wurde ein Vorlauf mit 140 – 170 Watt gestartet, bis die Glasplatten ca. 50° C warm waren.

Die zu sequenzierenden Proben wurden bei 95° C für 2 min im Thermoblock denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Nach Entfernung des Harnstoffes, welcher aus dem Gel diffundierte, wurden 3 µl Probe auf das heiße Gel (um eine Renaturierung zu verhindern) pipettiert. Die Elektrophorese wurde ca. 2 h (kurzer Lauf), 3,5 h (langer Lauf) bzw. 4,5 h (extra langer Lauf) bei 90 –110 Watt und 1400 – 1800 Volt durchgeführt.

Nach Beendigung des Laufs wurde der Puffer entfernt und die Glasscheiben aus der Elektrophorese-Apparatur ausgebaut. Die Platten wurden vorsichtig voneinander getrennt, das Gel auf Gel Blotting Papier aufgezogen und mit Frischhaltefolie abgedeckt. Nachdem aus dem Gel im Vakuumgeltrockner 30 min lang Flüssigkeit entzogen worden war, wurde die Frischhaltefolie entfernt und das Gel an der Luft getrocknet. Abschließend wurde ein Röntgenfilm auf das Gel aufgelegt und nach Exposition von 24 h bei Raumtemperatur entwickelt.

Da die angefallenen flüssigen und festen Abfallstoffe radioaktiv waren, wurden diese in einem gesonderten Behälter aufbewahrt und entsprechend entsorgt.

2.3.6 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme gehören zu der Gruppe der Endonukleasen und spalten Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäuren durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung. Restriktions-Endonukleasen, die gewöhnlich in Prokaryonten gefunden werden, sind wahrscheinlich für das Ausschalten fremder DNA wichtig, insbesondere der DNA von Bakteriophagen (Fuchs R und Blakesley R, 1983). Organismen, die Restriktions-Endonukleasen produzieren, schützen ihr eigenes Genom durch Methylierung der Nukleotide innerhalb der Erkennungssequenz. Man unterscheidet drei Klassen von Restriktionsenzymen. Meistens werden in der Molekularbiologie nur Typ II-Restriktionsenzyme benutzt. Diese

erkennen kurze DNA Sequenzen und spalten die Doppelstrang (ds)- DNA, im Gegensatz zu den Enzymen vom Typ I oder III, spezifisch innerhalb oder benachbart zu der Erkennungssequenz. Restriktionsverdau von DNA in kleinen Fragmenten mittels Endonukleasen ist ein Standardverfahren in der Molekularbiologie (D. Bloch K, 1995).

Für diesen Vorgang benötigen die Endonukleasen kein energiereiches ATP, sondern lediglich Mg^{2+}-Ionen als Cofaktoren . Die Effizienz einer Restriktionsspaltung ist abhängig von den Reaktionsbedingungen. Für jede Restriktionsendonuklease gibt es optimale Inkubationstemperaturen und Reaktionspuffer (McClelland M et al., 1988).

Ein typischer Restriktionsansatz mit einem Volumen von 10 µl sieht folgendermaßen aus:

- 5 - 8 µl DNA-Lösung (in TBE-Puffer oder Wasser)
- 1 µl 10x Reaktions-Puffer
- 0,8 µl Restriktionsenzym (5 U/ µl)
- 3,2 - 0,2 µl steriles bidest. Wasser

Bei einigen Restriktionsenzymen muss darauf geachtet werden, dass die Glycerinkonzentration im Reaktionsansatz unter 5% liegt, damit es nicht zu einem Verlust der Hydrolyseaktivität oder zu unspezifischen Spaltungen kommt. Da die Glycerinkonzentration im Lagerungspuffer der Enzyme meistens 50% beträgt, muss die eingesetzte Enzymmenge weniger als 1/ 10 des Gesamtvolumens des Restriktionsansatzes betragen.

Bei größeren Spaltungsansätzen werden die eingesetzten Mengen der einzelnen Komponenten vervielfältigt. Die Ansätze werden 60 - 90 min bei der vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss daran erfolgt bei Bedarf eine Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzyms im Reaktionsansatz (10 min 65°C) oder eine Trennung des Enzyms von der DNA-Lösung durch eine Reinigungs-Methode. Der Restriktionsansatz kann danach für Gelelektrophoresen oder Klonierungen verwendet werden.
Die Erkennungssequenzen sind gewöhnlich, aber nicht immer, 4 bis 6 Nukleotide lang und werden normalerweise durch eine Symmetrie charakterisiert (die 5 ' zu 3 ' Nukleotidsequenz eines DNA-Stranges ist gleich der Nukleotidsequenz des komplementären Stranges, z.B.

5' G↓G-A-T-C-C 3 ' 3'-C-T-A-G↓G 5 '). Endonukleasen mit den gleichen Erkennung - sequenzen werden Isoschizomere genannt (Roberts RJ, 1994). Mehr als 600 Arten der Typ-II Restriktions-Endonukleasen wurden bereits isoliert.

Wir verwendeten in unserer Studie die Endonuklease Eae I der Firma Boehringer Mannheim mit der Erkennungssequenz Py↓GGCCPu bzw. PuCCGG↓Py .

Das dazu verwendete Protokoll sah wie folgt aus:

- 6 µl cDNA-Lösung
- 2 µl 10x Reaktions-Puffer
- 2 µl Restriktionsenzym (Eae I)
- 13 µl steriles bidest. Wasser

Das Gemisch wurde für 4 Stunden bei 37°C und für 10 Minuten bei 65°C verdaut. Bis zur elektrophoretischen Auftrennung (20 %iges Polyacrylamidgel, siehe Tabelle 2-4) wurde das Gemisch bei 4°C konserviert.

Kapitel 3

3 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung dargestellt.

Der Ablauf unserer Untersuchung war wie folgt konzipiert:

- DNA – Extraktion
- PCR
- SSCP
- Sequenzierung
- Restriktionsverdau

Nach diesem Konzept werden im weiteren Verlauf dieses Kapitels die Ergebnisse demonstriert und am Ende zusammengefasst.

3.1 DNA – Extraktion

DNA wurde aus Lymphozyten des zur Verfügung gestellten EDTA – Blutes gewonnen. Die Konzentration der DNA betrug im Durchschnitt 0,95 µg/ µl (0,5-1,33 µg/ µl). Diese wurde dann auf 0,2 µg/ µl verdünnt.

3.2 DNA – Amplifikation (PCR)

Zur molekulargenetischen Untersuchung wurden vier PCRs etabliert. Dabei wurde die Promotorregion in zwei bzw. drei kleinere überlappende Regionen aufgeteilt (siehe Kap. 2.3.2) und diese amplifiziert.

In Abbildung 3-1 ist das 8%ige Gel der PCR mit den verwendeten Primern P1 / P2 dargestellt. Mit einem Pfeil markiert ist die Bande des amplifizierten Fragments mit einer Länge von 277 bp. Dieses Fragment entspricht dem Genort 4677-4953 auf der Promotorregion des hGH-1-Gens.

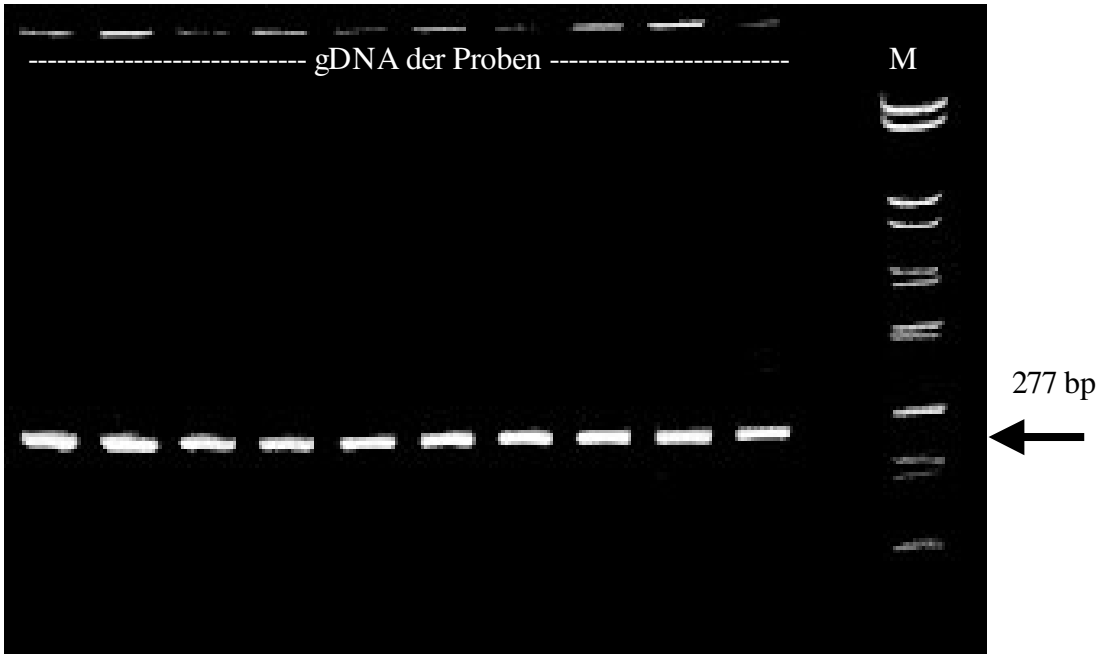


Abbildung 3-1: Page der PCR mit dem Primerpaar P1 / P2; M= DNA – Molekularmarker VI, gDNA= genomische DNA

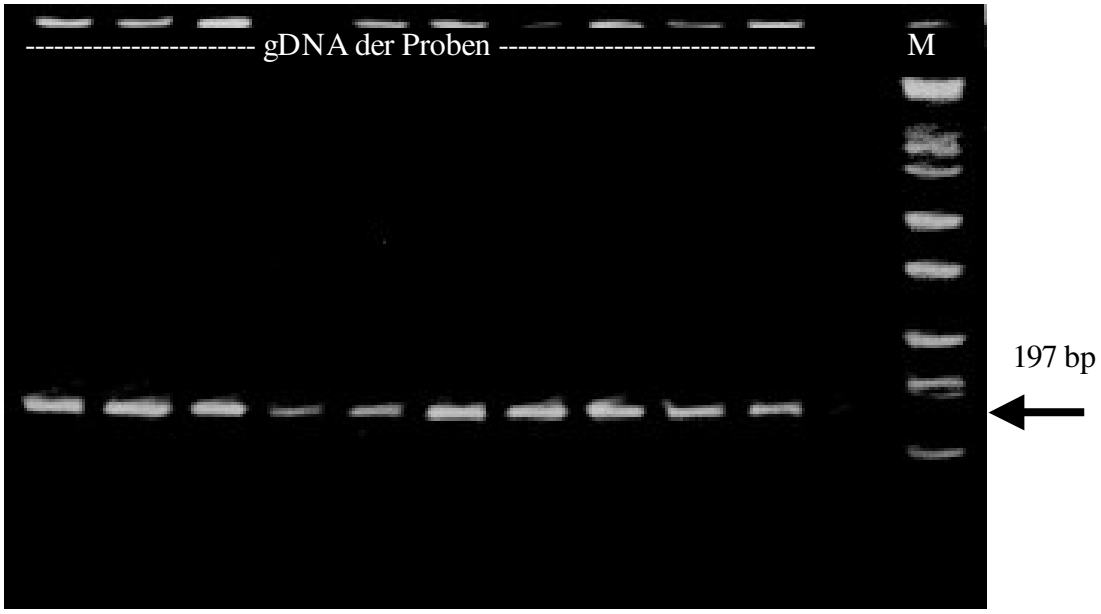


Abbildung 3-2: Page der PCR mit dem Primerpaar P3 / P4; M= DNA – Molekularmarker VI, gDNA= genomische DNA

In Abbildung 3-2 ist das 8%ige Gel der PCR mit den verwendeten Primern P2 / P3 dargestellt. Mit einem Pfeil markiert ist die Bande des amplifizierten Fragments mit einer Länge von 197 bp. Dieses Fragment entspricht dem Genort 4934-5130 auf der Promotorregion des hGH-1-Gens.

Im Weiteren erfolgt die Darstellung der PCRs, welche mit biotinisierten Primern durchgeführt wurden, um sie der Sequenzierung zugänglich zu machen.

In Abbildung 3-3 ist das 8%ige Gel der PCR mit den verwendeten Primern $P1_{Biotin}$ / P2 (bzw. P1 / $P2_{Biotin}$) abgebildet. Mit einem Pfeil markiert ist die Bande des amplifizierten Fragments mit einer Länge von 278 bp (bzw. 277 bp). Dieses Fragment entspricht dem Genort 4676(4677)-4953 auf der Promotorregion des hGH-1-Gens.

In Abbildung 3-4 ist das 8%ige Gel der PCR mit den verwendeten Primern $P3_{Biotin}$ / P4 (bzw. P3 / $P4_{Biotin}$) dargestellt. Mit einem Pfeil markiert ist die Bande des amplifizierten Fragments mit einer Länge von 194 bp. Dieses Fragment entspricht dem Genort 4937 (4934)- 5130 (5127) auf der Promotorregion des hGH-1-Gens.

In Abbildung 3-5 ist das 8%ige Gel der PCR mit den verwendeten Primern $P1_{Biotin}$ / P4 (bzw. P1 / $P4_{Biotin}$) abgebildet. Mit einem Pfeil markiert ist die Bande des amplifizierten Fragments mit einer Länge von 455 bp (bzw. 451 bp). Dieses Fragment entspricht dem Genort 4676(4677)-5139(5127) auf der Promotorregion des hGH-1-Gens.

