

Aus dem Institut für Tierzucht  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Genzentrum  
Vorstand: Prof. Dr. Eckhard Wolf  
und  
aus dem Institut für Tierpathologie  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie  
Vorstand: Prof. Dr. Walter Hermanns

angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Eckhard Wolf und Prof. Dr. Rüdiger Wanke

## Etablierung und Charakterisierung eines Wachstumshormon- transgenen Mausmodells auf Inzuchtbasis (FVB/N)

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Dagmar Corine Kress  
aus Marbach a.N.

München 2005

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle  
1. Referent: Univ.-Prof. Dr. E. Wolf  
2. Referent: Univ.-Prof. Dr. R. Wanke  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers

Tag der Promotion: 22. April 2005

Meinen Eltern



Inhaltsverzeichnis	I
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>3</b>
2.1 Erstellung transgener Tiere durch Mikroinjektion	3
2.2 Inzucht	4
2.3 Das Wachstumshormon	5
2.3.1 Geschichtlicher Überblick	5
2.3.2 Synthese des Wachstumshormons	5
2.3.3 Physiologische Wirkungen des Wachstumshormons	7
2.3.4 Wachstumshormonrezeptor und Signaltransduktion	8
2.3.5 Neuroendokrine Regulation der GH Sekretion	11
2.4 GH-transgene Mausmodelle	12
2.5 Phänotypische Veränderungen GH-transgener Mäuse	17
2.5.1 Körper-, Skelett- und Organwachstum	17
2.5.1.1 Körpergewicht und Skelettveränderungen	17
2.5.1.2 Organgewichte	18
2.5.2 Endokrine und metabolische Veränderungen	20
2.5.3 Kardio-vaskuläre Veränderungen	20
2.5.4 Veränderungen der Leber	21
2.5.5 Veränderungen der Niere	23
2.5.6 Fertilität	25
2.5.7 Weitere Veränderungen	26
2.5.7.1 Haut	26
2.5.7.2 Wundheilung	26
2.5.7.3 Verhalten	26
<b>3 TIERE, MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>27</b>
3.1 Mäuse	27
3.2 Verwendete Zelllinien	27
3.2.1 HEK 293 Zelllinie:	27
3.2.2 HepG2 Zelllinie	28
3.3 Materialien	28
3.3.1 Antikörper	28
3.3.2 Chemikalien	28

3.3.3	Enzyme und sonstige Reagenzien	30
3.3.4	Kits	31
3.3.5	Verbrauchs- und sonstiges Arbeitsmaterial	31
<b>3.4</b>	<b>Zusammensetzung der Puffer</b>	<b>33</b>
3.4.1	Puffer für molekularbiologische Methoden	33
3.4.1.1	DEPC-H <sub>2</sub> O (0,1 % (v/v))	33
3.4.1.2	Proteinase K Lösung	33
3.4.1.3	TE Puffer	33
3.4.1.4	20 x SSC Puffer	33
3.4.2	Puffer für Agarosegele	33
3.4.2.1	50 x TAE Puffer	33
3.4.2.2	6 x Probenpuffer für DNA	33
3.4.3	Lösungen für Bakterienkultur	34
3.4.3.1	Luria-Bertani-(LB)-Medium	34
3.4.3.2	SOC Medium	34
3.4.3.3	Tfb I Puffer	34
3.4.3.4	Tfb II Puffer	35
3.4.3.5	Agar LB Platten	35
3.4.4	Lösungen für Southern Blot	35
3.4.4.1	Transferpuffer	35
3.4.4.2	Neutralisationslösung	35
3.4.4.3	Waschlösung I	35
3.4.4.4	Waschlösung II	35
3.4.5	Lösungen für Northern Blot	36
3.4.5.1	10 x MOPS	36
3.4.5.2	1,7 x RNA-Ladepuffer	36
3.4.5.3	Solution I	36
3.4.5.4	Solution II	36
3.4.5.5	Transferpuffer	36
3.4.5.6	Waschlösung I	36
3.4.5.7	Waschlösung II	36
3.4.6	Puffer und Lösungen der Proteinanalyse	37
3.4.6.1	5 x Laemmli-Puffer	37
3.4.6.2	Proteinextraktionspuffer	37
3.4.6.3	RIPA Puffer	37
3.4.6.4	10 x SDS-PAGE-Laufpuffer	37
3.4.6.5	10 x Transferpuffer	37
3.4.6.6	1 x Transferpuffer	38
3.4.6.7	Coomassiefärbelösung	38
3.4.6.8	Coomassieentfärbelösung	38

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>III</b>
3.4.6.9    Waschlösung (TBS-T)	38
3.4.6.10   Blockierungslösung	38
3.4.6.11   Primärantikörperlösung	38
3.4.6.12   Sekundärantikörperlösung	38
3.4.7    Puffer und Lösungen der eukaryontischen Zellkultur	39
3.4.7.1    Fetales Kälberserum (FKS)	39
3.4.7.2    Nährmedium für HEK293T und HepG2 Zellen	39
3.4.7.3    PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7,4)	39
3.4.7.4    2 x Trypsin/EDTA	39
3.4.8    Puffer und Lösungen der in situ Hybridisierung ohne Tyramide signal amplification (TSA)	39
3.4.8.1    Proteinase K Puffer	39
3.4.8.2    NTE Puffer	40
3.4.8.3    Puffer I	40
3.4.8.4    Puffer II	40
3.4.8.5    Puffer III	40
3.4.9    Puffer und Lösungen der in situ Hybridisierung mit Tyramide signal amplification (TSA)	40
3.4.9.1    NTE Puffer	40
3.4.9.2    Blockierlösung	40
<b>3.5    Primer</b>	<b>41</b>
<b>3.6    Plasmide</b>	<b>41</b>
<b>3.7    Radioaktive Isotope</b>	<b>41</b>
<b>3.8    Arbeiten mit DNA</b>	<b>41</b>
3.8.1    Isolation genomischer DNA aus Mäuseschwänzen	41
3.8.1.1    Genomische DNA für die Genotypisierung transgener Tiere	41
3.8.1.2    Genomische DNA für Southern Blot Transfer	42
3.8.2    Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung der DNA	43
3.8.3    Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	43
3.8.4    Genotypisierung der transgenen Tiere	43
3.8.4.1    Polymerasekettenreaktion (PCR)	43
3.8.5    Agarosegelelektrophorese	46
3.8.6    Southern Blot	47
3.8.6.1    Restriktionsendonukleaseverdau	47
3.8.6.2    Auftrennung der DNA im Agarosegel und Transfer	48
3.8.6.3    Herstellung radioaktiv markierter Sonden	48
3.8.6.4    Southern Blot Hybridisierung, Waschen und Signaldetektion	49
3.8.7    Extraktion von DNA aus Agarosegelen	50
3.8.8    Ligation	50
3.8.9    Dephosphorylierung der 5'-Enden	51

<b>3.9</b>	<b>Arbeiten mit RNA</b>	<b>51</b>
3.9.1	Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	51
3.9.2	Isolation von RNA aus Gewebe	51
3.9.3	DNase I Verdau	52
3.9.4	Reverse Transkription und PCR (RT-PCR)	52
3.9.5	Northern Blot-Transfer und Hybridisierung	53
3.9.5.1	Auftrennung von RNA im denaturierenden Agarosegel	53
3.9.5.2	Northern Blot Transfer	54
3.9.5.3	Hybridisierung, Waschen und Signaldetektion	54
3.9.6	<i>In situ</i> Hybridisierung	54
3.9.6.1	Herstellung Digoxigenin markierter Sonden	54
3.9.6.2	<i>In situ</i> Hybridisierung ohne Tyramide signal amplification (TSA)	56
3.9.6.2.1	Vorbehandlung der Paraffinschnitte	56
3.9.6.2.2	Hybridisierung und Waschen	56
3.9.6.2.3	Cytochemische Detektion der hybridisierten Sonde	57
3.9.6.3	<i>In situ</i> Hybridisierung mit Tyramide signal amplification (TSA)	57
3.9.6.3.1	Vorbehandlung der Paraffinschnitte	57
3.9.6.3.2	Hybridisierung und Waschen	57
3.9.6.3.3	Cytochemische Detektion der hybridisierten Sonde	58
<b>3.10</b>	<b>Arbeiten mit Proteinen</b>	<b>58</b>
<b>3.11</b>	<b>Isolation von Proteinen</b>	<b>58</b>
3.11.1.1	Isolation von Proteinen aus Geweben	58
3.11.1.2	Isolation von Proteinen aus Zellen	59
3.11.2	Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	59
3.11.2.1	Herstellung der Polyacrylamidgele	59
3.11.2.2	Elektrophoresebedingungen	60
3.11.3	„Semi – dry – blot“ Western Blot Transfer	60
3.11.4	Färbung der Proteine nach Coomassie Brilliantblau R-250	61
3.11.5	Immunoblot	61
<b>3.12</b>	<b>Arbeiten mit Bakterien</b>	<b>62</b>
3.12.1	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	62
3.12.2	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	62
3.12.3	Herstellung von DMSO-stocks	62
<b>3.13</b>	<b>Arbeiten mit eukaryontischen Zellen</b>	<b>63</b>
3.13.1	Kultivierung der Zellen	63
3.13.2	Auftauen der Zellen	63
3.13.3	Kryokonservierung der Zellen	63
3.13.4	Transfektion von Zellen	63



Inhaltsverzeichnis	V
<b>3.14 Untersuchungen an Tieren</b>	<b>64</b>
3.14.1 Ermitteln der täglichen Gewichtszunahmen und der Organgewichte	64
3.14.2 Klinisch-chemische Untersuchungen	64
3.14.3 Bestimmung der bGH-Konzentration im Serum	65
<b>3.15 Anfertigen histologischer Präparate</b>	<b>65</b>
3.15.1 Gewinnung von perfundierten Nieren für die pathomorphologischen Untersuchungen	65
3.15.2 Paraffinhistologie	66
3.15.3 Kunststoffhistologie	67
3.15.4 Entparaffinisieren und Rehydrieren	67
3.15.5 Färbungen für Paraffinschnitte	68
3.15.5.1 Hämalaun und Eosin	68
3.15.5.2 Perjodsäure-Schiff-Reaktion	68
3.15.6 Färbungen für in Kunststoff eingebettete Schnitte	69
3.15.6.1 Hämalaun und Eosin	69
3.15.6.2 Perjodsäure-Schiff-Reaktion	69
3.15.6.3 Kombinierte Färbung mit Perjodsäure-Methenaminsilber, Schiff's Reagenz und Hämalaun	70
<b>3.16 Statistik</b>	<b>70</b>
<b>4 ERGEBNISSE</b>	<b>71</b>
<b>4.1 Herstellung des DNA-Konstruktes für bGH-transgene Tiere auf Inzuchtbasis</b>	<b>71</b>
4.1.1 bGH-Transgen unter der Kontrolle des chicken- $\beta$ -Actin-Promotors	71
4.1.2 bGH-Transgen unter der Kontrolle des humanen $\alpha_1$ -anti-Trypsin-Promotors	72
<b>4.2 Austestung der Konstrukte in vitro</b>	<b>72</b>
<b>4.3 Ergebnisse der pronukleären Injektion</b>	<b>74</b>
4.3.1 bGH-Transgen unter Kontrolle des chicken- $\beta$ -actin Promoters	74
4.3.2 bGH-Transgen unter der Kontrolle des humanen $\alpha_1$ -Antitrypsin-Promoters	75
<b>4.4 Genotypisierung der Tiere</b>	<b>75</b>
<b>4.5 Charakterisierung der transgenen Tiere</b>	<b>78</b>
4.5.1 Vererbungsschema	78
4.5.1.1 Vererbungsschema der c $\beta$ a-bGH Mäuse	78
4.5.1.2 Vererbungsschema der h $\alpha_1$ AT-bGH Mäuse	79
4.5.2 RT-PCR	80
4.5.2.1 c $\beta$ a-bGH Mäuse	80
4.5.2.2 h $\alpha_1$ AT-bGH Mäuse	81
4.5.3 Northern Blot	82
4.5.4 <i>In situ</i> Hybridisierung	82

4.5.4.1	<i>In situ</i> Hybridisierung ohne ‚Tyramide signal amplification‘ (TSA)	82
4.5.4.2	<i>In situ</i> Hybridisierung mit ‚Tyramide signal amplification‘ (TSA)	83
4.5.5	Westernblotanalyse	84
4.5.5.1	Nachweis von bGH im Serum c $\beta$ a-bGH-transgener Mäuse	84
4.5.5.2	Nachweis von bGH im Gewebe der c $\beta$ a-bGH-transgenen Tiere	85
4.5.6	bGH-Konzentration im Serum	86
4.5.7	Klinisch-chemische Parameter	87
4.5.8	Lebenserwartung	92
4.5.9	Körpergewichtsentwicklung	94
4.5.10	Organometrie	95
4.5.11	Morphologische Befunde	100
4.5.11.1	Pathomorphologische Veränderungen der Niere	100
4.5.11.1.1	Frühstadien renaler Alterationen	100
4.5.11.1.2	Progression renaler Alterationen	102
4.5.11.1.3	Terminalstadium der renalen Alterationen	105
4.5.11.2	Pathomorphologische Veränderungen der Leber	108
4.5.11.2.1	Makroskopische Befunde	109
4.5.11.2.2	Histopathologische Befunde	109
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>111</b>
<b>5.1</b>	<b>Diskussion der c<math>\beta</math>a-bGH-transgenen Tiere</b>	<b>111</b>
5.1.1	In vitro Analyse der chicken- $\beta$ -actin Promotoraktivität	111
5.1.2	Identifizierung und Charakterisierung der Transgenintegration des c $\beta$ a-bGH Konstruktes	111
5.1.3	Charakterisierung der Transgenexpression der c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäuse	112
5.1.3.1	Expressionmuster der c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäuse	112
5.1.3.2	bGH-Konzentration im Serum	114
5.1.3.3	Klinisch-chemische Parameter	115
5.1.3.4	Lebenserwartung	118
5.1.3.5	Körpergewichtsentwicklung	118
5.1.3.6	Organometrie	119
5.1.3.7	Pathomorphologische Veränderungen	121
5.1.3.7.1	Pathomorphologische Veränderungen der Niere	121
5.1.3.7.2	Diskussion der Frühstadien der renalen Alterationen	121
5.1.3.7.3	Diskussion über die Progression der renalen Alterationen	123
5.1.3.7.4	Diskussion der Terminalstadien der renalen Alterationen	124
5.1.3.8	Pathomorphologische Veränderungen der Leber	125
<b>5.2</b>	<b>Diskussion der h<math>\alpha</math><sub>1</sub>AT-bGH-transgenen Tiere</b>	<b>126</b>
5.2.1	In vitro-Austestung des $\alpha$ <sub>1</sub> -Antitrypsin-Promotors	126
5.2.2	Ergebnisse der Mikroinjektion	126

Inhaltsverzeichnis	VII
5.2.3 Identifizierung und Charakterisierung der Transgenintegration des $h\alpha_1$ AT-bGH Konstruktes	127
5.2.4 Charakterisierung der Transgenexpression des $h\alpha_1$ AT-bGH-trans-genen Foundertieres	127
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>129</b>
<b>7 SUMMARY</b>	<b>130</b>
<b>8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>131</b>
<b>9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>135</b>
<b>10 TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>137</b>
<b>11 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>138</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>158</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.



## 1 Einleitung

Wachstum und Differenzierung sind biologische Vorgänge von zentraler Bedeutung. In den letzten Jahren sind eine Reihe von transgenen Tiermodellen etabliert worden, die Komponenten des Wachstumshormon (GH)- und Insulin-Like Growth Factor (IGF)-System überexprimieren oder denen bestimmte Komponenten dieser Systeme fehlen. GH-transgene Mäuse haben sich als überaus wertvolles Modell für das Studium von Wachstumsprozessen auf der Ebene des Gesamtorganismus sowie von Organen und Organkomponenten erwiesen (Wolf *et al.* 1991b; Wolf *et al.* 1991c). Es konnten bis heute eine Vielzahl von Wachstumshormongenen verschiedener Spezies und deren Rezeptorgene sowie die verschiedenen cDNAs kloniert werden. Ebenso erkannte man, dass fehlgesteuerte Wachstumsprozesse einen wesentlichen Faktor in der Pathogenese chronischer Nierenerkrankungen spielen (Zatz & Fujihara 1994). Die fortschreitende Nephropathie der GH-transgenen Maus bietet ein überaus wertvolles Modell zur Analyse der Pathogenese der progressiven Glomerulosklerose und der chronischen renalen Insuffizienz (Wanke *et al.* 1990; Wanke *et al.* 2001). Durch eingehende klinische und morphologische Untersuchungen an mehreren Linien GH-transgener Mäuse (Auszucht) konnten die Genese und die Sequenz sowie das Spektrum der renalen Alterationen detailliert charakterisiert werden. Die renalen Veränderungen werden bei GH-transgenen Mäusen regelmäßig beobachtet, die molekulare Ursache dieser Veränderungen bedarf jedoch weiterer Klärung. Im Zeitalter von Genomics und Proteomics ist es von grossem Interesse Transkripte und Proteine zu identifizieren, die im Zusammenhang mit der Wachstumshormon-Überexpression in ihrer Abundanz verändert werden. Das International Human Genome Sequencing Consortium schätzt die Anzahl der Protein codierenden Gene im menschlichen Organismus auf ca. 30.000-40.000. Eine der grossen Aufgaben der Forschung wird es sein Wirkungen dieser Gene zu charakterisieren. Holistische Untersuchungsansätze auf den Ebenen des Transkriptom, des Proteoms und des Metaboloms werden dazu einen wesentlichen Beitrag leisten. Solche Untersuchungen werden jedoch auf einem nicht exakt definierten genetischen Hintergrund durch die genetische Variabilität kompliziert. Daher war es Ziel dieser Arbeit, ein GH-transgenes Mausmodell auf Inzuchtbasis zu entwickeln und zu charakterisieren.

Verfügbare ingezüchtete GH-transgene Mäuse basieren auf dem Inzuchtstamm C57BL/6J. Bei diesen Inzuchtmäusen treten jedoch zu einem hohen Prozentsatz genetisch bedingt spontane Nephropathien in Form von Hydronephrosen auf (Horton *et al.* 1988). Zur speziellen Analyse von Wachstumshormon-induzierten Nephropathien ist dieses Tiermodell daher nur

bedingt geeignet. Für den Inzuchtstamm FVB sind keine derartigen spontanen Nierenveränderungen bekannt. Darüber hinaus ist dieser Stamm sehr fruchtbar und eignet sich hervorragend für die Erstellung transgener Modelle mittels der DNA-Mikeroinjektionstechnik. Aus diesen Gründen wurde der Stamm FVB als genetische Basis für ein neues GH-transgenes Mausmodell gewählt.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Erstellung transgener Tiere durch Mikroinjektion

Für die Erforschung genetisch bedingter Krankheiten sind Tiermodelle seit langem ein wichtiges Hilfsmittel. Die Labormaus (*Mus musculus*) ist durch ihre hohe Fruchtbarkeit und das kurze Generationsintervall ein idealer Modellorganismus für genetische Analysen beim Säugetier.