Eine weitere PCR wurde im Laufe der Studie etabliert, welche für den Restriktionsverdau verwendet wurde. In Abbildung 3-6 ist das 8%ige Gel der PCR mit den verwendeten Primern P5 / P6 abgebildet. Mit einem Pfeil markiert ist die Bande des amplifizierten Fragments mit einer Länge von 167 bp. Dieses Fragment entspricht dem Genort 4847-5013 auf der Promotorregion des hGH-1-Gens.

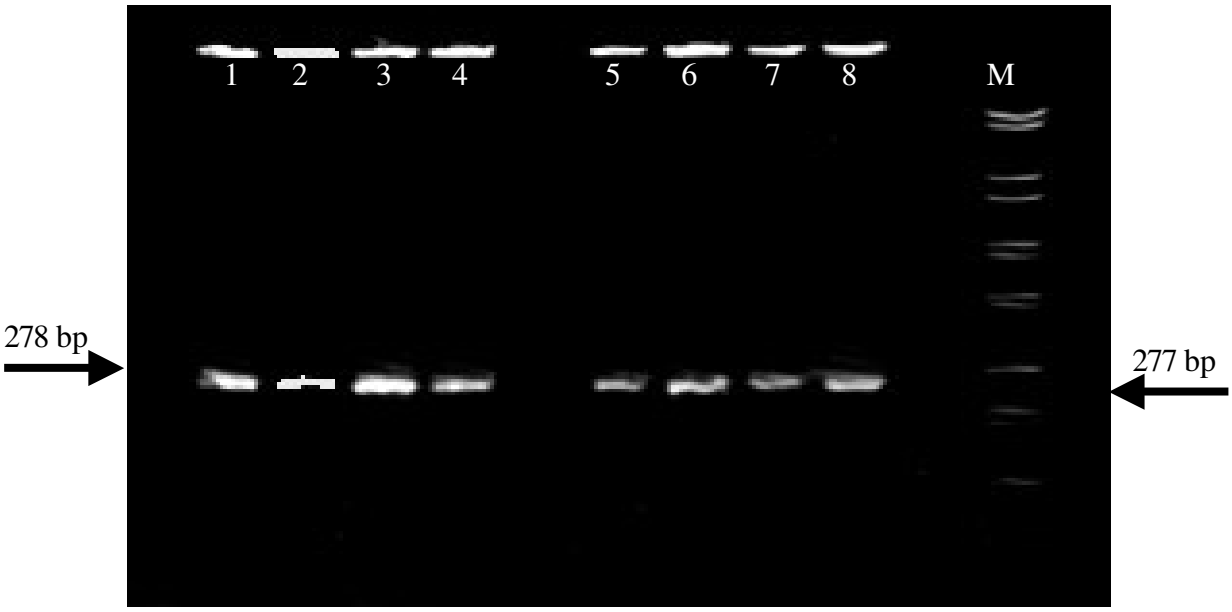


Abbildung 3-3: Page der PCR mit dem Primerpaar $P1_{Biotin}$ / P2 Proben 1-4, Primerpaar P1 / $P2_{Biotin}$ Proben 5-8; M = DNA - Molekularmarker VI.

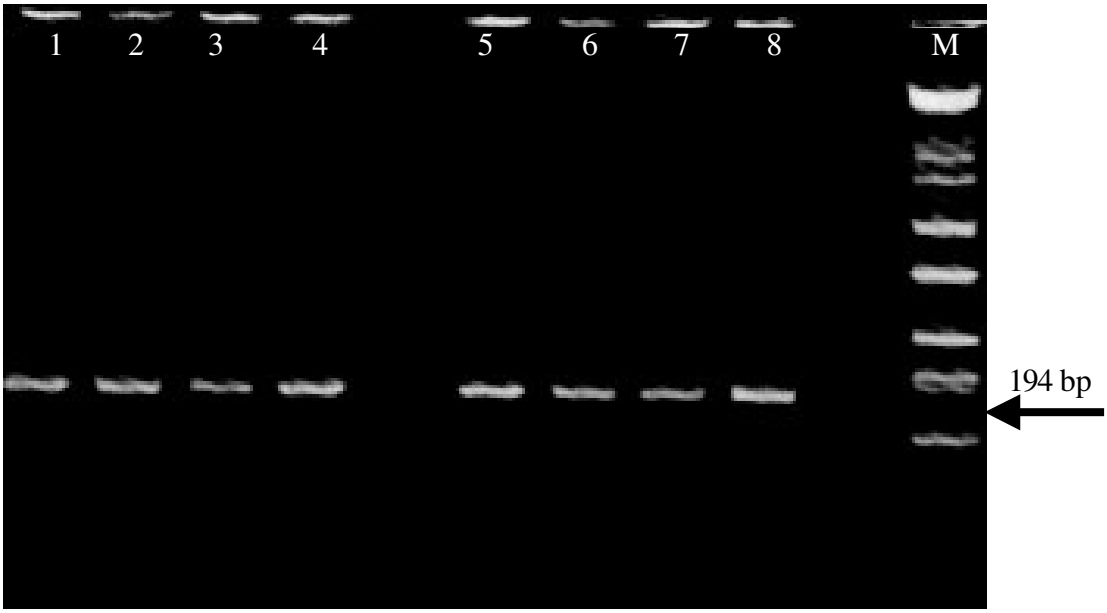


Abbildung 3-4: Page der PCR mit dem Primerpaar P3 / $P4_{Biotin}$ Proben 1-4, Primerpaar $P3_{Biotin}$ / P4 Proben 5-8; M = DNA - Molekularmarker VI.

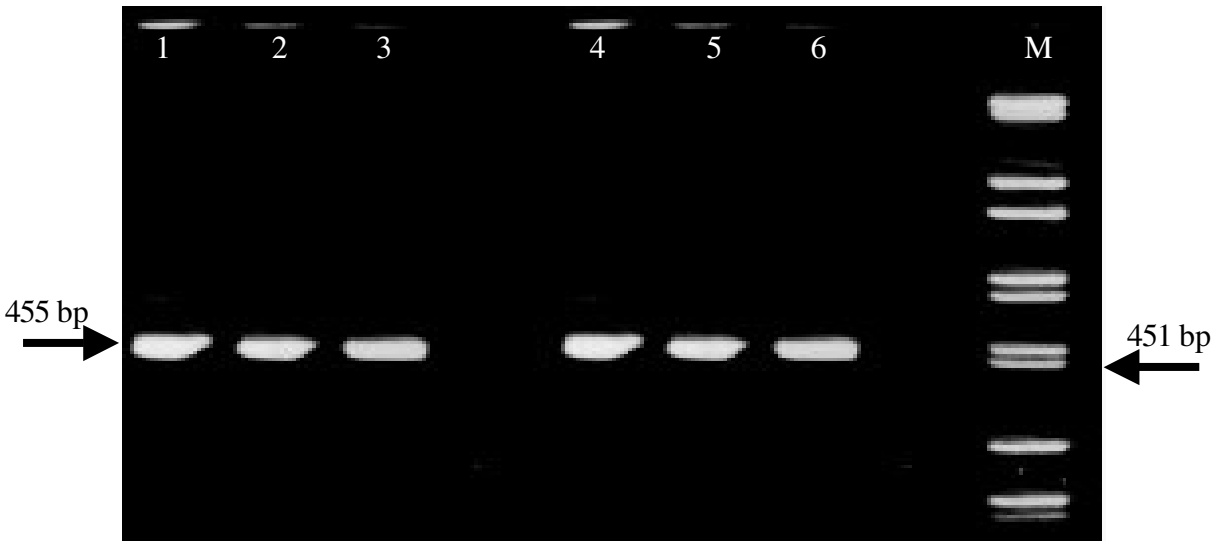


Abbildung 3-5: Page der PCR mit dem Primerpaar P1 $_{Biotin}$ / P4 Proben 1-3, Primerpaar P1 / P4 $_{Biotin}$ Proben 4-6; M = DNA - Molekularmarker VI.

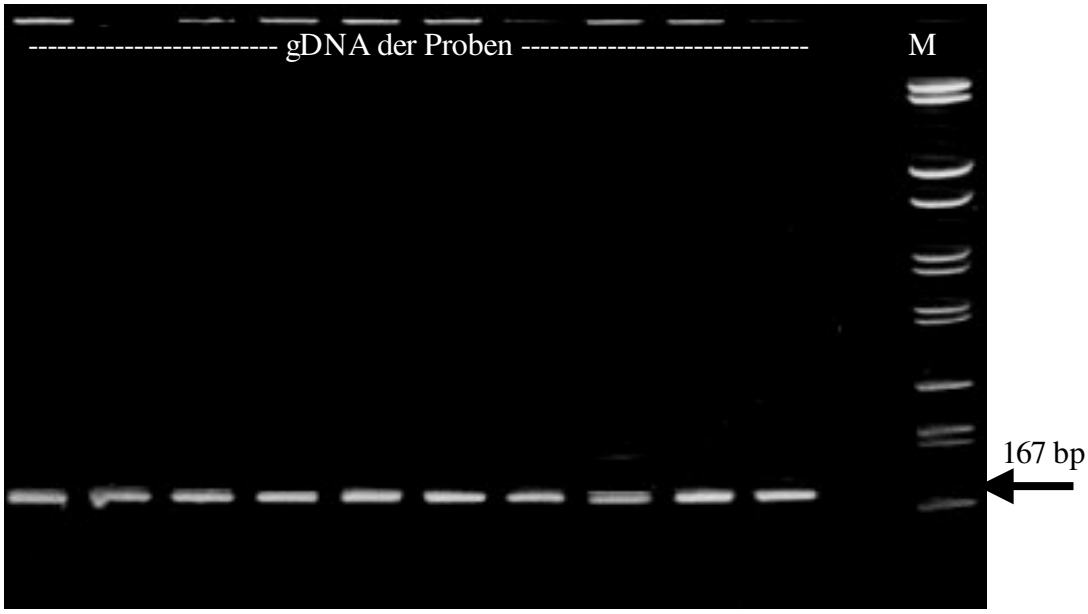


Abbildung 3-6: Page der PCR mit dem Primerpaar P5 / P6; M = DNA - Molekularmarker VI.

3.3 SSCP – Analyse

Nachdem die PCR-Produkte amplifiziert worden waren, wurden für die PCRs mit den Primern P1/ P2, P3/ P4 und P5/ P6 drei SSCPs etabliert. Es wurde danach eine Polymorphismen-Analyse der Probanden und Kontrollen mittels dieser Methode durchgeführt.

Im Weiteren werden die detektierten Polymorphismen für jede PCR separat dargestellt und die Häufigkeit des Auftretens der jeweiligen Polymorphismen beschrieben.

In Tabelle 3-1 werden ,zusammenfassend für alle SSCPs, die Häufigkeit der Haplotypen und die Hetero- bzw. Homozygotenfrequenz bei den Probanden und Kontrollen dargestellt.

In Abbildung 3-7 werden die Polymorphismen dargestellt, welche nach der gelelektrophoretischen Auftrennung mittels SSCP detektiert wurden.

SSCP-Analyse der PCR P1 / P2

Es konnten für diese Region 6 Haplotypen detektiert werden. Wir benannte die einzelnen Allele zur besseren Unterscheidung mit den Grossbuchstaben A / B / C. Die Haplotypen traten bei den Probanden mit einer Häufigkeit von 40,9%(A/ B) : 27,3%(B/ B) : 13,6%(B/ C) : 9,1%(A/ A) : 9,1%(A/ C) : 0%(C/ C) auf; die Heterozygotenfrequenz lag bei 63,6%. In der Kontrollgruppe traten diese mit einer Häufigkeit von 49,1%(A/ B) : 23,6%(B/ B) : 16,4%(B/ C) : 7,3%(A/ C) : 3,6%(C/ C) : 0%(A/ A) auf; die Heterozygotenfrequenz lag bei 72,7%.

SSCP-Analyse der PCR P3 / P4

Es konnten für diese Region 3 Haplotypen detektiert werden. Wir benannte die einzelnen Allele zur besseren Unterscheidung mit den Grossbuchstaben D / E. Die Haplotypen traten bei den Probanden mit einer Häufigkeit von 77,3%(D/ D) : 13,6%(D/ E) : 9,1%(E/ E) auf; die Heterozygotenfrequenz lag bei 13,6%. In der Kontrollgruppe traten diese mit einer Häufigkeit von 67,3%(D/ D) : 32,7%(D/ E) :0%(E/ E) auf; die Heterozygotenfrequenz lag bei 32,7%.

SSCP-Analyse der PCR P5 / P6

Es konnten für diese Region 2 Haplotypen detektiert werden. Die einzelnen Allele wurden zur besseren Unterscheidung mit den Grossbuchstaben F / G benannt. Die Haplotypen

traten bei den Probanden mit einer Häufigkeit von 56,5%(F/ F) : 43,5%(F/ G) auf; die Heterozygotenfrequenz lag bei 43,5%. In der Kontrollgruppe traten diese mit einer Häufigkeit von 53,3%(F/ F) : 46,7%(F/ G) auf; die Heterozygotenfrequenz lag bei 46,7%.

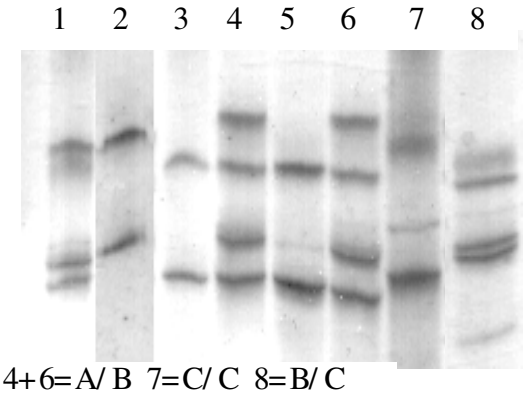
	SSCP 1 (P 1/ P 2)	A/ A	A/ B	A/ C	B/ B	B/ C	C/ C	Heterozygote
Probanden		9,1 %	40,9 %	9,1 %	27,3 %	13,6 %	0 %	63,6 %
Kontrollen		0 %	49,1 %	7,3 %	23,6 %	16,4 %	3,6 %	72,7 %
	SSCP 2 (P 3/ P 4)	D/ D	D/ E	E/ E				Heterozygote
Probanden		77,3 %	13,6 %	9,1 %				13,6 %
Kontrollen		67,3 %	32,7 %	0 %				32,7 %
	SSCP 3 (P 5/ P 6)	F/ F	F/ G					Heterozygote
Probanden		56,5 %	43,5 %					43,5 %
Kontrollen		53,3 %	46,7 %					46,7 %

Tabelle 3-1: Heterozygotenfrequenz und Häufigkeit der Haplotypen bei Probanden und Kontrollen nach Durchführung dreier SSCPs. Mit A-G sind die einzelnen Allele benannt.

Detektion der Polymorphismen der Promotorregion mittels SSCP

SSCP 1

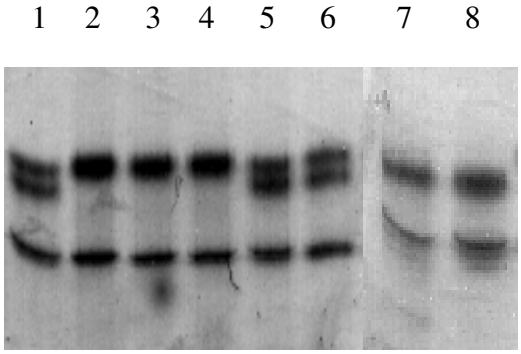
- PCR-Amplifikate der PCR mit dem Primerpaar P 1/ P 2
- 6 Haplotypen konnten beschrieben werden



1= A/ C 2= A/ A 3+5= B/ B 4+6= A/ B 7= C/ C 8= B/ C

SSCP 2

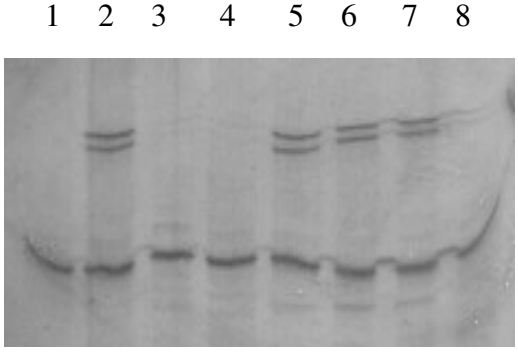
- PCR-Amplifikate der PCR mit dem Primerpaar P 3/ P 4
- 3 Haplotypen konnten beschrieben werden



1+5+6= D/ E 2+3+4= D/ D 7+8= E/ E

SSCP 3

- PCR-Amplifikate der PCR mit dem Primerpaar P 5/ P 6
- 2 Haplotypen konnten beschrieben werden



1+3+4+8 = F/ F 2+5+6+7 = F/ G

Abbildung 3-7: Polymorphismen an der Promotorregion des WH-Gens, welche mittels SSCP detektiert wurden; die Buchstaben A-G stehen für das jeweilige Allel.

3.4 Sequenzierergebnisse

Nach der Detektion der Polymorphismen mittels SSCP, wurden ausgewählte Fragmente exemplarisch sequenziert, um die genaue Sequenz im Vergleich zu der veröffentlichten Sequenz von Chen et al. zu beschreiben. Dabei wurde die Analyse der Promotorregion mittels sechs Sequenzierprimern durchgeführt (Abbildung 2-2, Kapitel 2.3.2).

Es konnten sechs Polymorphismen mit einem Basenaustausch und einer mit einem Austausch von drei Basen detektiert werden. Bis auf einen (in der NF-I-box), lagen alle übrige detektierte Polymorphismen außerhalb der Regionen mit bekannten cis-Elementen.

Der Genort und die Sequenzen der Polymorphismen werden im Einzelnen in Tabelle 3-2 beschrieben und in Abbildung 3-8 in der Gesamtheit demonstriert. Die Abbildungen 3-9a und 3-9b veranschaulichen die autoradiographischen Ergebnisse der sequenzierten Polymorphismen.

Polymorphismus	Lokus (bp)	Sequenz (Chen et al.)	Sequenzierergebnis	Primer
1)	**4842**	**T**	**T/ A**	**P 1 – P 2**
2)	**4856**	**T**	**G**	
3)	**4863**	**T**	**G**	
4)	**4886**	**G**	**G/ T**	
5)	**4889-4891**	**CAG**	**CAG/ AGA**	
6)	**5089**	**A**	**A/ G**	**P3 – P4**
7)	**5107**	**G**	**G/ T**	

Tabelle 3-2: Genlokus und Sequenz der Polymorphismen im Vergleich zur veröffentlichten Sequenz von Chen et al..

Nach dem Sequenzieren der exemplarisch ausgewählten Fragmente, konnte jedem Allel eine spezifische Sequenz zugeordnet werden. Im Fragment mit 277 bp (SSCP 1) wurden fünf Polymorphismen und im Fragment mit 197 bp (SSCP 2) zwei Polymorphismen entdeckt. Für

das Allel A wurden vier Polymorphismen gefunden: T→G (Genort 4856), T→G (Genort 4863), T→G (Genort 4886) und der Austausch von 3 Basen CAG→AGA (Genort 4889-4891). Dem Allel B konnte der Polymorphismus T→G (Genort 4856) und T→G (Genort 4863) zugewiesen werden. Allel C entsprach sich in der Sequenz mit Allel A, jedoch wurde zusätzlich noch der Polymorphismus A→C (Genort 4842) gefunden. Das Allel D entsprach der veröffentlichten Sequenz von Chen et al.. Für das Allel E konnten die Polymorphismen A→G (Genort 5089) und G→G (Genort 5107) beschrieben werden.

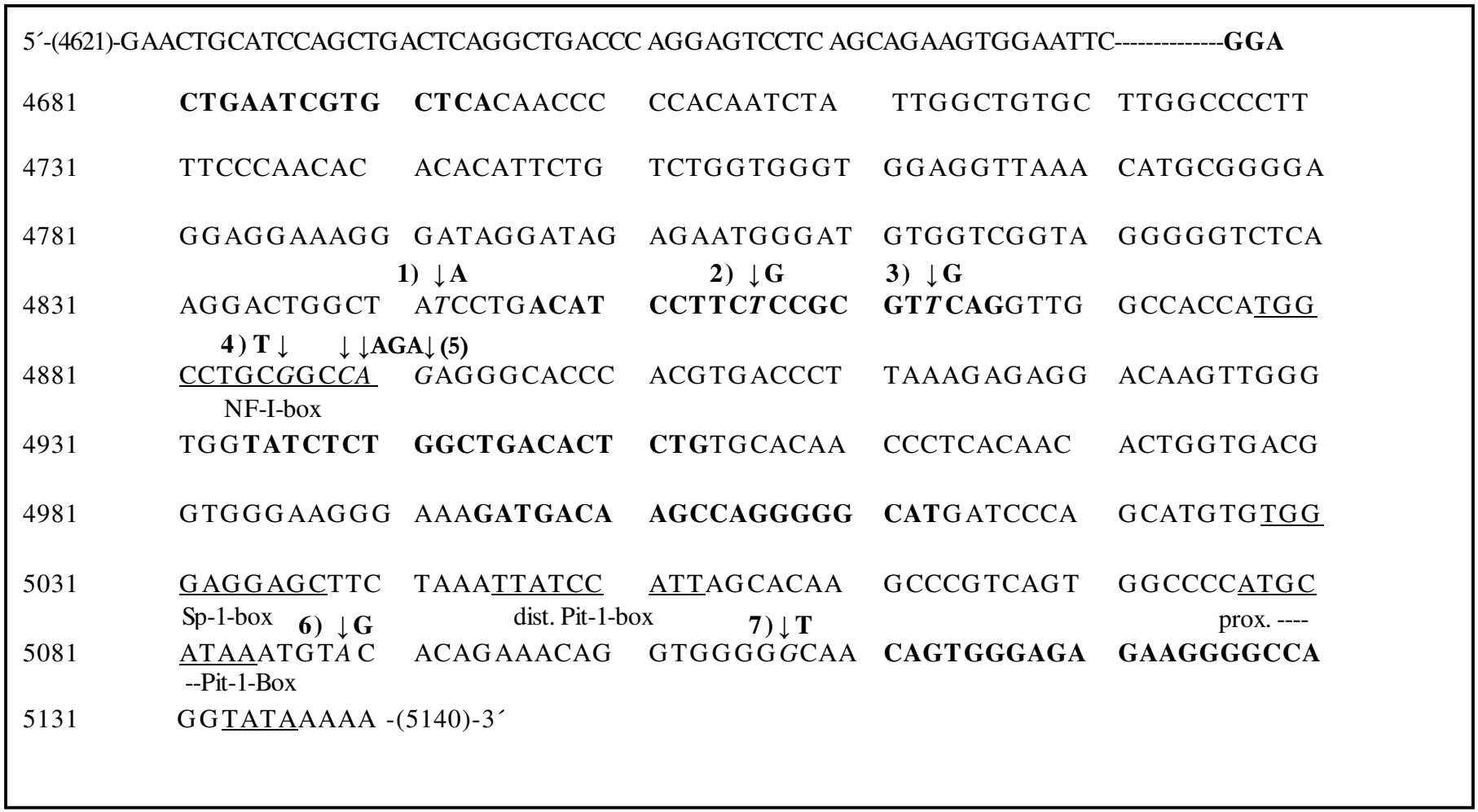


Abbildung 3- 8: Darstellung der Polymorphismen an der Promotorregion des WH-Gens im Vergleich zur Sequenz von Chen et al.. Diese sind nummeriert von 1-7; dick markiert sind die verwendeten Primer; unterstrichen sind die Konsensus-Bindungssequenzen der cis -Elemente. Polymorphismus **4)** wurde durch Restriktionsverdau genauer untersucht.

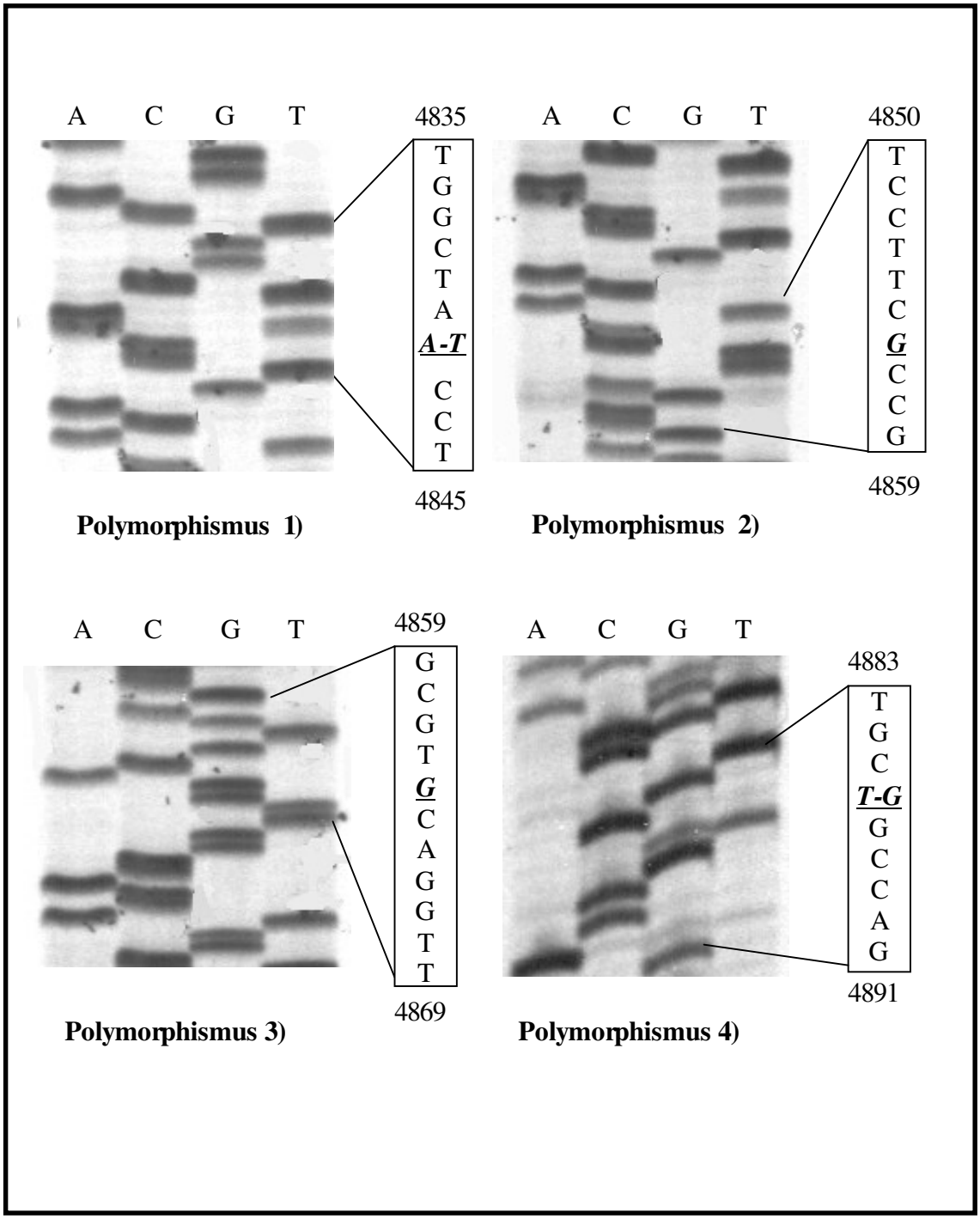


Abbildung 3-9a: Sequenzierergebnisse der Polymorphismen 1-4; schräg und unterstrichen der jeweilige Basenaustausch.