Die klassische Maustiergenetik nahm ihren Anfang in der Erforschung erblicher Hintergründe von Krebserkrankungen bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts. Die ersten Züchtungen eines Inzuchtstammes von Clarence Little begannen im Jahre 1909 mit der Erstellung des DBA (dilute, brown and non-agouti) Stammes. Insgesamt war die frühe Mausgenetik von klassischen Kreuzungsexperimenten geprägt, die zur Klärung der genetischen Ursache von Veränderungen des Phänotyps dienten. Anfang der 1980er Jahre gelang es zum ersten Mal, gezielte Eingriffe in das Mäusegenom durchzuführen. Der Begriff „transgen“ wurde von Gordon und Ruddle geprägt und beschreibt die Integration zusätzlicher Erbinformation in das Genom (das sogenannte Transgen) (Gordon & Ruddle 1981b). Erstmals konnten sich Wissenschaftler der Frage widmen, welchen Phänotyp gezielte Modifikationen des Genoms hervorrufen können (reverse genetics) und nicht mehr auf der Basis interessanter Phänotypen nach den zugrunde liegenden Mutationen suchen (forward genetics). Auf diesem Wege war es möglich, nun auch die Funktion von Genen im Zusammenhang des Gesamtorganismus zu untersuchen. Viele, durch zahlreiche unterschiedliche Techniken entwickelte transgene Mausmodelle haben seither zur Beantwortung diverser ungeklärter Fragen geführt.

Heute stehen neben der DNA-Mikroinjektion in die befruchtete Eizelle die retrovirale (Soriano *et al.* 1986) oder lentivirale Infektion (Lois *et al.* 2002; Pfeifer *et al.* 2002) von präimplantierten Embryonen und die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (Perry *et al.* 1999) zur Erstellung transgener Labortiere zur Verfügung.

Im Jahre 1966 wurde erstmals die Mikroinjektion in eine befruchtete Eizelle beschrieben (Lin 1966). Die Erstellung von transgenen Tieren mittels dieser Methode ließ jedoch weitere 15 Jahre auf sich warten, so dass erst Anfang der 1980er Jahre die ersten Tiere erzeugt wurden. Etwa zeitgleich berichteten mehrere Arbeitsgruppen vom Erfolg der Mikroinjektion in den Vorkern einer befruchteten Eizelle und der Erstellung von transgenen Tieren (Brinster *et al.* 1981; Gordon & Ruddle 1981a; Gordon *et al.* 1980; Wagner *et al.* 1981). Eine der ersten transgenen Mauslinien waren Mäuse, die das Wachstumshormon der Ratte (rat growth hormone = rGH) überexprimierten (sogenannte rGH-transgene Mäuse) (Palmiter *et al.* 1982).

Die Mikroinjektion von DNA in befruchtete Eizellen ist auch heute noch die am häufigsten durchgeführte Methode zur Erstellung genetisch modifizierter Labormäuse. Dabei wird die DNA in einen der beiden Vorkerne (meist den paternalen) der befruchteten Eizelle injiziert. Der Transfer injizierter Zygoten erfolgt in die Eileiter synchronisierter Empfängertiere. Etwa 15-20 % der transferierten Embryonen entwickeln sich bis zur Geburtsreife. Daraus ergibt sich bei Labormäusen ein relativer Anteil an lebenden transgenen Nachkommen von 4 %, gemessen an der Zahl der transferierten Embryonen (Rülicke 2001).

Bei der Erstellung der transgenen Tiere kommt es vor allem darauf an, dass das gewünschte Transgen auch wirklich exprimiert wird und eine Keimbahntransmission stattfindet, d.h. dass die zusätzliche Erbinformation von den Foundertieren auch an nachfolgende Generationen weitergegeben wird.

## 2.2 Inzucht

Ein wesentlicher Faktor, der zur Streuung von Ergebnissen bei Tierversuchen führt, ist ein variabler genetischer Background der Tiere.

Inzucht steigert die Homozygotie der Nachkommen, dabei bestimmt der Inzuchtkoeffizient  $F$  das Ausmaß der Inzucht. Dieser stellt den Anteil der ursprünglichen heterozygoten Gene dar, die im homozygoten Zustand aufgrund der Inzucht fixiert wurden. Der Inzuchtkoeffizient nimmt mit steigender Inzuchtgeneration zu. Gemäß dem „Comitee on Standardized Nomenclature for Inbred Strains of Mice“ kann eine Population erst nach 20 Generationen der Bruder-Schwester Anpaarung als Inzucht definiert werden (Lyon *et al.* 1989). Ab der 21. Generation beträgt der Inzuchtkoeffizient  $F = 98,4 \%$ . Das bedeutet 98,4 % der ursprünglichen heterozygoten Genorte sind in einem homozygoten Zustand fixiert worden. Somit besitzen sie an fast jedem Genort zwei identische Allele (Green 1981). Mit jeder folgenden Generation fällt der Anteil der Heterozygotie um 19,1 %, so dass nach 30 Generationen 99,8 % des Genoms homozygot sind und dass nach weiteren 10 Generationen 99,98 % des Genoms homozygot sind.

Der FVB Inzuchtstamm ist für die Erstellung von transgenen Mäusen durch Mikroinjektion auf einem Inzuchtbackground der Stamm der Wahl. Die Mäuse zeigen eine hohe Reproduktionsrate mit einer großen Wurfgröße. Die Mikroinjektion wird durch große prominente Vorkerne der Zygoten erleichtert (The Jackson Laboratory ). Die Überlebensrate der injizierten Eizellen ist wesentlich höher als bei befruchteten Eizellen des Inzuchtstammes C57BL/6 (Taketo *et al.* 1991).



## 2.3 Das Wachstumshormon

Das Wachstumshormon (GH) gehört zu einer Familie von Hormonen, die vermutlich alle von einem allgemeinen Vorläufer abstammen (Miller & Eberhardt 1983; Niall *et al.* 1971). Zu dieser Familie gehören neben dem GH das Prolactin (PRL) und das Choriosomatamamotropin (CS). Wachstumshormone werden von Genen codiert, die etwa eine Länge von 2 kb (5 Exons und 5 Introns) vorweisen. Das Start Codon ist im Exon I und das Stop Codon im Exon IV lokalisiert (Miller & Eberhardt 1983).

### 2.3.1 Geschichtlicher Überblick

Bereits im Jahre 1886 beobachtete Pierre Marie eine Vergrößerung der Hypophyse bei Patienten mit einer Acromegalie. Jedoch erst Anfang des 20. Jahrhunderts lieferten klinische Studien von Dr. Harvey Cushing experimentelle Daten, die speziell den Hypophysenvorderlappen mit dem Körperwachstum in Verbindung brachten (Cushing 1909a; Cushing 1909b). Evans und Long zeigten 1921, dass Extrakte aus dem Hypophysenvorderlappen des Rindes das Wachstum bei Ratten stimulierten (Evans & Long 1921). Wenige Jahre später gelang dieser Versuch auch an hypophysektomierten Ratten (Smith 1927). Die Isolierung des dafür verantwortlichen Peptides gelang Li und Evans erst im Jahre 1994. Anfängliche Versuche im Jahre 1950, auch das menschliche Wachstum mit bovinem Wachstumshormon zu stimulieren, schlugen jedoch fehl (BENNETT *et al.* 1950). Martial *et al.* gelang es 1979 erstmals, die DNA des humanen Wachstumshormons in einen Plasmidvektor zu klonieren (Martial *et al.* 1979). Dadurch wurde der Weg zur kommerziellen Produktion des rekombinanten Hormons bereitet. Bis Mitte der 1980er Jahre galt die Therapie mit humanem Wachstumshormon als weitgehend nebenwirkungsfrei. Durch die Analyse GH-transgener Tiere wurden wertvolle Informationen über die physiologische Wirkungsweise dieses Hormons gewonnen. Auf klinischer Seite konnten viele Nebenwirkungen, gleichzeitig aber auch viele neue Therapieansätze mit GH ermittelt werden.

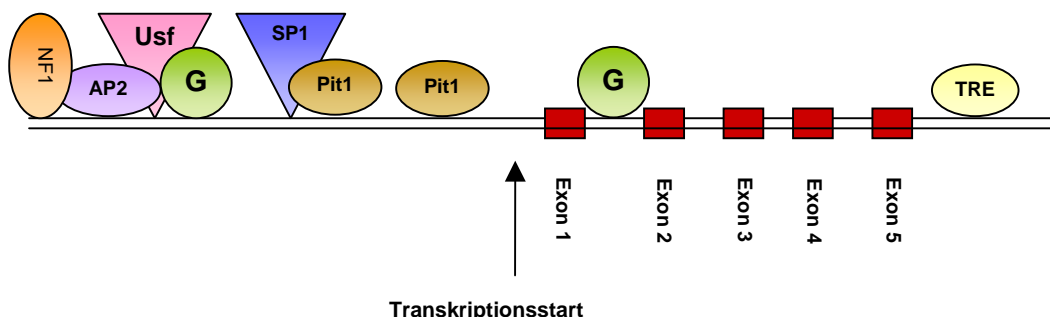
### 2.3.2 Synthese des Wachstumshormons

Beim bovinen Wachstumshormon (bGH) handelt es sich um ein einkettiges Peptidhormon aus 191 Aminosäuren mit zwei Disulfidbrücken und einem Molekulargewicht von 22.000 Dalton. Das entsprechende Gen ist auf dem Chromosom 19q22 lokalisiert (NCBI, Gene). Das Wachstumshormon wird als Prä-Wachstumshormon (Prä-GH) mit einem Molekulargewicht von 24.562 Dalton synthetisiert (Miller *et al.* 1980). Die mRNA für das Prä-GH codiert für ein überwiegend aus hydrophoben Aminosäuren bestehendes Signalpeptid (Cooke *et al.* 1980;

Maniatis *et al.* 1975) und enthält drei Pallindromregionen am nicht translatierten 3'-Ende. Das 5'-Ende des Prä-GH wird aus 31 Nukleotiden ohne Pallindromregion oder invertierte Wiederholungen, die auf die Ausbildung von Sekundärstrukturen hindeuten könnten, gebildet (Miller *et al.* 1980). Das N-terminale Präkursorsegment wird in den Granula der somatotropen Zellen enzymatisch abgespalten, und das Hormon wird intragranulär in den somatotropen (azidophilen) Zellen des Hypophysenvorderlappens gespeichert. Intrazelluläres cAMP und/oder freies  $\text{Ca}^{2+}$  lösen nach Bindung von GHRH (growth hormon releasing hormon) an seinen Rezeptor auf den somatotropen Zellen die Sekretion aus den Granula aus (Bilezikjian & Vale 1983).