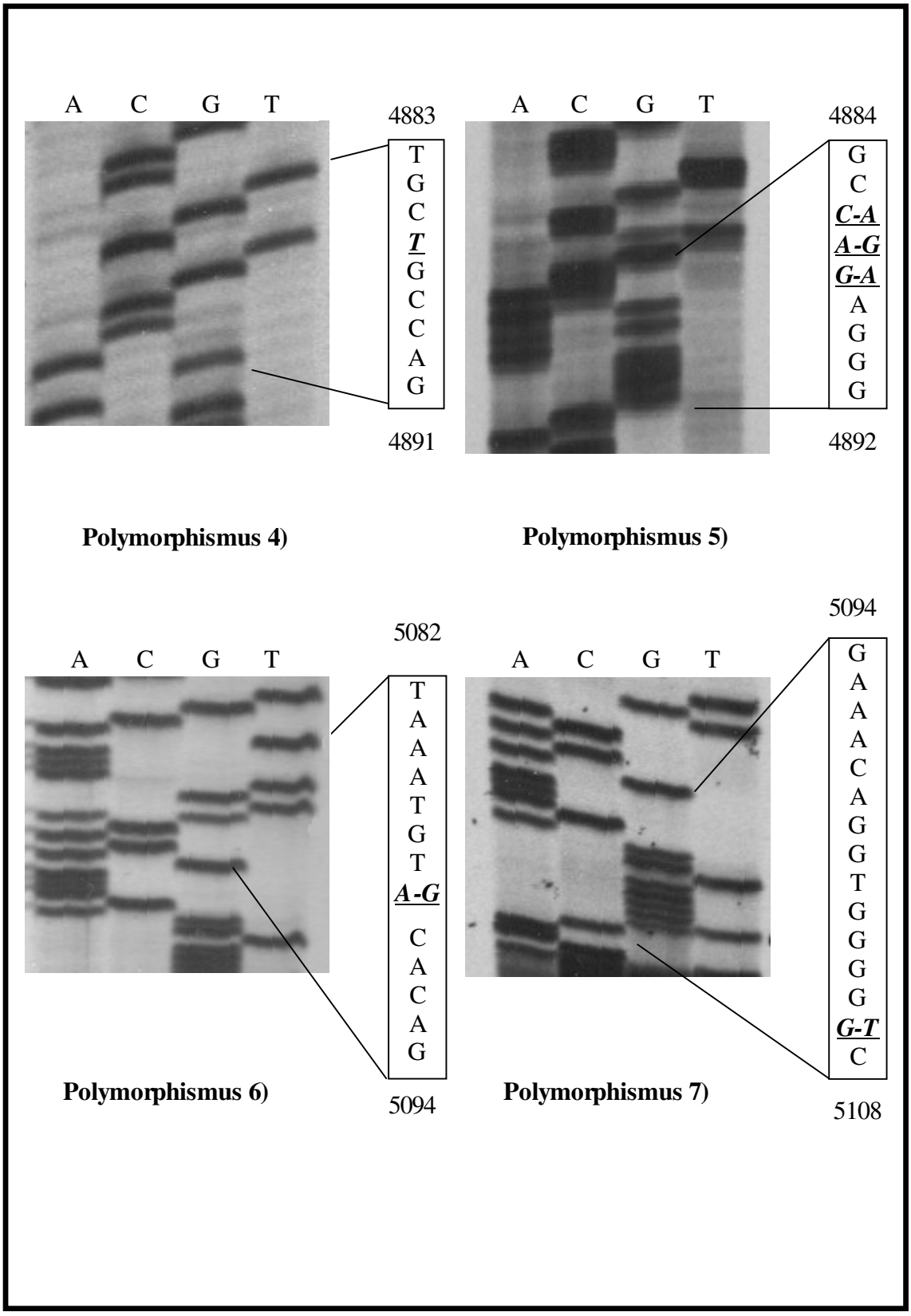


Abbildung 3-9b: Sequenzierergebnisse der Polymorphismen 4-7; schräg und unterstrichen der jeweilige Basenaustausch.

3.5 Restriktionsverdau

Da alle Polymorphismen bis auf einen, welcher in der NF-I-Box lag, außerhalb von bekannten cis-Elemente der Promotorregion des hGH-1-Gens lagen, erschien uns dieser Polymorphismus –wegen möglicher funktioneller Bedeutung- interessant.

Durch das Enzym Eae I wurde die Region, je nach Sequenz, in zwei oder drei Fragmente gespalten. Die Stellen, an denen das Enzym seinen Verdau bewerkstelligte, und die dadurch entstandenen Fragmente werden in Abbildung 3-11 dargestellt. In der untersuchten Region mit einer Länge von 167 bp (PCR mit Primerpaar P 5/ P 6) gab es je nach Sequenz zwei Verdauungsstellen. Ein Verdau fand bei jeder der Proben statt und zwar zwischen den Nukleotiden 4869 und 4870. Die andere Verdauungsstelle befand sich in der NF 1-Box und zwar zwischen den Nukleotiden 4885 und 4886. Die Voraussetzung für diesen Verdau lag in der Präsenz der Base G am Nukleotid 4886. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung erkannte man vier Banden für den Haplotyp F/ G bzw. zwei für F/ F der SSCP 3 (Abb. 3-12). Beim zweifachen Verdau (Allel enthielt Nukleotid 4886 = G) entstanden drei kleinere Fragmente mit einer Länge von 23 bp, 16 bp und 128 bp. Beim einfachen Verdau (Nukleotid 4886 = T) entstanden zwei Fragmente mit einer Länge von 23 und 144 bp. Somit konnten wir dem Polymorphismus der SSCP 3 (siehe 3.3) F/ F die Basen T/ T an Nukleotid 4886 und dem Polymorphismus F/ G die Basen T/ G zuweisen. Die Verteilung der Sequenz an Nukleotid 4886 bei Probanden und Kontrollen (Tab 3-3) entspricht demnach der Verteilung der Polymorphismen der SSCP 3.

Gruppen	T/ T	G/ T
Probanden	56,5 %	43,5 %
Kontrollen	53,3 %	46,7 %

Tabelle 3-1: Häufigkeit des Polymorphismus 4 (Genlokus 4886) bei Probanden und Kontrollen

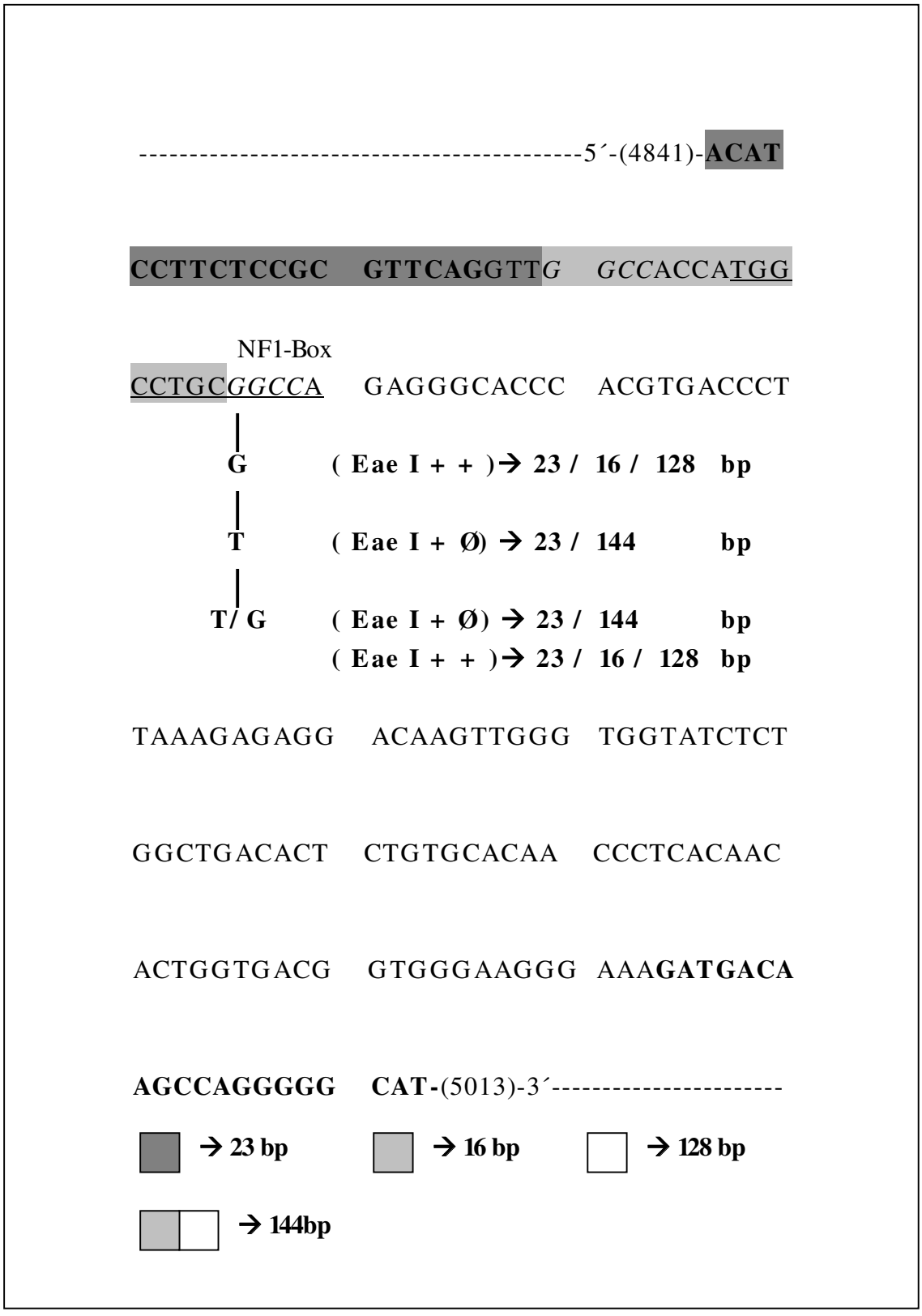


Abbildung 3-10: Erkennungssequenzen (kursiv) des Enzyms Eae I und die nach dem Restriktionsverdau an der NF 1-Box entstandenen Fragmente (je nach Sequenz); + = Verdau, Ø = kein Verdau (Polymorphismus T statt G)

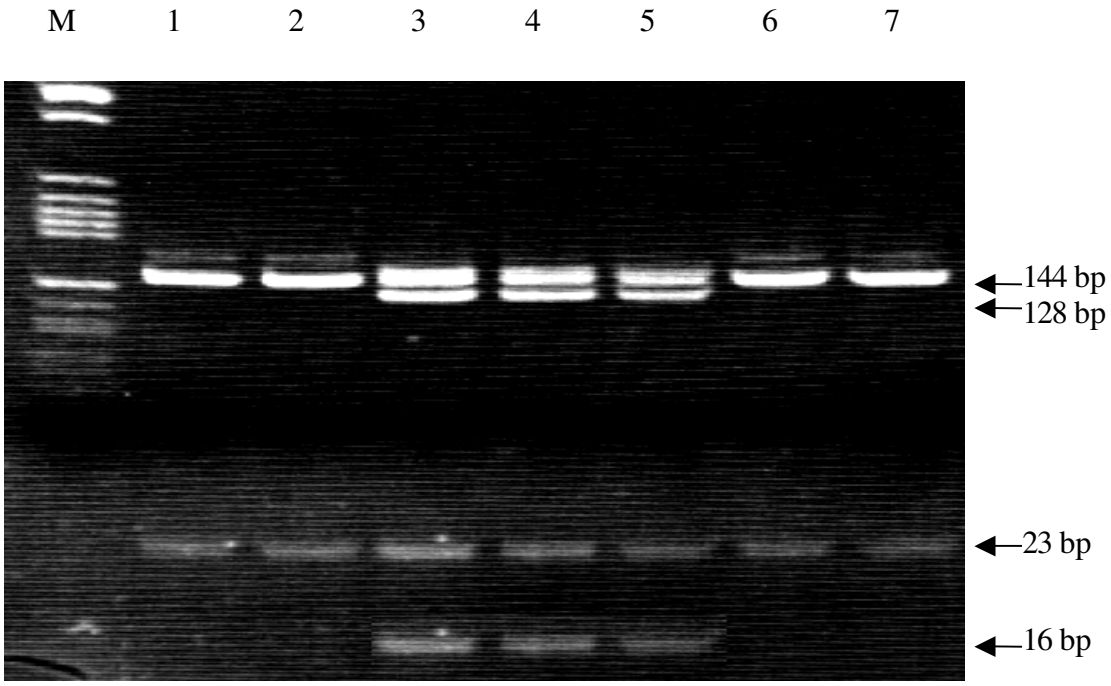


Abbildung 3-11: Restriktionsverdau mit EaeI der PCR mit dem Primerpaar P5/ P6; Sampler 1+2+6+7 = 2 Fragmente (homozygoter Polymorphismus T/ T, 144/ 23 bp), Sampler 3-5 = 2 bzw. 3 Fragmente (heterozygoter Polymorphismus T/ G, Fragmente 144/ 128/ 23/ 16 bp); M= Molekularmarker V.

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Untersucht wurde die Promotorregion des hGH-1-Gens bei 23 Probanden (8 Familien) und die Ergebnisse wurden mit 60 Kontrollen verglichen. Dazu wurde die Promotorregion in zwei Regionen geteilt (277/ 197 bp). Nach dem Etablieren zweier PCRs wurden diese einer SSCP-Analyse unterzogen. Es konnten, für das Fragment mit 277 bp, 6 Haplotypen detektiert werden. Die Haplotypen der Probanden traten mit einer Häufigkeit von 40,9 % (A/ B) : 27,3 % (B/ B) : 13,6 % (B/ C) : 9,1 % (A/ A) : 9,1 % (A/ C) : 0 % (C/ C) auf. Die der Kontrollgruppe traten mit einer Häufigkeit von 49,1 % (A/ B) : 23,6 % (B/ B) : 16,4 % (B/ C) : 7,3 % (A/ C) : 3,6 % (C/ C) : 0 % (A/ A) auf. Für das Fragment mit 197 bp detektierten wir 3 Haplotypen . Die Haplotypen der Probanden traten mit einer Häufigkeit von 77,3 % (D/ D) : 13,6 % (D/ E) : 9,1 % (E/ E) auf. Die der Kontrollgruppe traten mit einer Häufigkeit von

67,3% (D/ D) : 32,7 % (D/ E) : 0 % (E/ E) auf. Nach dem Sequenzieren konnten sechs Polymorphismen mit einem Basenaustausch und einer mit einem Austausch von drei Basen detektiert werden. Im Fragment mit 277 bp (SSCP 1) wurden fünf Polymorphismen (A→C (4842), T→G (4856), T→G (4863), T→G (4886) und CAG→AGA (4889-4891) und im Fragment mit 197 bp (SSCP 2) zwei Polymorphismen (A→G (5089) und G→G (5107)) entdeckt. Bis auf einen (in der NF-I-box), lagen alle übrige detektierte Polymorphismen außerhalb der Regionen mit bekannten cis-Elementen. Alle Varianten wurden sowohl bei Probanden, als auch bei den Kontrollen gefunden. Da uns der Polymorphismus in der NF-I-Box, wegen möglicher funktioneller Bedeutung, wichtig erschien, wurde diese Region weiter untersucht. Wir etablierten eine PCR (Fragmentlänge 167 bp), welche alle Polymorphismen, bis auf den in der NF 1-Box, überschrieb und führten ebenfalls eine SSCP-Analyse durch. In der SSCP fanden wir 2 Haplotypen (F/ F und F/ G). Die Haplotypen der Probanden traten mit einer Häufigkeit von 56,5 % (F/ F) : 43,5 % (F/ G) auf. Die der Kontrollgruppe traten mit einer Häufigkeit von 53,3 % (F/ F) : 46,7 % (F/ G) auf. Nach dem Restriktionsverdau konnte für den Polymorphismus F/ F die homozygote Variante T/ T und für F/ G die Variante T/ G zugeordnet werden. Ein signifikanter Unterschied der Häufigkeit bestimmter Veränderungen an der Promotorregion des hGH-1-Gens war bei Probanden und Kontrollen nicht nachweisbar.

Kapitel 4

4 Diskussion

Der familiäre Kleinwuchs gehört, wie die konstitutionelle Entwicklungsverzögerung, zu den Normvarianten des Wachstums. Normale Geburtsmaße, normale Proportionen, normale Ernährung und keine hormonelle Störung sind Minimalkriterien zur Feststellung einer Normvariante (Ranke MB, 2001).

Die Ursache für den familiären Kleinwuchs ist bisher noch nicht bekannt.

4.1 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Studie wurde die Promotorregion des hGH-1-Gens (-547 bp bis –95 bp) bei 23 Probanden (8 Familien) untersucht. Beim Kollektiv der Probanden handelte es sich um extrem kleinwüchsige Menschen. Die Ergebnisse wurden mit einer Kontrollgruppe (n=60) bestehend aus Kindern mit Ullrich-Turner- und Adrenogenitalem-Syndrom verglichen. Beide Syndrome sind zwar mit Kleinwuchs assoziiert, jedoch liegt die Ursache beim Ullrich-Turner-Syndrom in einem genetischen Defekt am Geschlechtschromosom und beim Adrenogenitalem-Syndrom in einem Enzymdefekt der Nebennierenrinde.

Zur Untersuchung wurde die Promotorregion des hGH-1-Gens in zwei Regionen geteilt (277 bp und 197 bp). Nach dem Etablieren zweier PCRs wurden diese einer SSCP-Analyse unterzogen.

Nach der SSCP-Analyse erkannten wir, dass es sich bei der Promotorregion des hGH-1-Gens um eine sehr polymorphe Region handelt.

Für das Fragment mit 277 bp konnten 6 Haplotypen detektiert werden. Alle Varianten wurden sowohl bei Probanden, als auch bei den Kontrollen gefunden. Die Haplotypen in der Gruppe der Probanden traten mit einer Häufigkeit von 40,9 % (A/ B) : 27,3 % (B/ B) : 13,6% (B/ C) : 9,1 % (A/ A) : 9,1 % (A/ C) : 0 % (C/ C). Die in der Kontrollgruppe traten mit einer Häufigkeit von 49,1 % (A/ B) : 23,6 % (B/ B) : 16,4 % (B/ C) : 7,3 % (A/ C) : 3,6 % (C/ C) : 0% (A/ A). Für das Fragment mit 197 bp detektierten wir 3 Haplotypen . Die Haplotypen in der Gruppe der Probanden traten mit einer Häufigkeit von 77,3 % (D/ D) : 13,6 % (D/ E) :

9,1 % (E/ E). Die in der Kontrollgruppe traten mit einer Häufigkeit von 67,3% (D/ D) : 32,7 % (D/ E) : 0 % (E/ E).
Zur eindeutigen Identifizierung der Polymorphismen wurden exemplarisch Fragmente ausgewählt und sequenziert. Somit konnten wir einem Allel eine spezifische Sequenz zuweisen. Nach dem Sequenzieren konnten sechs Polymorphismen mit einem Basenaustausch (T-385A, T-369G, T-362G, G-339T, A-136G und G-118T) und einer mit einem Austausch von drei Basen (–336 bp bis –334 bp, CAG→AGA) im Vergleich zur Konsensussequenz von Chen et al. detektiert werden. Dieses Ergebnis bestätigten die Beobachtung, welche wir schon nach der SSCP-Analyse gemacht haben: Die Promotorregion des hGH-1-Gens ist sehr polymorph. Bis auf einen (in der NF-I-box), lagen alle übrige detektierte Polymorphismen außerhalb der Regionen mit bekannten cis-Elementen (siehe Abb. 3-8 und 3-9 a-b).

Da alle Polymorphismen, bis auf den in der NF-I-Box (G-339T), außerhalb von Regionen mit bekannten cis-Elementen lagen, konzentrierten wir uns im Weiteren auf die Untersuchung der NF-I-Box mittels Restriktionsverdau mit dem Enzym Eae I. Diese Region erschien uns von möglicher funktioneller Bedeutung für die WH-Expression. Sowohl die Variante G-339T als auch die Variante –339T kamen, ohne signifikanten Unterschied, sowohl in der Gruppe der Probanden als auch in der Kontrollgruppe vor.

In einer ähnlichen Studie der Forschungsgruppe um Mullis wurden Polymorphismen im Promotor des hGH-1-Gens bei Patienten mit isoliertem WH-Mangel (IGHD IB) und Normalpersonen beschrieben (Wagner JK et al., 1997). Es wurde die Region des hGH-1-Gens von –1400 bp bis +300 bp erforscht. Insgesamt wurden 38 Mitglieder aus 5 Familien, davon 17 Patienten mit IGHD IB, und 145 nicht verwandte Patienten mit IGHD IB untersucht. Hinzu kamen 78 Kontrollen aus verschiedenen Ländern. Die Region wurde mittels PCR, nichtradioaktivem Sequenzier- und Blottingautomaten analysiert. Es wurden 22 Sequenzvariationen gefunden. Die Mehrzahl 77% (17/ 22) lagen zwischen –550 bp und dem Translationsbeginn bei +1bp. Nur eine Polymorphismus lag innerhalb eines cis-Elementes. Dieser Polymorphismus wurde sowohl bei Patienten als auch bei den Kontrollen gefunden. Von den restlichen Polymorphismen befanden sich 14% (3/ 22) in der Region –1078 bp bis –1074 bp und 9% (2/ 22) im ersten Intron, an Position +76 bp und +219 bp. Somit konnte kein Zusammenhang zwischen Veränderungen an der Promotorregion des hGH-1-Gens und einem isolierten WH-Mangel (IGHD IB) gefunden werden.

Die Arbeit von Wagner JK et al. (1997) hatte zwar eine etwas andere Fragestellung (Patienten mit isoliertem WH-Mangel), jedoch konnten in unserer Studie die meisten Polymorphismen auch gefunden werden. Wir untersuchten die Promotorregion des hGH-1-Gens zwischen –547 bp und –95 bp, wobei +1bp den Translationsbeginn anzeigt. Die aufgefundenen Polymorphismen T-369G, T-362G, G-339T, A-136G und G-118T entsprachen sich mit den gefundenen Polymorphismen von Wagner JK et al. (1997). Wir entdeckten einen weiteren Polymorphismus (T-385A), welchen Wagner JK et al. (1997) nicht gefunden haben. In der Region –336 bp bis –334 bp fanden wir einen Polymorphismus mit einen Austausch von 3 Basen (CAG→AGA), Wagner JK et al. (1997) beschreiben bei –337 bp bis –333 bp einen Polymorphismus mit einem Austausch von 5 Basen (CCAGA→GAGAG). In dem von uns untersuchten Abschnitt wurden 4 weitere (seltene) Polymorphismen entdeckt (Wagner JK et al. , 1997). Eine Deletion (del) bei -537G (2/ 121= 1,65 %), der Polymorphismus G-425T (1/ 102= 0,98 %), del-400G (7/ 49= 14,3%) und T-229C (3/ 145= 2 %).

Auch in der Studie von Giordano M et al. (1997) konnte gezeigt werden, dass die Promoterregion des hGH-1-Gens sehr polymorph ist. Es wurde die Region des hGH-1-Gens von –223 bp bis +39 bp bei 11 Patienten (nicht verwandt) mit isoliertem WH-Mangel und 15 Personen mit normaler Körpergröße untersucht. Die Einschlusskriterien der Patientengruppe waren:
(1) schwere und/ oder früher Beginn der Wachstumsverzögerung, (2) WH-Spiegel im Blut nach Stimulation kleiner 4 ng/ ml, (3) nicht Vorhandensein von Deletionen am GH-Lokus. Die Region wurde mittels PCR, SSCP, Klonen und Sequenzieren analysiert. Es wurden 8 Polymorphismen entdeckt (-136 (A oder G), -118 (G oder T), -68 (A oder G), -63 (A, T oder C), -60 (G oder C), -47 (A oder G), -37 (A oder C), -4 (T oder C)). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen erkannt werden.

Die Polymorphismen A-136G und G-118T wurden in unserer Studie ebenfalls gefunden.

Im Weiteren wurden die Promotorregionen der restlichen 4 Genen des hGH-Genkomplexes (hCS-L, hCS-A, hGH-V und hCS-B) untersucht, um zu erforschen, ob es sich bei diesen auch um sehr polymorphe Regionen handelt. Die fünf Gene des hGH-Genkomplexes sind vollständig sequenziert und sind zu 91-99% sequenzhomolog (Seeburg PH , 1982; Barsh GS et al., 1983; Hirt H et al., 1987; Chen EY et al., 1989). Eine Variation konnte nur im hGH-V-Klon (–68 (A→G) und –63 (A→T)) entdeckt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Promotorregionen der restlichen 4 Genen des hGH-Genkomplexes kaum Polymorphismen

aufweisen. Außerdem wurde erkannt, dass an allen Stellen, an welchen Polymorphismen vorhanden sind, sich die Sequenz des hGH-1-Gens von mindestens einem der vier anderen Genen unterscheidet. Ferner sind die ersetzten Nukleotide identisch zu denen, welche in den plazentaren Genen gefunden wurden. Bemerkenswert ist, dass die Haplotypen der Promotorregion des hGH-1-Gens nicht nur einzelne Nukleotide sondern auch Nukleotid-kombinationen beinhalten, welche in den anderen Genen vorhanden sind. Ein Erklärungsversuch für die Entstehung der Polymorphismen dieser Region ist der Mechanismus der Gen-Konversion zwischen den Genen des hGH-Genkomplexes (Giordano M et al., 1997). Die Gen-Konversion zwischen homologen Genen wurde als der Mechanismus für die gemeinsame Evolution von Gen-Familien, wie im Fall der zwei fetalen Globingene, postuliert (Fitch D et al., 1990).