Die Freisetzung von GH aus den Granula wird durch Somatostatin gehemmt. Nach Bindung des Somatostatins an seinen Rezeptor führt dies zu einem Kaliumioneninflux mit folgender Hyperpolarisation der Membran. Die Hyperpolarisation wiederum hemmt den Kalziumeintritt in die Zelle und es kann kein GH mehr aus den Granula freigesetzt werden (Lussier *et al.* 1991).

Die Synthese der GH-mRNA steht in den somatotropen Zellen unter der Kontrolle von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, Hormonen und cAMP (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Transkriptionsregulation des GH Gens.**

Die Transkriptionsfaktoren Pit1 (pituitary specific transcription factor 1), G (glucocortikoid response element), Sp1 (trans-acting transcription factor 1), Usf (upstream transcription factor), AP2 (activator protein 2) und NF-1 (nuclear factor 1) binden an jeweils eine spezifische DNA Region und aktivieren dadurch die Transkription des GH-Gens. TRE (thyroid response element) hingegen verringert durch seine Bindung die Transkription.

- Pituitary-specific transcription factor-1 (Pit1): Das homeotische Protein ist sowohl für die embryonale Hypophysendifferenzierung, als auch für die GH-Sekretion verantwortlich. Es stimuliert die Proliferation der somatotropen Zellen und ist essentiell für die Transkription des GH-Gens (Castrillo *et al.* 1991). Das Pit1 Protein bindet an zwei spezifische DNA

Regionen unmittelbar 5'wärts des GH Startcodons (Transkriptionsstart) und aktiviert durch seine Bindung die Transkription von GH mRNA (Lefevre *et al.* 1987).

Weiterhin führt GHRH zu einem akuten intrazellulären cAMP Anstieg in den somatotropen Zellen. Da die Promotorregion des Pit1 Gens eine DNA-Bindungsdomäne für den cAMP-CREB Komplex (cAMP responsive element binding protein) enthält, führt ein Anstieg von cAMP wiederum zur Stimulierung der Pit1 Transkription (McCormick *et al.* 1990).

- Weitere Transkriptionsfaktoren: Für den trans-acting transcription factor 1 (Sp1), das activator protein 2 (AP2), den nuclear factor 1 (NF1) und den upstream transcription factor (Usf) existieren spezifische Bindungsdomänen an der DNA, wodurch die Transkription von GH mRNA stimuliert wird (Courtois *et al.* 1990; Lemaigre *et al.* 1990).
- Glukokortikoide: Glukokortikoide steigern den GH-mRNA Spiegel durch eine Steigerung der Transkription einerseits (Slater *et al.* 1985) und durch die Stabilisierung der mRNA andererseits (Paek & Axel 1987). Die Transkription erfolgt durch Bindung des Glukokortikoid Hormon-Rezeptor Komplexes an eine Region des GH Gens, die als glucocorticoid response element (G) bezeichnet wird. Bisher konnten zwei solcher Bindungsstellen identifiziert werden, eine 5'wärts des Transkriptionsstartes und die zweite im ersten Intron des GH Gens (Moore *et al.* 1985; Slater *et al.* 1985).
- Schilddrüsenhormone: Schilddrüsenhormone verringern den GH Spiegel durch eine 3'-wärts des Translationsstopcodons gelegene DNA-Bindungsdomäne, das thyroid response element (TRE) (Zhang *et al.* 1992). Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt.

### 2.3.3 Physiologische Wirkungen des Wachstumshormons

Die physiologischen Effekte von GH sind pleiotrop. Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über einige der physiologischen Effekte des Wachstumshormons:

**Tabelle 1: Physiologische Effekte des Wachstumshormons (Le Roith *et al.* 2001).**

Stimmulierende Wirkung des GHs	Inhibierende Wirkung des GHs
Logitudinales Knochenwachstum Proliferation der Chondrozyten Proliferation der Osteoblasten (Knochenaufbau) Proliferation des Osteoklasten (Knochenabbau) TypI Kollagensynthese	Insulin Wirkung IGFBP-1 Synthese IGFBP-2 Synthese
Skelettmuskelwachstum	
Leberwachstum	
Lipolyse	

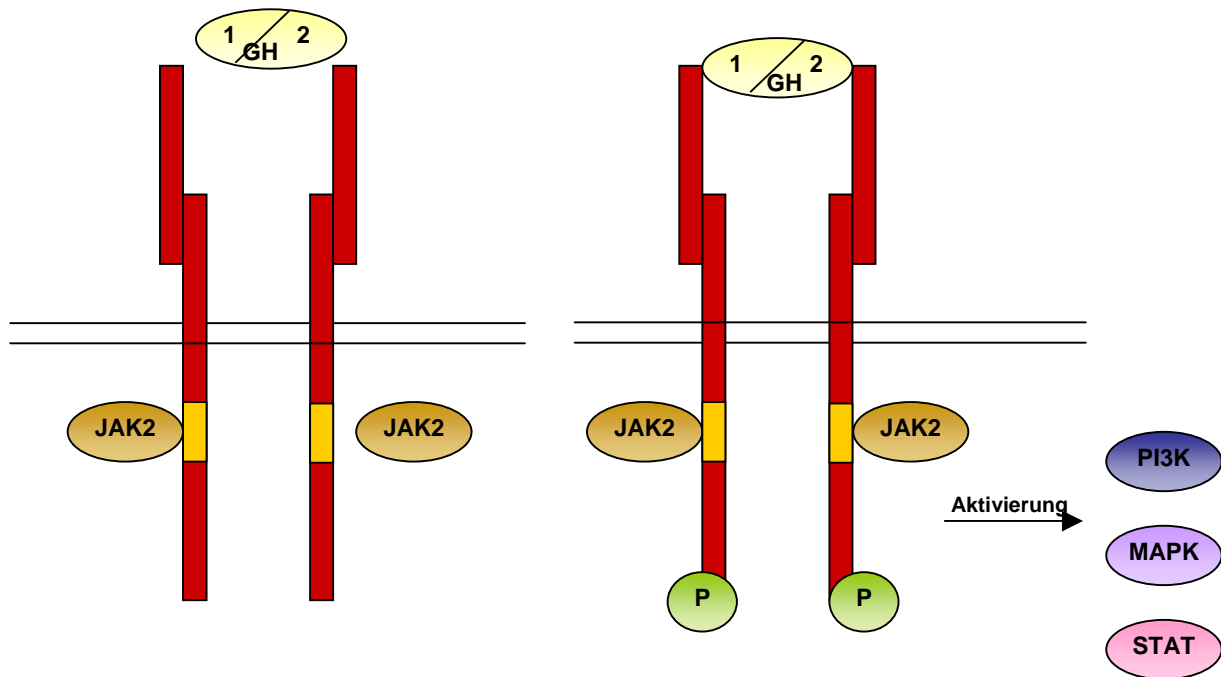
Ketogenese	
Gluconeogenese	
Proteinsynthese	
Positive Stickstoffbilanz im Organismus	
IGF-I Synthese	
ALS Synthese	
Serinprotease Inhibitoren (SPI) 2.1 und 2.2	
Immunmodulation B und T Zellproliferation Makrophagenaktivität Neutrophilenaktivität Immunglobulinproduktion Zytokinproduktion	

### 2.3.4 Wachstumshormonrezeptor und Signaltransduktion

Der Wachstumshormonrezeptor (GHR) ist ein Glycoprotein mit einer intra- und einer extrazellulären Region sowie einer Transmembrandomäne (Typ I Transmembranprotein) und wird der Zytokinrezeptor-Familie zugeordnet (Bazan 1990). Die extrazelluläre Region ist für die Hormonbindung zuständig. Die 350 Aminosäuren lange intrazelluläre Region vermittelt die Signaltransduktion sowie sekundär eine Desensibilisierung durch Internalisierung des Rezeptors (Frank 2001). Die Expression des GHR ist gewebespezifisch und wird von vielen Faktoren, wie z.B. dem Alter und dem Ernährungszustand beeinflusst (Martinez *et al.* 1999; Shuto *et al.* 1999).

Ein einzelnes GH Molekül bindet mit seinen beiden Bindungsstellen GH1 und GH2 an je eine extrazelluläre GHR-Monomer-Domäne und führt dadurch zur Dimerisierung des Rezeptors (siehe Abbildung 2) (Zhang *et al.* 1999). Interaktionen der extrazellulären Domänen der beiden Monomere führen zu einer weiteren Stabilisierung des Rezeptors (Cunningham *et al.* 1991). Die GHR Signaltransduktion beginnt mit der Aktivierung der Tyrosinkinase JAK2, einem Mitglied der Janus Kinase Familie (Argetsinger *et al.* 1993). Janus Kinasen sind charakterisiert durch eine C-terminale Tyrosinkinasedomäne, eine inaktive Kinase-like-Domäne (Pseudokinase) und einen N-terminalen Anteil, der für die Interaktion mit dem Substrat verantwortlich ist. Dieser Anteil scheint auch für die Interaktion mit der GHR-box, einer intrazellulären prolinreichen Domäne des Rezeptors, verantwortlich zu sein (Frank *et al.* 1994; VanderKuur *et al.* 1994). JAK2 vermittelt dann eine Phosphorylierung des GH Rezeptors (Frank *et al.* 1995). Durch die Phosphorylierung kommt es in der weiteren Signalkaskade (downstream signalling pathway) zur Aktivierung von STAT Proteinen (signal transducers and activators of transcription) (Herrington *et al.* 2000), der Aktivierung des MAP Kinase Systems (mitogen-activated protein kinase) (Anderson 1992) (Campbell *et al.* 1992)

und der PI3K (Phosphoinositol-3-Kinase) (Frank 2001). Des weiteren sind eine Aktivierung (Phosphorylierung) von IRS-1 und IRS-2 (insulin receptor substrat) beschrieben.



**Abbildung 2: Aktivierung des GHR Signalweges.**

Die Bindung von GH mit seinen beiden Bindungsstellen (GH 1 und 2) an die extrazellulären GHR-Monomer-Domänen führt zu einer Dimerisierung und Stabilisierung des Rezeptors. Die Tyrosinkinase JAK2 (Januskinase 2) bindet an die prolinreiche Box1 (orange) des Rezeptors und führt zu dessen Phosphorylierung. In der weiteren Signaltransduktionskaskade werden STAT5b, MAP Kinasen und der PKI3 Signalweg aktiviert.

STATs sind Transkriptionsfaktoren, die in ihrer unphosphorylierten Form im Zytoplasma lokalisiert sind und folglich keinen Einfluß auf die Transkription haben. Durch Tyrosinphosphorylierung wird eine Dimerisierung durch eine SH2-Domäne ermöglicht. Die dimerisierten STATs können in den Zellkern eingeschleust werden und dort durch Bindung an Promotoren verschiedener Zielgene die Transkription modulieren (Ihle 2001; Zhu *et al.* 2001). In der GH Signalkaskade werden STAT 1, 3, 5a und 5b aktiviert (Herrington *et al.* 2000). Die große Bedeutung von STAT5b wird dadurch unterstrichen, dass Knockoutmäuse für dieses Gen Zwergwüchsigkeit, Fettleibigkeit, erhöhte GH-Plasmaspiegel, erniedrigte IGF-I-Plasmaspiegel sowie eine Aufhebung des Geschlechtsdimorphismus in der Gewichtsentwicklung aufweisen (Udy *et al.* 1997).

IRS Proteine sind Adaptormoleküle, die eine entscheidende Rolle in der Koppelung des Insulinrezeptors (IR) und des IGF-I-Rezeptors an deren weiteren Signalmediatoren vermitteln. Auch im Falle des GHR erfolgt, vermittelt durch IRS-1 und IRS-2, eine Aktivierung des PI3K Signalweges.

Einige der Mediatoren, die im Rahmen der Signaltransduktion von GH aktiviert werden, können ein negatives Feedback auf die intrazelluläre Verarbeitung des GH-Signals vermitteln. Zu diesen zählen die SOCS Proteine 1-7 (suppressor of cytokine signaling 1-7). Diese binden an JAK2 und inhibieren dadurch die weitere Signaltransduktion des GHRs (Finidori 2000; Herrington & Carter-Su 2001). Ebenfalls mit negativer regulatorischer Wirkung hemmt das membranständige Glykoprotein SIRP (signal regulated protein) die Aktivierung des JAK2-Signalweges (Carter-Su *et al.* 2000; Stofega *et al.* 2000). Diese Feedbacksysteme werden als homologe Desensibilisierung bezeichnet.

Die Hemmung der Signaltransduktion durch Modulation der Rezeptor-Ligand-Interaktion bezeichnet man im Gegensatz dazu auch als heterologe Desensibilisierung.

Bei der heterologen Desensibilisierung kommt es beim Menschen und beim Kaninchen zur Proteolyse des GHRs. Durch Abspaltung der extrazellulären Domäne des GHR als GH-Bindungsprotein (GHBP) wird die Menge der aktivierbaren Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen verringert (Dastot *et al.* 1998).

In vielen Spezies ist eine beträchtliche Menge des zirkulierenden Wachstumshormons an wachstumshormonspezifische Bindungsproteine gebunden. Die exakte physiologische Bedeutung der Bindungsproteine ist unklar. Es ist bekannt, dass GHBP bis zu 60 % des zirkulierenden GHs bindet (Baumann *et al.* 1988). Die dadurch erfolgte Speicherung bzw. das Abfangen der pulsatilen GH Peaks wird als eine Funktion der GHBP beschrieben (Kopchick & Andry 2000). Eine weitere Funktion ist die Erhöhung der Halbwertszeit des GHs von etwa 20 Minuten auf bis zu mehreren Stunden. Dies geschieht hauptsächlich durch die Verringerung der Clearance in der Niere (Hokken-Koelega *et al.* 1990). Die Bildung der GHBPs erfolgt speziesspezifisch. So erfolgt die Bildung im Nager durch ein alternatives Splicing der GH mRNA, bei Mensch und Kaninchen hingegen durch eine proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne des GHR (Dastot *et al.* 1998).

GH kann die Ausbildung von GHR/GHBP konzentrationsabhängig und gewebespezifisch beeinflussen (Meinhardt *et al.* 2003). In bGH-transgenen Mäusen war die GHR/GHBP mRNA Expression in der Leber positiv korreliert mit dem Serum-GH-Spiegel (Iida *et al.* 2004). In der Hypophyse hingegen wird die Expression von GHR/GHBP nicht von den GH Spiegeln beeinflusst (Iida *et al.* 2004) und in der Niere ist sogar eine negative Korrelation zwischen der GHR-Expression und dem Serum-GH-Spiegeln zu verzeichnen (Chen *et al.* 1997).

Ein wichtiger Mediator der GH-Wirkungen ist der Insulin-like growth factor-I. Dabei handelt es sich um ein basisches einkettiges Peptid, das eine große Strukturhomologie zum Insulin

aufweist (Blundell & Humbel 1980). IGF-I bindet mit hoher Affinität an den IGF-I-Rezeptor (Jones & Clemmons 1995), kann aber auch durch Bindung an den Insulinrezeptor eine biologische Aktivität, ähnlich dem Insulin, hervorrufen (Dupont & Holzenberger 2003). Postnatal stammt der Hauptanteil des zirkulierenden IGF-I aus der Leber (Sjogren *et al.* 1999). Aber auch in weiteren Geweben, wie der Niere, Lunge, Herz, Hoden sowie den Epiphysenfugen wird IGF-I produziert (Hansson *et al.* 1989; Isaksson *et al.* 1988; Nilsson *et al.* 1986).

### 2.3.5 Neuroendokrine Regulation der GH Sekretion

- Growth hormone-releasing hormone:

Humanes GHRH wurde erstmals 1982 aus GHRH hypersekretierenden Pankreastumoren zweier Acromegaliepatienten isoliert (Guillemin *et al.* 1982) und konnte 1983 auch im Hypothalamus nachgewiesen werden (Bohlen *et al.* 1983). Im Hypothalamus des Menschen wurden zwei Formen des GHRH nachgewiesen, ein Peptid aus 44 Aminosäuren (1-44)-NH<sub>2</sub> und ein Peptid mit 40 Aminosäuren (1-40)-OH (Bohlen *et al.* 1983). Bei Schaf, Schwein, Ziege und Rind wurde eine 44 Aminosäuren Form und bei der Ratte eine 43 Aminosäuren Form des GHRH ermittelt (Ling *et al.* 1984). GHRH wird im Nucleus arcuatus und im Nucleus ventromedialis des Hypothalamus synthetisiert und ins Portalblut des Hypothalamus-Hypothalamus Kreislaufes abgegeben (Bloch *et al.* 1984). GHRH vermittelt durch Bindung an den GHRH-Rezeptor der somatotropen Zellen des Hypophysenvorderlappen eine Freisetzung von GH und eine Transkription von neuer GH-mRNA (Barinaga *et al.* 1983).

- Somatostatin:

Somatostatin (SS) wurde erstmals 1973 in Extrakten aus Schafhypophysen identifiziert (Brazeau *et al.* 1973). Es existieren zwei Formen, eine mit 14 (Somatostatin-14) und eine mit 18 Aminosäuren (Somatostatin-18) (Shen *et al.* 1982). SS-14 ist vor allem im Gehirn lokalisiert, während SS-18 im Magen-Darm-Trakt vorkommt. Beide Formen inhibieren die GH Sekretion.

GHRH und SS sind maßgeblich für die pulsatile Ausschüttung von GH verantwortlich. Die GH-Freisetzung folgt einer circadianen Periodik. Beobachtungen bei männlichen Ratten ergaben Peaks in einem Rhythmus von 3,3 Stunden (Tannenbaum & Martin 1976), während bei weiblichen Tieren ein eher kontinuierliches Sekretionsprofil zu beobachten war (Eden 1979).

Das GH-Sekretionsprofil führt zu einer geschlechtsspezifischen Expression des Prolaktinrezeptors, des Östrogenbindungsproteins (Mode *et al.* 1982; Norstedt 1982) und des Major Urinary Proteins (MUP) (Knopf *et al.* 1983) in der Leber. Die Bildung der MUPs setzt eine pulsatile GH Ausschüttung voraus. Bei Tieren mit einem kontinuierlichen hohen GH-Spiegel (GH-transgenen Tieren) kommt es zu einer Reduktion der Expression von MUPs. Das Expressionprofil gleicht dem eines weiblichen Tieres (Norstedt & Palmiter 1984).

Daneben gibt es weitere Faktoren, die die GH Freisetzung kontrollieren. Diese sind oftmals mit dem metabolischen Status des Organismus gekoppelt:

- Freie Fettsäuren (FFA) inhibieren die GH Ausschüttung direkt an der Hypophyse. Dieser Mechanismus wird als Feedback postuliert, da GH die Lipidsynthese stimuliert (Imaki *et al.* 1985; Muggeo *et al.* 1975).
- Leptin stimuliert die GH Sekretion am Hypothalamus, wobei es in die Regulation von GHRH und SS eingreift (Carro *et al.* 1997). (Tannenbaum *et al.* 1998)
- Ghrelin stimuliert die GH Ausschüttung bei Nagetieren und Menschen über den Growth hormone secretagogue Rezeptor (Takaya *et al.* 2000; Wren *et al.* 2000).