Unserer Studie zeigte, dass die Promotorregion des hGH-1-Gens sehr polymorph ist. Alle gefundenen Sequenzveränderungen kamen sowohl bei den Probanden, als auch bei den Kontrollen vor. Es konnte kein Polymorphismus gefunden werden, welcher zur Beeinflussung der WH-Expression führt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, ob die Interaktion mehrerer, die Expression beeinflussen könnten. Des weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, ob die gefundenen Polymorphismen der Promotorregion des hGH-1-Gens, welche sich nicht in den bekannten cis-Elemente befinden, durch gewisse Veränderungen der Sekundärstruktur, die Expression stören könnten (Wagner, JK et al., 1997). Weiterhin stellt sich die Frage, ob nur ein Gen an der Regulation der WH-Expression beteiligt ist. Man kann sich gut vorstellen, dass es sich dabei um ein polygenetisches Ereignis handelt. Zu diskutieren ist der Mechanismus der Gen-Konversion zwischen den Genen des hGH-Genkomplexes, wodurch die Polymorphismen der Promotorregion des hGH-1-Gens entstanden sein könnten (Giordano M et al., 1997). Außerdem könnten Veränderungen in der Sekundärstruktur der Gene zu einer Erschwerung der Bindung bestimmter, für die Regulation verantwortlicher, Faktoren führen. Dadurch könnte ebenfalls die Wachstumshormonexpression beeinflusst werden.

4.2 Zukunftsperspektiven

Im vorherigen Abschnitt wurde kurz die Möglichkeit von Veränderungen der Sekundärstruktur der Genen, welche eine Beeinflussung der Regulation der WH-Sekretion haben könnten, erwähnt. Die Forschungsgruppe um Cooke NE stellte in einer Arbeit mit

genmanipulierten Mäusen fest, dass das hGH-Gen durch eine sog. „locus control region“ (LCR) reguliert wird (Jones BK et al., 1995). Bei der LCR handelt es sich um Regionen, welche in einer Entfernung von 7,5 und 40 Kilobasen(kb), dem hGH-Gen vorgeschaltet sind. Diese Regionen enthalten gewebsspezifische DNase I-hypersensitive Stellen (HS). HS sind Bindungsstellen für aktiviertes Chromatin und/ oder steigern die Effizienz klassischer Verstärkerelemente (Promotor). LCRs können eine Klasse von cis-Elementen sein, welche die Chromatinstruktur verändern und die Genexpression aktivieren oder deaktivieren können. In der LCR des hGH wurden 4 HS gefunden, wobei HS I (-14,6 kb) und HS II (-15,4 kb) eine ausschließliche Gewebsspezifität für die Hypophyse aufwiesen. Nach Deletion dieser Elemente wurde ein Verlust der Gewebsspezifität beobachtet. Es wurde somit postuliert, dass ein oder mehrere Elemente (HS) für die Expression des hGH verantwortlich sind. Des weiteren zeigte sich, dass HS I und HS II als Hauptverstärker, während die gemeinsamen Elemente HS III und HS V (Hypophyse und Plazenta) zur Auffaltung des Chromatins und/ oder als Bindungselemente dienen. Solche Veränderungen der Chromatinstruktur könnten den Zugang von Transkriptionsfaktoren zu ihren, die Transkription regulierenden, Sequenzen verstärken. In einer weiteren Arbeit konnte ein Fragment (F 14) der HS I und HS II mit einer Länge von 404 bp, welches sich 15 kb entfernt vom hGH-Promotor befindet, definiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Fragment, welches wichtige cis-Determinanten für die *in vivo* Aktivierung beinhaltet, als Hauptaktivator für die somatotrope Genexpression dient. Die Aktion der hGH LCR, oder zumindest der HS I und HS II Untergruppen, scheinen neue cis-trans-Interaktionen wieder zu spiegeln im Unterschied zu den bekannten cis-trans-Interaktionen in der Promotorregionen des hGH-1-Gens (Bennani-Baïti IM et al, 1998). Des weiteren identifizierte die Forschungsgruppe um Cooke und Liebhaber (1999) im F 14-Fragment (siehe Anlage am Ende der Arbeit) 3 potenzielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (Pit-1-Bindungsstellen), von welchen einige durch ubiquitär vorkommende Transkriptionsfaktoren und nukleären Hormonrezeptoren erkannt werden, was wahrscheinlich zu seiner Funktion beiträgt. Es konnte belegt werden, dass die zwei proximal gelegenen Pit-1-Bindungsstellen bestimmend für die Aktivität der HS I und II in der LCR sind. Trotz Sequenzhomologie der bekannten Pit-1-Bindungsstellen in der hGH-Promotorregion, scheinen die in der LCR vorhandenen sich in ihrem funktionellen Profil zu unterscheiden (Shewchuk BM et al., 1999).

Zum besseren Verständnis der WH-Expression könnte, in diesem Zusammenhang, eine neue Arbeitshypothese folgendermaßen lauten:

Gibt es genetische Veränderungen in der LCR des hGH-1-Gens, welche die WH-Expression beim familiären Kleinwuchs beeinflussen können?

Dies wird sicherlich nicht die letzte Frage in einem sehr komplexen Forschungsgebiet bleiben. Jedoch die Beantwortung dieser wird sicherlich zum besseren Verständnis der Wachstumshormonexpression führen.

4.3 SSCP: eine sensitive Methode zur Detektion von Mutationen

Die SSCP ist eine Methode, welche zur Detektion von Mutationen weit verbreitet ist. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die SSCP mehr als 90 % des Austausches einzelner Basen in Fragmenten mit einer Länge von 200 bp und mehr als 80 % in Fragmenten mit einer Länge von 400 bp detektieren kann (Hayashi K, 1991; Suzuki Y et al., 1990; Gaidano et al., 1991; Sarkar G et al., 1992). Die Sensitivität der SSCP neigt mit ansteigender Länge, der zu untersuchenden Fragmente, zu sinken. Eine vorhandene Mutation in den längeren Fragmenten scheint die Mobilitätsänderung der Einzelstränge nicht zu beeinflussen (Sheffield et al.). Deshalb sollte darauf geachtet werden, dass lange Fragmente in Kleinere gespalten werden (Hayashi K, 1991).

Trotz hoher postulierter Sensitivität, können mit dieser Methode manche Mutationen unter bestimmten elektrophoretischen Bedingungen nicht detektiert werden.
Wichtig ist diese Tatsache bei der Verwendung der SSCP als klinischen Test. Durch den Einsatz von Glycerol kann die Sensitivität bei Raumtemperatur erhöht werden (Hayashi K und Yandell DW,1993). Diese Methode ist immer noch eine der am häufigsten eingesetzten Methoden zur Detektion von Mutationen und wird weiterhin häufig zum Einsatz kommen, sowohl zu Forschungszwecken als auch als Routinelaboruntersuchung zur Untersuchung von Erbkrankheiten und Neoplasien (Ainsworth PJ et al., 1991; Makino R et al., 1992).

4.4 Zusammenfassung der Diskussion

Bestärkt von Studien der Promotorregion verschiedener Gene in der Vergangenheit, in welchen ein Zusammenhang zwischen genetischen Veränderungen in dieser und Beeinflussung der Transkription gezeigt wurde, entwickelten wir die Arbeitshypothese:

Genetische Veränderungen am Promotor des hGH-1-Gens könnten die Wachstumshormonexpression beeinflussen. Wir stellten uns die Frage: Wieso gibt es ein physiologisches Spektrum der WH-Sekretion? Dazu untersuchten wir 23 Probanden mit familiären Kleinwuchs und verglichen die Daten mit 60 Kontrollen. Es konnten in der Promotorregion insgesamt 7 Polymorphismen gefunden werden. Davon befand sich nur einer in einer Bindungsstelle (cis-Element) für Transkriptionsfaktoren. Die entdeckten Polymorphismen wurden in zwei ähnlichen Studien ebenfalls beschrieben (Giordano M et al., 1997; Wagner JK et al., 1997). Die Polymorphismen kamen sowohl bei Probanden als auch bei den Kontrollen vor. Es konnte kein Zusammenhanghang zwischen diesen genetischen Veränderungen und der Wachstumshormonexpression erkannt werden.

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werde, dass die Interaktion mehrerer Polymorphismen, die Transkription stören könnten. Des weiteren können wir nicht ausschließen , ob Polymorphismen der Promotorregion des hGH-1-Gens, welche sich nicht in den bekannten cis-Elemente befinden, durch gewisse Veränderungen der Sekundärstruktur, die Expression beeinflussen könnten. Diese Studie demonstriert die Heterogenität der Promotorregion des hGH-1-Gens, eine Tatsache, die bei weiteren Studien an dieser Region bedacht werden sollte. Ein Erklärungsversuch für die Entstehung der Polymorphismen dieser Region ist der Mechanismus der Gen-Konversion zwischen den Genen des hGH-Genkomplexes.

Zum besseren Verständnis der WH-Expression bedarf es weiterer Studien, vor allem nach der Kenntnis des Einflusses der „locus control region“(LCR) des hGH -Gens. Es handelt sich um eine Region, welche in einer Entfernung von 7,5 und 40 Kilobasen(kb), dem hGH-1-Gen vorgeschaltet ist. Die Arbeitsgruppe um Cooke wies die Regulation des hGH-1-Gens durch diese LCR nach.

Die zukünftige Arbeitshypothese könnte lauten: Gibt es genetische Veränderungen in der LCR des hGH-1-Gens, welche die WH-Expression beim familiären Kleinwuchs beeinflussen können?

Kapitel 5

5 Zusammenfassung

Wachstum ist ein multifaktorielles Geschehen. Es steht unter dem Einfluss sowohl verschiedener Gene als auch Umwelteinflüssen (Ernährung, Betreuung des Kindes etc.). Die genetische Komponente der menschlichen Körpergröße wird auf 50-90% geschätzt. Viele unbekannte Gene scheinen dabei involviert zu sein. Mutationen dieser Gene können zur Folge haben, dass die Produktion und / oder Sekretion vieler Proteinen, welche an der Regulation der Körpergröße beteiligt sind, beeinflusst werden. Ein Vertreter dieser Gene ist das menschliche Wachstumshormongen (hGH-1). Bei gesunden Kindern korreliert die Wachstumshormonsekretion signifikant mit der Wachstumsrate.

Kodierende Regionen und Introns des hGH-1-Genes wurden schon intensiv untersucht. Wir wollten die Promotorregion des hGH-1-Genes kleinwüchsiger Kinder analysieren, welche noch nicht systematisch untersucht wurde.

Erforscht wurde diese Region (-547 bp bis –95 bp) bei 23 Probanden (8 Familien) im Vergleich zu 60 Kontrollen. Beim Kollektiv der Probanden handelte es sich um extrem kleinwüchsige Menschen. Die Probanden wurden ambulant im Wachstumszentrum der Universität Tübingen betreut. Die durchschnittliche Größe der Mütter betrug -3.0 SDS, die der Väter -1.8 SDS und die der Kinder –3.1 SDS. Ausgeschlossen wurden intrauterine Wachstumsverzögerung, klassischer Wachstumshormonmangel und Skeletterkrankungen.

Die Promotorregion des hGH-1-Gens wurde in zwei Regionen geteilt und mittels zweier PCRs amplifiziert. Die PCR-Produkte, mit einer Länge von 277 bp und 197 bp, beinhalteten die Sequenz der Promotorregion 455 bp upstream der TATA-Box mit bekannten Bindungsstellen (cis-Elemente) für die Transkriptionsfaktoren Pit-1, NF-I und SP-1. Danach wurden die Fragmente mittels SSCP analysiert, die Polymorphismen sequenziert und die Varianten mittels Restriktionsverdau bestätigt.

Es konnten sechs Polymorphismen mit einem Basenaustausch und einer mit einem Austausch von drei Basen detektiert werden. Bis auf einen (in der NF-I-box), lagen alle übrige entdeckten Polymorphismen außerhalb der Regionen mit bekannten cis-Elementen. Alle Varianten wurden sowohl bei Probanden, als auch bei den Kontrollen gefunden. Wegen

möglicher funktioneller Bedeutung konzentrierten wir uns auf die NF-I-box, welche mittels Restriktionsverdau genauer untersucht wurde.

Die Promotorregion des hGH-1-Gens ist sehr polymorph. Es konnte kein einziger Polymorphismus entdeckt werden, welcher ursächlich für den Kleinwuchs der untersuchten Gruppe verantwortlich sein könnte. Sowohl in der Gruppe der Probanden, als auch bei den Kontrollen waren alle detektierten Veränderungen (homo- und heterozygot) vorhanden. In wieweit jedoch die Kombination mehrerer Polymorphismen die Expression vom Wachstumshormon beeinflussen können, kann hiermit nicht ausgeschlossen werden.