## 2.4 GH-transgene Mausmodelle

Das erste GH-transgene Mausmodell, erstellt durch DNA-Mikroinjektion, wurde 1982 von Palmiter und Brinster beschrieben. Dabei wurde das Ratten-GH Gen (rGH) mit dem Promotor des Maus-Metallothionin-I (mMT) Gens verbunden und in die Vorkerne befruchteter Eizellen injiziert (Palmiter *et al.* 1982). Das Konstrukt wurde stabil in das Genom integriert und entsprechend den Mendelschen Regeln an die Nachkommen weitervererbt. Im Alter von 3 Wochen entwickelten die Tiere einen der Wirkung des Transgens entsprechenden Phänotyp. Die transgenen Tiere nahmen im Vergleich zu ihren nicht-transgenen Geschwistertieren an Körpergewicht stärker zu und erreichten nahezu das doppelte Körpergewicht.

Es folgten weitere GH-Mausmodelle mit dem Wachstumshormon anderer Spezies: Humanes GH (hGH) (Brem *et al.* 1989; Palmiter *et al.* 1983; Wolf *et al.* 1991a), bovines GH (bGH) (McGrane *et al.* 1988; McGrane *et al.* 1990; Turyn & Bartke 1993) und ovines GH (oGH) (Orian *et al.* 1988) (Orian *et al.* 1989) wurden bislang in das Mausgenom integriert (Tabelle 2, Tabelle 3 und Tabelle 4).

GH-transgene Mäuse können das Wachstumshormon - in Abhängigkeit von der verwendeten Promotorsequenz - sowohl ubiquitär oder in spezifischen Geweben exprimieren. Das Ausmaß der beobachteten phänotypischen Konsequenzen hängt von der Höhe der Serum-GH-Konzentrationen wie auch dem Expressionsmuster ab (Abschnitt 2.5.).



Die Wahl des Promotors, der das Gen reguliert, ist ein wichtiges Element in der Erstellung der transgenen Tiere. Durch Wahl eines bestimmten Promotors können der Expressionsort und der Expressionszeitpunkt des Transgens bestimmt werden. Steht das Gen z.B. unter Kontrolle des Phosphoenopyruvate-Carboxykinase (PEPCK) Promotors, beginnt die Expression des Gens mit der Geburt und wird in den für den Promotor spezifischen Geweben (Leber, Niere, Fettgewebe, Jejunum, Lunge, Mamma und Skelettmuskel) exprimiert (McGrane *et al.* 1990). Der PEPCK Promotor hat zusätzlich noch weitere regulatorische Elemente, wie zum Beispiel eine durch Glukokortikoide und cAMP stimulierbare Region und eine durch Insulin inhibierbare Region (McGrane *et al.* 1990), wodurch sich zusätzlich zu der basalen konstitutiven Expression weitere Einflussmöglichkeiten durch körpereigene Hormone ergeben.

Tabelle 2: GH-transgene Mausmodelle mit Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Promotor.

Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Promotor				
Promotor	Gen	Mäusestamm	Serum GH Spiegel (ng ml <sup>-1</sup> )	Referenzen
rPEPCK	bGH	C57BL56/SJL	8-2300	(McGrane <i>et al.</i> 1988)
rPEPCK-355	bGH	C57BL6/SJL	k.A.	(McGrane <i>et al.</i> 1990)
rPEPCK-460			1000-5000	
rPEPCK-2000			k.A.	
rPEPCK	bGH 5 Kopien	C57BL/6 x C3H	300-500	(Turyn & Bartke 1993)
rPEPCK	bGH 25 Kopien		150-250	
rPEPCK	bGH	C57BL/6SJL	k.A.	(Patel <i>et al.</i> 1994)
rPEPCK	bGH	C57BL6/J x C3H/J	4381±700	(Phelps & Bartke 1997)
rPEPCK	bGH	NMRI x C57BL/6	2000	(Hoeflich <i>et al.</i> 2001)
rPEPCK	hGH	C57BL/6 x C3H	k.A.	(Milton <i>et al.</i> 1992)
rPEPCK	hGH	C57BL6/J x C3H/J	491±55	(Phelps & Bartke 1997)

k.A. keine Angabe

Tabelle 3: GH-transgene Mausmodelle mit Metallothionein I Promotor.

Metallothionein I Promotor				
Promotor	Gen	Mäusestamm	Serum GH Spiegel (ng ml <sup>-1</sup> )	Referenzen
mMT	bGH	C57BL/6 x SJL/J	500-6000	(Chen <i>et al.</i> 1990)
mMT	bGH	C57BL/6 x C3H/J	♂: 8,2±1,7 ♀: 2,14±0,69	(Steger <i>et al.</i> 1991)
mMT	bGH	In C57BL/6 x SJL inj. dann mit B6C3 weitergezüchtet	k.A.	(Prins <i>et al.</i> 1992)
mMT	bGH	C57BL/6JxCBA	1057±55	(Sandstedt <i>et al.</i> 1994)
mMT	bGH	C57BL6/J x C3H/J	301,3±94,8	(Phelps & Bartke 1997)
mMT	bGH	CF1	k.A.	(Kaps <i>et al.</i> 1999)
mMT	bGH20	C57BL/6J x C3H/HeJ angepaart mit C3H/SnJ Females	6-21	(Hall <i>et al.</i> 2002)
mMT	hGH	C57BL/6 x SJL	n.d.-64000 *35-143000	(Palmiter <i>et al.</i> 1983)
		C57BL/6	n.d.-9600 *4000-130000	
mMT	hGH	C57BL/6 x C3H Hybrid	7,7-4500	(Selden <i>et al.</i> 1989)
mMT	hGH_B	C57BL/6 x C3H	GHB: 17400-30900	(Selden <i>et al.</i> 1988)
mMT	oGH1	C57BL/6 x SJL/J	8-12900	(Orian <i>et al.</i> 1989)
mMT	oGH1	C57BL/6J x SJL/J wurden angepaart mit C57BL/6	k.A.	(Snibson 2002)
mMT	rGH	k.A.	280-112000	(Palmiter <i>et al.</i> 1982)
mMT	rGH	lit/lit	1463-31200	(Hammer <i>et al.</i> 1984)
oMT	oGH-10	C57/BL6 x CBA	♀: 12±4 ♂: 14±8 ♀*: 150±115 ♂*: 270±360	(Shanahan <i>et al.</i> 1989)
oMT	oGH-10/10 homozygot		♀*: 903 ♂*: 31	
oMT	oGH-75		♂/♀: 10±3 ♀*: 884±1653 ♂*: 895±1593	

k.A. keine Angabe; \* mit Zink stimuliert, n.d. nicht detektierbar.

**Tabelle 4: GH-transgene Mausmodelle mit weiteren Promotoren.**

Weitere Promotoren				
Promotor	Gen	Mäusestamm	Serum GH Spiegel (ng ml <sup>-1</sup> )	Referenzen
Albumin	hGH	k.A.	k.A.	(Pinkert <i>et al.</i> 1987)
Bovine $\beta$ -Casein	hGH	B6CBF2	4,49-10,33	(Cerdan <i>et al.</i> 1998)
Elatase I	hGH	C57BL/6 x SJL	k.A.	(Ornitz <i>et al.</i> 1985)
GFAP (glial fibrillary acidic protein)	bGH	C57BL/6J x CBA	334 $\pm$ 53	(Bohlooly-Y <i>et al.</i> 2001b)
GK (Glucokinase)	hGH	C57BL/6J x DBA/2J	k.A.	(Jetton <i>et al.</i> 1994)
hDPPIV (humane Dipeptidyl Peptidase IV)	hGH	C57BL/6	k.A.	(Gum <i>et al.</i> 2000)
mMTV (mouse mammary tumor virus) LTR	hGH 5 kDa	BALB/c x DBA/2 F2 (Founder) wurden angepaart mit BALB/cJ	209 $\pm$ 119	(Stewart <i>et al.</i> 1992)
	hGH 20 kDa		997 $\pm$ 1146	
	hGH 22 kDa		267 $\pm$ 301	
mtHMG-CoA (mitochondriale-3 hydroxy-3 Methylglutaryl CoA)	hGH	C57BL56/SJL	0,7-1,8	(Serra <i>et al.</i> 1996)
Ratten Osteocalcin	hGH	BALB/c	1,4-1023	(Baker <i>et al.</i> 1992)
RSV-LTR (Rous Sarcoma Virus)	bGH	C57BL/6 x DBA/2	322-738	(Conti <i>et al.</i> 1995)
rWAP (rabbit-whey acid protein)	hGH	C57BL6J x CBA	12-2400	(Devinoy <i>et al.</i> 1994)
		C57BL6J x SJL	12-1500	

k.A. keine Angabe

## 2.5 Phänotypische Veränderungen GH-transgener Mäuse

### 2.5.1 Körper-, Skelett- und Organwachstum

#### 2.5.1.1 Körpergewicht und Skelettveränderungen

Die Überexpression von verschiedenen Wachstumshormonen hat einen signifikanten Effekt auf das Körperwachstum. Das Körpergewicht der GH-transgenen Tiere war bis auf das Doppelte gegenüber den nicht-transgenen Geschwistertieren erhöht (Brem *et al.* 1989). Die Wachstumskurven zeigen eine Gewichtssteigerung ab der vierten Woche sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Tieren der MT-hGH (Brem *et al.* 1989), PEPCK-bGH und der MT-bGH (Wanke *et al.* 1992) Mäuse. Bei MT-hGH-transgenen Mäusen, die durch einen sehr hohen GH-Serumspiegel gekennzeichnet sind, war der Geschlechtsdimorphismus bei der Gewichtsentwicklung aufgehoben (Brem *et al.* 1989). Im Gegensatz dazu konnte sowohl bei den PEPCK-bGH, als auch bei den MT-bGH-transgenen Mäusen immer noch der physiologische Gewichtsunterschied zwischen den Geschlechtern beobachtet werden (Wanke *et al.* 1992).

Die Werte externer Körperproportionen, wie der Nasen-Rumpf-Länge (NRL) und der Hinterfußlänge (HFL) waren bei MT-hGH- (Wolf *et al.* 1991d) und MT-rGH-transgenen Tieren (Shea *et al.* 1987) um etwa 19 % (NRL) bzw. 7 % (HFL) im Vergleich zu ihren nicht-transgenen Geschwistertieren erhöht. Wolf *et al.* konnten jedoch keine signifikante Korrelation zwischen GH-Spiegel und externen Körperproportionen feststellen (Wolf *et al.* 1991d). Da beim Knochenwachstum neben den Hormonen auch physikalische Faktoren, wie die mechanische Belastung eine Rolle spielen, wurden von Wolf *et al.* auch Mäuse, die über viele Generationen auf hohes 8-Wochengewicht selektiert worden waren, in den Vergleich mit MT-hGH-transgenen Tieren einbezogen. Aufgrund der Tatsache, dass die Knochendimensionen der GH-transgenen Tiere größer waren als die der Gewichts-selektierten Mäuse, kamen Wolf *et al.* zu dem Schluss, dass die veränderten Knochendimensionen nur zum Teil auf das gesteigerte Körpergewicht zurückzuführen sind (Wolf *et al.* 1991d).

Neben GH sind Östrogene für eine normale Knochenentwicklung essentiell. Sandstedt *et al.* konnten zeigen, dass bei weiblichen GH-transgenen Tieren eine Zunahme sowohl der Knochendimensionen, als auch der Knochendichte nur in Kombination mit Steroidhormonen erfolgte (Sandstedt *et al.* 1996). Neuere Untersuchungen ergaben, dass chronisch erhöhte GH-Spiegel die Knochenzusammensetzung der Ossa brevia geschlechtsspezifisch verändern. Bei männlichen MT-bGH-transgenen Mäusen konnten keine Veränderungen an der

Femurdichte, der relativen Fläche der Corticalis und des Knochenvolumens der Ossa brevia festgestellt werden. Bei den weiblichen Tieren hingegen zeigten sich eine gesteigerte Dichte des Femurs und eine Volumensteigerung der Ossa brevia, wobei die Mineralisierung der Knochen bei beiden Geschlechtern verringert war (Eckstein *et al.* 2002).

Sandstedt *et al.* diagnostizierten bei 6 Monate alten MT-bGH-transgenen Mäusen eine Lahmheit im Kniegelenk. Die anschließenden histologischen und immunologischen Untersuchungen ergaben eine immunmedierte Arthritis (Ogueta *et al.* 2000).

### 2.5.1.2 Organgewichte

Visceromegalie ist eine regelmäßig auftretende Veränderung bei GH-transgenen Mäusen. Das Ausmaß der Vergrößerung variiert von Organ zu Organ. Zudem wurden auch Unterschiede zwischen den einzelnen GH-transgenen Linien festgestellt (siehe Tabelle 5).

Hammer *et al.* beschrieben 1985 erstmals eine Visceromegalie bei MT-rGH-transgenen Tieren. Dabei stellten sie eine Erhöhung aller absoluten Organgewichte (mit Ausnahme des ZNS und der Ovarien) fest, die bei den männlichen und weiblichen Tieren in unterschiedlichem Maße ausgeprägt war (Hammer *et al.* 1985).

Shea *et al.* bestätigten das Ergebnis der Visceromegalie von Hammer *et al.*. Auch sie konnten eine Erhöhung des absoluten Organgewichtes aller untersuchten Organe exklusive des ZNS zeigen. Eine allometrische Analyse zeigte nur für die Organe Leber, Milz und Thymus ein überproportionales Wachstum (Shea *et al.* 1987).

Untersuchungen von MT-hGH- und MT-bGH-transgenen Mäusen hingegen ergaben eine Erhöhung des absoluten Organgewichtes aller untersuchten Organe (Brem *et al.* 1989; Quaife *et al.* 1989). Brem *et al.* setzten zusätzlich das Organgewicht ins Verhältnis zum Körpergewicht (relatives Organgewicht) und konnten dafür bei MT-bGH-transgenen Tieren erhöhte Werte für die Organe Leber, Nieren, Herz und Lunge feststellen (Brem *et al.* 1989).

Auch die Wahl eines anderen Promotors führte zu einer Erhöhung der Organgewichte. PEPCK-bGH-transgene Tiere zeigten sowohl im Alter von fünf Wochen als auch mit 15 Wochen eine signifikante Erhöhung aller untersuchten Organgewichte (Milz, Leber, Haut, Nieren, Herz, Pankreas) verglichen mit Organen der nicht-transgenen Geschwistertiere. Das Karkassengewicht war bei den fünf Wochen alten Tieren nur in der Tendenz erhöht, während bei den 15 Wochen alten Tieren eine Signifikanz gegenüber den Kontrolltieren gezeigt werden konnte (Hoeflich *et al.* 2001).

Tabelle 5: Übersicht über Organveränderungen bei GH-transgenen Tieren.

Author	Genkonstrukt	Alter (d)	Sex	BW (g)	Herz (mg)	Lunge (mg)	Leber (g)	Milz (mg)	Niere (mg)	Pankreas (mg)	Haut (g)	Abd. Fett (g)	ZNS (mg)
(Hammer <i>et al.</i> 1985)	mMT-rGH	119	m	53,8 (5,9)	310 (30)	270 (30)	4,90 (0,28)	310 (50)	440 (60)	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
			w	43,3 (2,7)	280 (20)	250 (20)	3,40 (0,07)	260 (50)	320 (30)	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
(Shea <i>et al.</i> 1987)	mMT-rGH	> 120		52,7 (9,1)	380 (100)	650 (120)	4,53 (1,35)	320 (130)	860 (300)	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
(Brem <i>et al.</i> 1989)	mMT-hGH	> 120	m	60,9 (13,4)	310 (90)	400 (100)	3,02 (1,20)	170 (100)	570 (200)	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
			w	59,2 (12,3)	300 (100)	380 (100)	3,15 (1,37)	200 (130)	550 (220)	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
(Quaife <i>et al.</i> 1989)	mMT-bGH	98	m	45,2 (2,4)	k.A.	k.A.	3,2 (0,14)	190 (30)	380 (40)	490 (50)	k.A.	k.A.	k.A.
			w	40,9 (3,2)			3,18 (0,6)	330 (90)	320 (40)	530 (50)	k.A.	k.A.	k.A.
(Hoeflich <i>et al.</i> 2001)	PEPCK-bGH	35	k.A.	k.A.	163 (33)	k.A.	2,47 (0,58)	249 (111)	227 (57)	323 (80)	6,16 (1,37)	0,635 (255)	438 (33)
		105	k.A.	k.A.	311 (42)	k.A.	4,73 (0,45)	244 (49)	448 (38)	579 (121)	15,43 (1,71)	2,00 (0,59)	491 (28)

k.A. keine Angabe

### 2.5.2 Endokrine und metabolische Veränderungen

Eine chronische GH-Überexpression ist mit einer geschlechts- und altersunabhängigen Erhöhung der GHR- und PRL-Rezeptorexpression in der Leber assoziiert (Aguilar *et al.* 1992; Orian *et al.* 1991). Zudem ist im Serum durch das vermehrte GH und GHBP ein Anstieg der GH-GHPB Komplexe zu verzeichnen (Sotelo *et al.* 1995).

Der Hauptvermittler des GHs ist das IGF-I. In verschiedenen GH-transgenen Modellen wurde ein Anstieg des Serum-IGF-I-Spiegels auf das zwei- bis dreifache gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe beobachtet (Chow *et al.* 1994; Hoeflich *et al.* 2001; Hoeflich *et al.* 2002; Palmiter *et al.* 1983).

Die GH-Ausschüttung steht unter anderem unter der eigenen Feedback Kontrolle. Eine ektopische GH-Produktion, die eine Erhöhung des peripheren GH-Spiegels nach sich zieht, führt zu einer Suppression der endogenen GH-Ausschüttung mit einer gleichzeitigen Reduktion der GHRH-Bindungsstellen in der Hypophyse (Sotelo *et al.* 1993). MT-hGH-transgene Mäuse besitzen ein geringeres Hypophysengewicht. Immunhistologische Analysen ergaben eine Veränderung der Anteile der somatotropen, lactotropen, corticotropen und gonadotropen Zellen. Die GH immunoreaktiven Zellen waren verkleinert und in ihrer Anzahl verringert. Elektronenmikroskopische Analysen ergaben, dass die Organellen, die für die Hormonsynthese zuständig sind, unauffällig waren. Den Erhebungen an MT-hGH-transgenen Tieren stehen die Befunde bei bGH-transgenen Tieren gegenüber. Hier fand sich eine Reduktion der somatotropen Zellen in Größe und Anzahl, die lactotropen Zellen hingegen waren unauffällig. Stefanescu *et al.* führten die Unterschiede der beiden GH-transgenen Mauslinien auf die lactotrope und somatotrope Wirkung des hGH zurück, während dem bGH nur eine reine somatotrope Wirkung zugeschrieben wurde (Stefanescu *et al.* 1993).

Chronische ektopische Expression des Wachstumshormons führte zu einer Insulinresistenz (Balbis *et al.* 1996; Valera *et al.* 1993) mit einer reduzierten Insulinrezeptorexpression in der Leber. Die Reduktion der Insulinrezeptorexpression war mit einer gesteigerten Rezeptor Tyrosinkinaseaktivität und Autophosphorylierung assoziiert, was auf einen post Rezeptordefekt in der Insulinsignalkaskade schließen ließ (Balbis *et al.* 1996; Dominici *et al.* 1998).

### 2.5.3 Kardio-vaskuläre Veränderungen

Makroskopisch zeigte sich bei bGH-transgenen Mäusen eine Vergrößerung des Herzens (Bollano *et al.* 2000; Colligan *et al.* 2002). Im Alter von acht Monaten wurde bei MT-bGH



Mäusen eine Hypertrophie des linken Ventrikels mit einer linksventrikulären systolischen Unterfunktion festgestellt (Bollano *et al.* 2000). Blutdruckuntersuchungen bei diesen Mäusen zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Kontrollgruppen. Bohlooly *et al.* beobachteten bei MT-bGH-transgenen Mäusen nach Fütterung einer salzreichen Diät keine Steigerung des Blutdruckes. Diese Hypertonie war mit einer Verengung des Gefäßsystems ohne Verlust der vaskulären Reaktivität oder der endothelialen Funktion verbunden (Bohlooly-Y *et al.* 2001a).