6 Literatur

1. **Ainsworth P.J. et al.** Diagnostic single strand conformational polymorphism (SSCP): a simplified non-radioisotopic method as applied to a Tay-Sach B1 variant. Nucleic Acids Res.1991; 19:405

2. **Baerwald CG, Panayi GS, Lanchbury JS.** Corticotropin releasing hormone promoter region polymorphisms in rheumatoid arthritis. J Rheumatologie 1997; 24(1):215-6

3. **Bakker E. et al.** Acceleration and sensitivity enhancement of SSCP detection in the F9-gene by the use of the PhastSystem. American Journal of Human Genetics 1992; 51:1484

4. **Barsh GS, Seeburg PH, Gelinas RE.** The human growth hormone gene family: Structure and evolution of the chromosomal locus. Nucleid Acids Res 1983; 11:3939-58

5. **Bennani-Baïti IM, Asa SL, Song D, Iratni R, Liebhaber SA, Cooke NE.** Dnase I-hypertensive sites I and II of the human growth hormone locus control region are major developmental activator of somatotrope gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998;95:10655-10660

6. **Benz M.** Studie zum Syndrom des biologisch inaktiven Wachstumshormons: Messung der biologischen Aktivität *in vitro* und Mutationsanalyse des *GH-1*. Medizinische Dissertation, Universität Tübingen (2001)

7. **Bierich JR, Brodt B, Gupta D, Schönberg D.** Über die Konstitutionelle Entwicklungsverzögerung. Monatsschrift Pädiatrie 1972; 120:334-341

8. **Bierich JR.** Entwicklungsverzögerung. Monatsschrift Pädiatrie 1975; 123:301-306

9. **Binder G, Ranke MB.** Screening for Growth Hormone (GH) Gene Splice-Site Mutations in Sporadic Cases with severe Isolated GH Deficiency Using Ectopic Transcript Analysis. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1995; 80:1247-1252

10. **Blethen SL, Daughaday WH, Weldon VV.** Kinetics of the somatomedin C/ insulin-like growth factor I: response to exogenous growth hormone (GH) in GH-deficient children. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1982;54:986-990

11. **Bloch DK.** Restrinction endonucleases. Digestion of DNA with restrinction endonucleases. Current Protocols in Molecular Biology (Supp# 31) Unit 3.1, 1995

12. **Blum WF, Albertsson-Wikland K, Rosberg S, Ranke MB.** Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1993;76:1610-1616

13. **Blum WF, Ranke MB, Kietzmann K, Gauggel E, Zeisel HJ, Bierich JR.** A specific radioimmunoassay for the growth hormone(GH)-dependent somatomedin binding protein: its use for diagnostic of GH deficiency. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1990;70:1292-1298

14. **Blum WF, Ranke MB.** Use of insulin-like growth factor binding protein 3 for the evaluation of growth disorders. Hormone Research 1990;34:31-37

15. **Blum WF.** Insulin-like growth factors and their binding proteins. In: Ranke MB, ed. Functional endocrinologic diagnostics in children and adolescence. Mannheim: J&J Verlag 1992;102-107

16. **Bolander FF** (1994) Molecular Endokrinology, 28-31; 2nd edition, Academic Press, London / San Diego / Sydney / New York / Tokyo / Boston / Toronto

17. **Brook CGD, Hindmarsh PC, Smith PJ, Stanhope R.** Clinical features and investigation of growth hormone deficiency. Clinics in Endicrinology and Metabolism 1986; 15:479-493

18. **Brophy VH, Hastings MD, Glendenning JB, Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE.** Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. Pharmacogenetics 2001;11(1):77-84

19. **Cattaneo M, Zollo M, Malferrari G, Orlandi R, D´ AngeloA, Menard S, Biunno I.** Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of human SEL1L. Mutation Research 2001; 458(3-4):71-6

20. **Cawthon R.M. et al.** A major segment of the neurofibroniatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. Cell 1990; 62:193-201

21. **Chen EY, Liao YC, Smith DH, Barrera-Saldana HA, Gelinas RE, Seeburg PH.** The human growth hormone gene locus: Nucleotide sequence, biology and evolution. Genomics 1989; 4:479-97

22. **Clemmons DR, Van Wyk JJ, Ridgway EC, Kliman B, Kjellberg RN, Underwood LE.** Evaluation of acromegaly by radioimmunoassay of somatomedin C. New England Journal Med 1979;301:1138-1142

23. **Clemmons DR, Van Wyk JJ.** Factors controlling blood concentration of somatomedin C. Clin Endocrinol Metab 1984;13:113-143

24. **Copeland KC, Underwood LE, Van Wyk JJ.** Induction of immunoreactive somatomedin C in human serum by growth hormone: dose-response relationships and effect on chromatographic profiles. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1980;50:690-697

25. **Daughaday WH.** Growth Hormone Deficient-Like Syndromes and Their Etiologies. Growth Genetic & Hormones June 1992; Vol. 8 No. 2

26. **Davidson MB.** Effect of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. Endocrinological Review 1987; 8:115-131

27. **Dean M. et al.** Multiple mutations in highly conserved residues are found in mildly affected cystic fibrosis patients. Cell 1990; 61:863-870

28. **Dockhorn-Dworniczak B., Dworniczak B., Brömmelkamp L.,Bülles J., Horst J., Böcker W.W.** Non-isotopic detection of single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP): a rapid and sensitive technique in diagnosis of phenlylketonuria.. Nucleic Acids Res. 1991; 19:2500

29. **Drop SLS.** Report on the nomenclature of the IGF binding proteins. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1992;74:1215-1216

30. **Eisenstein BI.** The Polymerase Chain Reaction. The New England J. Med. 1990; 322:178-182

31. **Fitch D, Maione C, Goodman M, Slightom J.** Molecular history of gene conversion in the primate fetal γ-globin genes. J Biol Chem 1990;265:781-793

32. **Forsberg L, Lyrenas L, de Faire U, Morgenstern R.** A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. Free Radic Biol Med 2001; 30(5):500-5

33. **Fuchs R and Blakesley R.** Guide to the use of typeII restrinction endonucleases. Methods Enzymology 1983;100:3-38

34. **Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW, Magrath IT, Knowles DM, Della-Favera R.** p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad USA, 1991; 88(12):5413-7

35. **Gassen HG, Sachse GE, Schulte A** in: PCR-Grundlagen und Anwendung der Polymerasekettenreaktion, Gustav Fischer Verlag, 1994

36. **George DL, Phillips III JA, Franke U, Seeburg PH.** The genes for growth hormone and chorionic somatomammotropin are on the long arm of human chromosome 17 in region q21-qter. Hum Genet 1981; 57:138-41

37. **Gibbs RA** DNA amplification by the polymerase chain reaction. Analytical Chemistry (1990);62(13):1202-14

38. **Giordano M, Marchetti C, Chiorboli E, Bona G, Momigliano Richiardi P.** Evidence for gene conversion in the generation of extensive polymorphism in the promoter of the growth hormone gene. Hum Genet 1997;100:249-255

39. **Gupta D.** A longitudinal study of steroid excretion patterns in children during adolescent growth.Steroidologica 1970; 1:267

40. **Hayashi K.** PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA .PCR Methods Appl. 1 1991;34-38

41. **Hirt H, Kimelman J, Birnbaum MJ, Chen EY, Seeburg PH, Eberhardt NL, et al..** The human growth hormone gene locus: Structure, evolution and allelic variations. DNA 1987; 6:59-70

42. **Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA.** DNA sequencing with Thermus aquadicus DNA polymerase chain reaktion-amplified DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85:9436-40

43. **Isaksson OGP, Eden S, Jansson JG.** Mode of action of pituitary growth hormone on target cells. Ann. Review Physiology 1985; 47:483-499

44. **Jefferson LS, Robertson JW, Tolman EL.** Effects of hypophysectomy on protein and carbohydrate metabolism in the perfused rat liver. In: Growth and Growth Hormone (eds. Pecile A, Müller EE) 1972: 106-123. Excerpta Medica, Amsterdam

45. **Jones BK, Monks BR, Liebhaber SA, Cooke NE.** The Human Growth Hormone Gene Is Regulated by a Multicomponent Locus Control Region. Molecular and Cellular Biology 1995;15:7010-7021

46. **Jorgensen JOL, Blum WF, Moller N, Ranke MB.** Short-term changes in serum insulin-like growth factors (IGF) and IGF binding protein 3 after different modes of intravenous growth hormone (GH) exsposure in GH-deficient children. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1991;72:582-587

47. **Kanazawa H., Nouomi T., Futai M.** Analysis of Escherichia coli mutants of the H(+)-transporting ATPase: determination of altered site of the structural genes. Methods Enzymology 1986; 126:595-603

48. **Katzos, G** (griechischer Text) Endokrine Drüsen, 446-509 in: Malaka-Zafeiriou, K: Praktische Pädiatrie; 1. Auflage (1996), Uni-Klinik Thessaloniki

49. **Laron Z.** Deficiencies of growth hormone and somatomedins in man. In: Special Topics in Endocrinology and Metabolism (Cohen MP, Foa PP, editors) Liss, New York 1983; 5:149-199

50. **Le Van TD, Bloom JW, Bailey TJ, Karp CL, Halonen M, Martinez FD, Vercelli D.** A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. J Immunology 2001; 167(10):5838-44

51. **Leviev I, James RW.** Promoter Polymorphisms of Human Paroxonase PON I Gene and Serum Paraoxonase Activities and Concetrations. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000;20:516-521

52. **Lin CJ, Martens JW, Miller WL.** NF-IC, Sp1 and Sp3 are essential for transcription of the human gene for P450c17 (steroid 17-alpha-hydroxylase/ 17, 20 lyase) in human adrenal NCI-H295A cells. Mol Endocrinol 2001; 15(8):1277-93

53. **Lira SA, Kalla KA, Glass CK, Drolet DW, Rosenfeld MG.** Synergistic Interactions Beteen Pit-1 and Other Elements Are Required for Effective Somatotroph Rat Growth Hormone Gene Expression in Transgenic Mice. Molecular Endocrinology 1993;7:694-701

54. **MacGillivray MH.** Clinical features, tests and causes of growth hormone deficiency. In: Human Growth Hormone (editors Raiti S, Tolman RA) Plenus, New York 1986 :51-65

55. **Makino R, Sekiya T, Hayashi K.** F-SSCP: fluorescence-based polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). PCR Methods Appl 1992;2:10-13

56. **Marshall WA.** Growth and sexual maturation in normal puberty. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1975; 4:3-26

57. **McClelland M, Hanish J, Nelson M, Patel Y.** A single buffer for all restrinction endonucleases. Nucl. Acids Res. 1988;16:364

58. **Micheli MR, Bova R.** Fingerprinting methods based on arbitrarily primed PCR. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1997

59. **Misra-Press A, Cooke NE, Liebhaber SA.** Complex alternative splicing partially inactivates the human chorionic somatomammotropin-like (hCS-L) gene. J Bipl Chem 1994; 296:23220-9

60. **Mohabeer A.J., Hiti A.L., Martin W.J.** Non-radioactive single strand conformation polymorphism (SSCP) using the Pharmacia "PhastSystem". Nucleic Acid Res.1991; 19:3154

61. **Morgan K, Licastro F, Tilley L, Ritchie A, Morgan L, Pedrini S, Kalsheker N.** Polymorphism in the alpha1-antichymotrypsin (ACT) gene promoter: effect on expression in transfected glial and liver cell lines and plasma ACT concetrations. Human Genetics 2001;109(3):303-10

62. **Mullis KB, Faloona FA.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology 1987; 155:335-50

63. **Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T.** Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformational polymorphisms. Proc. Acad. Sci. USA 1989; 86:2766-2770

64. **Orita, M. et al.** Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polyrnerase chain reaction. Genomic 1989; 5:874-879

65. **Owerbach D, Martial JA, Baxter JD, Rutter WJ, Shows TB.** Genes for growth hormone, chorionic somatomammotropin and growth hormone-like gene are located on chromosome 17 in humans. Science 1980; 209:289-92

66. **Parks JS, Kassels M, McKean MC, Parks JT, Johnson C, MeachamL.** Evolution and structure of the growth hormone gene cluster. In: Mueller E, editor. Advances in Growth Hormone and Growth Factor Research. Berlin: Springer-Verlag, 1989 :3-17

67. **Pfäffle RW, Kim C, Otten B, Wit JM, Eiholzer U, Heimann G, Parks J.** Pit-1:clinical aspects. Horm Res. 25 (Suppl) 1996:25-28

68. **Phillips III JA.** Inherited defects in growth hormone synthesis and action. In. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Desease. New York:McGraw-Hill, Inc., 1995: 3023-44

69. **Pingoud A, Urbanke C.** Arbeitsmethoden der Biochemie. Walter de Gruyter 1997, Berlin, New York

70. **Pojoka L, Gautier S, Blanc H, Guyene TT, Poirier O, Cambien F, Benetos A.** Genetic determination of Plasma aldosterone levels in essential hypertention. American Journal Hypertension 1998;11(7):856-60

71. **Preece MA, Holder AT.** The somatomedins: a family of serum growth factors. In: Recent Advances in Endocrinology and Metabolism (ed. O´ Riordan JLH) 1982 :47 72,Churchill-Livingstone, Edinburgh

72. **Pschyrembel** (1998) Klinisches Wörterbuch; 258. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin / New York

73. **Rabinow P.** Making PCR. The University of Chicago Press 1996, Chicago,

74. **Ranke MB, Bierich JR.** Wachstumshormon-Mangel: Die Diagnose muss der komplexen Pathogenese Rechnung tragen. Deutsches Ärzteblatt 1987; 84:B1983-B1987

75. **Ranke MB, Binder G, Wollmann HA.** Krankheiten von Hypophyse und Hypothalamus (464-468) in: Lentze MJ, Schaub J, Schulte FJ, Spranger J, Pädiatrie (Grundlagen und Praxis). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (2001)

76. **Ranke MB, Haber P.** Wachstumshormonstimulationstests (70-86) in: Endokrinologische Funktionsdiagnostik im Kindes- und Jugendalter (Hrsg. Ranke MB), J&J Verlag Mannheim (1993)

77. **Ranke MB, Schwaderer ML, Bierich JR.** Die konstitutionelle Entwicklungsverzögerung: Eine einfache Normvariante des Wachstums. Klinische Pädiatrie 1982; 194:289-294

78. **Ranke MB.** Das diagnostische Vorgehen bei proportioniertem Kleinwuchs. Eine praktisch orientierte Strategie. Endokrinologische Einzelzeitschriften 1989, Heft 1, Walltor-Verlag, Gießen

79. **Ranke MB.** Strategien zur Diagnose des Wachstumshormon-Mangel-Syndroms. Bioscientia Bericht 1989; 42:1-12

80. **Ranke MB.** Wachstumsstörung (537-541) in: Lentze MJ, Schaub J, Schulte FJ, Spranger J, Pädiatrie (Grundlagen und Praxis). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, (2001)

81. **Roberts RL.** Restrinctions enzymes and their isoschizomers. Nucl. Acids Res. 20 (Supp# 1) 1994:2167-2180

82. **Rosenfeld RG, Wilson DM, Lee PDK, Hintz RL.** insulin-like growth factor I and II in evaluation of growth retardation. Journal Paediatry 1984;109:428-433

83. **Rosskamp R.** Growth Hormone Releasing Hormone. Review. Klinische Pädiatrie 1988; 200:81-88

84. **Roux KH.** Optimization and troubleshooting in PCR. PCR Methods Applic; 4:185-194

85. **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. Science 1988; 239:487-491

86. **Saiki RK, Scharf F, Mullis KB, Horn G, Ehrlich HA.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230:1350-4

87. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular cloning – A laboratory manual. Gold Spring Harbor Laboratory Press 1989

88. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequenzing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977; 74:5463-67

89. **Sarkar G, Yoon HS, Sommer SS.** Dideoxy fingerprinting (ddF): a rapid and efficient screen for presence of mutations. Genomics 1992b;13:441-443

90. **Sarkar G, Yoon HS, Sommer SS.** Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism (rSSCP):comparison with DNA-SSCP. Nucleid acid Res 1992a;20:871-878

91. **Sato N, Katsuya T, Pakugi H, Takami S, Nakata Y, Miki T, Higaki J, Ogihara T.** Association of variants in critical core promoter element of angiotensinogen gene

with increased risk of essential hypertension in Japanese. Hypertension 1997; 30(3 Pt 1):321-5

92. **Seeburg PH.** The human growth hormone gene family: Nucleotide sequences show recent divergence and predict a new polypeptide hormone. DNA 1982; 1:239-49

93. **Sherwood LM.** Similarities in the chemical structure of human placental lactogen and pitiutary growth hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1967; 58:2307-2314

94. **Shewchuk BM, Asa SL, Cooke NE, Liebhaber SA.** Pit-1 Binding Sites at the Somatotrope-specific Dnase I Hypersensitive Sites I, II of the Human Growtg Hormone Locus Control Region Are Essential for *in V ivo* hGH-N Gene Activation. The Journal of Biological Chemistry 1999;274:35725-35733

95. **Smith BJ** (1984) SDS Polyacrylamide Gel, 41-57 in: Walker JM: Methods in Molecular Biology, 1. Proteins; 1st edition, Humana Press, Clifton / New Jersey

96. **Sugimoto K. et al.** Frequent mutations in the p53 gene in human myeloid leukemia cell lines. Blood (1992);79:2378-2383

97. **Suzuki Y, Orita M, Shiraishi M, Hayashi K, Sekiya T.** Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. Oncogene 1990;5:1037-1043

98. **Tanner JM** (1981) A history of sth study of human growth, Cambridge University Press.

99. **Tanner JM, Davies PSW.** Clinical longitudinal standards for height and height velocity for North American children. The Journal of Paediatrics 1985; 104:317-329

100. **Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M.** Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity: British children, 1965. Archives of Disease in Childhood 1966;41:454-472

101. **Tanner JM, Whitehouse RH.** Clinical longitudinal standards for height, weight, height velocity and stages of puberty. Archives of Disease in Childhood 1976; 51:170-179

102. **Tanner JM.** Human growth hormone. Nature 1972; 237:433-439

103. **Tanner JM.** Längenwachstum bei Kindern mit Mangel an Wachstumshormon: Resultate nach 5-15jähriger Behandlung. Z Gesamte Innere Medizin 1988; 43:408-411

104. **Theill LE, Karin M.** Transcriptional Control of GH Expression and Anterior Pituitary Development. Endocrine Reviews 1993;14:670-689

105. **Underwood LE, van Wyk JJ.** Normal and aberrant growth. In: Williams Textbook of Endocrinology, 7th Edition (editors Wilson JD, Foster DW) Saunders, Philadelphia 1985 : 155-205

106. **Vimpani GV, Vimpani AF, Lidgard GP, Cameron EHD, Farquhar JW.** Prevalence of severe growth hormone deficiency. Br Med Journal 1977; 2:427-430

107. **Walker JM** (1984) Gradient SDS Polyacrylamide Gel, 57-63 in: Walker JM: Methods in Molecular Biology, 1. Proteins; 1st edition, Humana Press, Clifton / New Jersey

108. **Wallis M** (1989). The molecular basis of growth hormone deficiency. Biochemistry Laboratory, School of Biological Sciences, University of Sussex, Falmer, Brighton, Sussex BN1 9QG, U.K.

109. **Wallis M, Howell SI, Taylor KW.** The Biochemistry Polypeptide Hormones.Wiley, Chichester, 1985

110. **Wallis M.** Mechanism of action of growth hormone. In: Hormones and their Actions, Part II (New Comprehensive Biochemistry ; eds. Cooke BA, King RJB, van der Molen HJ) 1988; 18B:265-294, Elsevier, Amsterdam

111. **Wollmann HA.** Wachstumshormon - Wie wachsen Kinder? Der Kinderarzt 1992; 23:981-991

112. **Zabransky S** (1995) Krankheiten der innersekretorischen Drüsen, 265-7 in: Pädiatrie; 1. Auflage, Hippokrates Verlag, Stuttgart

1 GATCTTGTCT CAGAAAAACC CCAGAAAACA ACAACAAAAA AACGCGCTAT TGGGCTTATT TCTATTTTAC
81 GAAAATGAGG AACCTTGGTC ACTGAGAGGT TAAGAATGGG TGTTGCCTCA TGGGTGCTGT TGGCATGTGG
151 GGCAGGGAAC TCTGCTTTGC CAGCCAATGC CCCTCCCGCC CCAGGCACCC ACCGGTCATT GAGACCAGCG
221 CGATTGCCCT GATGCATGTG CAGACGCTCC CTCCGTTGGG GCAGAGCCAC CCTTAGTAGA GAACCACTGG
291 TAACCTGGGG AGGTTTCCTG GCTGCTACAC TGCTGGGTCA GGACTCAAAC CCACGTCCTT CTTAGCAGGT
361 CTTTTCCCAG TCACAGCAGC CCAGCAGATC CAGGACACCT GGGCTGGAGA AGGAGGCAGG GGTCTGAGCT
431 CTTCTTTCCC TGAGGTTCTT CCCCCTCCCG GCATCCTAGG GTGGCTGGGG GTCGCTGCCT TCTTGCTTCC
501 CCACCCCCTG AGCCCCTTGT CCCTTCGCCC GACCCTGGCC CCCATTCCTT ATTTTGATGT TGCCTTCCTG
571 GAAAGGGAGG TGTCGTCAGA AGTCAGAATG TGAAGCCCCG GGCAGCCGAG GGCAGAGGCA GGGGTAGGCT
641 TGTGAGGCCT CCTGTTCTGG GAAGAAAAGG GCATCATGAG CCCAAAATGG GGCTCAGGGC TGTTGTCACC
711 AGTGAGGGAA CAGACGGCTC AAAATGTGAC AAATAACCCT GCAGGCGGTG GGGCCCCCGC TGCCTCCGCC
781 CCTCCTGAAA ACAGATCCCT GCCCGGCATG AATGGGAATG AAGCCCAAAG GCCACATCTG CATCCTTGTC
851 CACGGGATGT GTGTGTCTTC CCTCCCTGGA GTGGGAGCTG CTTCTCACTT GTTTTTTTAA ATTTTTTATT
921 TCAATATTTT CTGGGGTACA GGTAGTTTTT TTGGTTACCT GGATAAGTTC TTTAGTGGTG ATTTCTGAGA
991 TTTTAGCGCA CCTGTCACCT GAGGATGGGT GCCAACTGCC CCCCACCAAC CTCCGTGCCC CCTACAGTCC
1061 GCTGAGCCCT AGGACCAGCT CCAGAGTAGG CCCCACACCA CAGGGTCCAG GCAACACACC TGTGTGAGCA
1131 TGCACATACA CACACACACA CACCCCCCAC AAACACGTGT GCCCCAAGCC TTTCCCAGTT ATACCCCCCA

1201 ACTTTGG**GGA GACACTAGCC CCAAAGTTAA TGAAGGACTC TGTCGTTAGG GGCTCAGGAA GAGTATTTCC**
1271 **TAAACCATGA GACTCCCAGA TTTTGCCCCA CTCCCCCCGG GTCAGTCTCT CTCCAGCCAC CCTCACCAGC**
1341 **ATGCGGGCCC ATGGGCCTCA AGCTGACCTC AGGTGATGTT TATATTTCTG AGCTGTTTAT TCCATGAACT**
1411 **GAACATCTGA CAGCTTTTCA GAGAAATGTT TTTTCATTTG GAACATCTGG AAACAAGAAA GAACATCTGG**
1481 **GGCTGCCCGG AACGGGCTGT TCCTCGGATG AAACCTTAAC CCTCCTGCCC CTGACTTCCG TGGCTCAGGT**
1551 **CCTGGCCTGC ACCCCTTGAG AGTGGCCCCC ACCTTATCAG GTCCGAGGCC TAGGCCAAGA TC**

Anlage 1: F14 hGH LCR, HS 1 und 2 (dick markiert F 14 mit einer Länge von 404 bps, unterstrichen Pit-1-Bindungsstellen)

Lebensalter		Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) ng/ ml		Insulin-like growth factor I (IGF-I) ng/ ml	
0-1	Woche	770	(420-1390)	36	(15-75)
1-4	Wochen	1290	(770-2090)		
1-3	Monate	1480	(870-2540)		
3-6	Monate	1610	(980-2640)		
6-12	Monate	1720	(1070-2760)	56	(17-95)
1-3	Jahre	2050	(1410-2970)	67	(25-146)
3-5	Jahre	2250	(1520-3320)	96	(39-194)
5-7	Jahre	2440	(1660-3590)	116	(54-220)
7-9	Jahre	2630	(1820-3800)	137	(71-237)
9-11	Jahre	3010	(2120-4260)	183	(94-330)
11-13	Jahre	3300	(2220-4890)	275	(148-495)
13-15	Jahre	3480	(2310-5240)	319	(185-540)
15-17	Jahre	3390	(2330-4950)	265	(145-460)
20-30	Jahre	3290	(2200-4930)	195	(110-347)

Anlage 2 : altersspezifische Normwerte für IGF-I und IGFBP-3 im Serum

(aus Pädiatrie, Grundlagen und Praxis; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 2001)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. M.B. Ranke möchte ich für die freundliche Überlassung dieser Arbeit und für die Gelegenheit in seiner Arbeitsgruppe mitzuwirken danken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. G. Binder, der in schwierigen Situationen stets erreichbar war und für aufkommende Fragen immer ein Ohr offen hatte. Seine konstruktive Kritik und Ablaufsplanung waren entscheidend für das Gelingen dieser Arbeit.

Meine Anerkennung möchte ich dem aufgeschlossenen Team des endokrinologischen Labors der Sektion Pädiatrische Endokrinologie an der Universität Tübingen für seine tatkräftige Unterstützung und Geduld mit mir aussprechen. Es hat Spaß gemacht in diesem Team zu arbeiten.

Bei den Doktoranten des Hormonlabors bedanke ich mich für die tolle und entspannte Atmosphäre während dieser Zeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei Konstantina Mavridou und Marcus Benz. In dieser Zeit entstand nicht nur meine Arbeit, sondern auch eine tolle Freundschaft mit Marcus, welcher mich in den schwierigen Stunden der Forschung stets aufbauen konnte.

Für die Durchsicht der Arbeit bedanke ich mich bei Susanne von Dobschütz und Kiriaki Kampouridou, für die Geduld mit mir während der Entstehungsphase dieser Arbeit geht ein großer Dank an meinem „Stern“Georgia Tzinivizidou.

Curriculum vitae

Name	Kampouridis
Vorname	Lampros
Geburtstag	18.06.1973
Geburtsort	Urach (jetzt Bad Urach)
Nationalität	griechisch
1978-1981	Volksschule in Griechenland
1981-1984	Grundschule in Bad Urach
1984-1993	Graf-Eberhard-Gymnasium in Bad Urach
25.05.1993	Abitur
1993-2000	Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
08 / 1995	ärztliche Vorprüfung
03 / 1997	1. Staatsexamen
03 / 1999	2. Staatsexamen
19.05.2000	3. Staatsexamen

Famulaturen :

19.02.-31.03.96	Chirurgie, Kreiskrankenhaus Bad Urach
01.09.-30.09.96	Opthalmologie, General Hospital Drama (GR)
21.07.-24.08.97	Pädiatrie bei Dr. Tomaschek in Bad Urach
16.02.-20.03.98	Innere Medizin in Hohenems (A)

Praktisches Jahr :

19.04.-11.07.99	Pädiatrie, Uni-Kinderklinik Thessaloniki (GR)
12.07.-31.10.99	Innere Medizin, Kantonsspital St.Gallen (CH)
06.12.99-26.03.00	Chirurgie in Reutlingen
7/ 2000 bis 2/ 2001	Militärdienst in Griechenland als Stabsarzt
seit März 2001	AiP in der Fachklinik in Gaißach (Bad Tölz)
seit September 2002	Assistenzarzt in der Fachklinik Gaißach