Histologische Untersuchungen des Herzens ergaben einen erhöhten Muskelfaserdurchmesser, einen verringerten Abstand zwischen den einzelnen Muskelfasern und vereinzelt auftretende Myelinstrukturen zwischen den Muskelfasern (Fu *et al.* 2000). Bollano *et al.* diagnostizierten zusätzlich noch veränderte Mitochondrien. Die Mitochondrien waren geschwollen und es kam zur Auflösung der Anordnung der Cristae. Zudem konnte die Membran der Mitochondrien nicht angefärbt werden (Bollano *et al.* 2000).

#### **2.5.4 Veränderungen der Leber**

##### Pathologisch-anatomische Veränderungen:

Die pathologisch-anatomischen Veränderungen der Leber bei GH-transgenen Mäusen zeigten ein charakteristisches Muster, welches 1987 erstmals von Brem und Wanke beschrieben wurde (Brem G. & Wanke R. 1987). Makroskopisch trat eine Hepatomegalie auf, die ab der vierten Lebenswoche diagnostiziert wurde (Quaife *et al.* 1989; Snibson 2002).

Mikroskopisch zeigte sich eine Hypertrophie und Hyperplasie der Hepatozyten. Die Hypertrophie der Hepatozyten wurde ab der vierten Lebenswoche post partum beschrieben (Quaife *et al.* 1989), korrelierend mit einer Zunahme der GHR Expression in der Leber (Maes *et al.* 1983).

In den polymorphen Kernen der Hepatozyten waren regelmäßig nukleäre Pseudoinklusionen zu finden, die elektronenmikroskopisch als Einstülpungen der Kernmembran mit zytoplasmatischem Inhalt identifiziert werden konnten (Brem *et al.* 1989; Quaife *et al.* 1989). Sehr vereinzelt sind intranukleäre Einschlüsse in den Kernen der Hepatozyten bei älteren Wildtypmäusen zu finden (Brem *et al.* 1989).

Regelmäßig wurden ab der achten Lebenswoche Leberzellnekrosen mit resorptiv entzündlichen Reaktionen bei hGH-transgenen Tieren beobachtet (Brem *et al.* 1989; Wanke *et al.* 1991b).

Neben den nicht-neoplastischen Veränderungen der Leber wurde bei oGH- und bGH-transgenen Mäusen mit steigendem Alter ein vermehrtes Auftreten von Tumoren in der

Leber beobachtet. Bei diesen Tumoren handelte es sich sowohl um Adenome als auch um Leberzellkarzinome (Orian *et al.* 1990; Wanke *et al.* 1991a). Bei mMT-oGH-transgenen Mäusen wird das Auftreten der hepatozellulären Tumore ab der 43. Woche mit einer Inzidenz von 70 % beschrieben (Orian *et al.* 1990). Immunhistochemisch konnte in apoptotischen, TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)-positiven Zellen und hypertrophierten Hepatozyten kein Wachstumshormon nachgewiesen werden, während in kleinen Hepatozyten, die sich in der Proliferationsphase befanden (BrdU positiv), GH im Zytoplasma detektiert wurde. Die GH-Expression im Tumorgewebe zeigte dagegen auf Proteinebene kein einheitliches Muster, auf RNA-Ebene war jedoch das gleiche Expressionsprofil wie im normalen Lebergewebe zu detektieren (Snibson 2002).

#### Veränderungen des Leberstoffwechsels:

Cytochrom P450 Enzyme waren durch die chronische Expression von GH beeinflusst. GH supprimiert das karzinogen-metabolisierende Enzym Benzo [a] pyrene-Hydroxylase und das Pharmaka metabolisierende Enzym Benzphetamine N-Demethylase. Diese Supprimierung war mit einer Induktion der microsomalen Hämoxigenase (HO) assoziiert (Cherithundam *et al.* 1998).

#### Genexpressionsanalyse der Leber:

Genexpressionsanalysen der Leber zeigten, dass es zu einem Anstieg der mRNA-Spiegel für IGF-I, GHR und dem Serin Protease Inhibitor 2.1 (SPI 2.1) kam. Hingegen war die Expression von Peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) mRNA und von Genen, die im Zusammenhang mit dem Fettsäuremetabolismus (fatty acid activation) der peroxisomalen und mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation stehen, supprimiert. Bei fastenden Mäusen wurde zudem eine Reduktion der Ketonkörperproduktion im Vergleich zu ihren nicht-transgenen Geschwistertieren nachgewiesen (Olsson *et al.* 2003).

Eine Supprimierung des Insulinvermittlers Sterol regulatory element binding protein (SREBP-1) und der meisten lipogenen Enzyme, die von SREBP-1 reguliert werden, wurde ebenfalls beobachtet (Foretz *et al.* 1999).

Des Weiteren wurden bei GH-transgenen Mäusen Veränderungen der Expression einiger Kandidatengene beschrieben, die im Zusammenhang mit kardio-vaskulären Erkrankungen stehen könnten. Hier wurden unter anderem eine verminderte Expression des Scavenger Receptor class B Typ I, der hepatischen Lipase und der Serum Paraxonase sowie eine gesteigerte Expression des Serum Amyloid A-3 Proteins genannt (Olsson *et al.* 2003).

### 2.5.5 Veränderungen der Niere

Die systemische GH-Überproduktion führt bei GH-transgenen Mäusen zu einem typischen Spektrum an Nierenveränderungen.

Erstmals berichteten Brem und Wanke im Jahre 1988 bei MT-hGH-transgenen Mäusen (Brem G. & Wanke R. 1988) und Doi et al. bei MT-bGH-transgenen Mäusen (Doi *et al.* 1988) über Nierenalterationen. Bei hGH-transgenen Mäusen wurden massive Nierenveränderungen bereits in einem Alter von unter zwei Monaten beschrieben.

Makroskopisch stellten sich die Nieren vergrößert, gelblich verfärbt und mit einer grobhöckrigen Oberfläche dar. Im Anschnitt und an der Oberfläche der Nieren zeigten sich oftmals kleinere Zysten (Wanke *et al.* 1991b).

Histologische Analysen dieser Nieren ergaben eine Atrophie der Nephrone und eine zystische Dilatation der Tubuli. In den erweiterten Tubuli waren hyaline Zylinder als Ausdruck einer Proteinurie zu finden. Die Glomerula waren oftmals aufgrund einer Sklerose und/oder einer Hyalinose global verödet (Wanke *et al.* 1991b).

Doi et al. verglichen die renalen Alterationen von bGH-, IGF-I- und GHRH-transgenen Tieren: Die bGH-transgenen Tiere entwickelten im Alter von vier Wochen in den Glomerula mesangiale Proliferationen. Im Alter von sechs Wochen kam es zu Synechien zwischen dem Kapillarschlingenkonvolut und der Bowmanschen Kapsel. Mit 37 Wochen war eine diffuse mesangiale Sklerose zu erkennen, die bis hin zur globalen Verödung der Glomerula führte. Bei den GHRH-transgenen Mäusen waren die renalen Alterationen von ähnlicher Ausprägung wie bei den bGH-transgenen Mäusen. Dem entgegen ließ sich bei den IGF-I-transgenen Tieren lediglich eine Vergrößerung der Glomerula diagnostizieren. Bei Zusammenschau der Befunde dieser drei Tiermodelle kamen Doi et al. zu dem Schluss, dass die Glomerulavergrößerungen auf den erhöhten IGF-I Spiegel zurückzuführen und alle weiteren Veränderungen als direkte Folge der GH-Überproduktion anzusehen sind (Doi *et al.* 1988).

Immunhistologische Untersuchungen an Nieren von MT-bGH-transgenen Mäusen ergaben, dass Kollagen Typ I und Typ IV, Laminin und Basement membrane heparan sulfate proteoglycan (HSPG) in Korrelation mit dem Alter und somit auch mit dem Schweregrad der glomerulosklerotischen Veränderungen zunahmen. Ähnliche Befunde ließen sich auch bei der Analyse der mRNAs für Kollagen Typ IV, Laminin B2 und HSPG erheben. Die Anreicherung der extrazellulären Matrixkomponenten im Glomerulum scheint daher eine Folge einer erhöhten transkriptionellen Aktivität zu sein (Doi *et al.* 1991).

Die renalen Alterationen bei GH-transgenen Mäusen wurden 1996 zeitlich-pathologisch in 3 Stadien unterteilt: einer frühen renalen Alteration, einer Progressionsphase und einem

Finalstadium (Wanke 1996). Die frühen renalen Veränderungen beschreibt der Autor durch eine diffuse glomeruläre Hypertrophie mit fokal-segmentaler Glomerulosklerose. Immunhistochemisch war eine Vermehrung von Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin und IgM im Mesangium sowie eine fokale glomeruläre Ausscheidung von Albumin nachzuweisen. Der Nachweis von Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) lässt auf eine Proliferation von Mesangiozyten und glomerulären Endothelzellen sowie eine erhöhte Teilungsrate tubulärer Epithelzellen schließen. Elektronenmikroskopische Analysen zeigten eine mesangiale Matrixvermehrung und eine hochgradige Hypertrophie der Podozyten. Quantitativ-stereologische Untersuchungen ergaben eine Vergrößerung des mittleren Glomerulumvolumens, des mittleren Kapillarovolumens pro Glomerulum sowie eine Vermehrung der Mesangiozyten und der Endothelzellen bei einer unveränderten Anzahl der Podozyten pro Glomerulum. In der Progressionsphase waren ein Übergang von der fokal-segmentalen in eine diffus-segmentale und fokal-globale Glomerulosklerose sowie Anzeichen einer zunehmenden Proteinurie und immer deutlicher ausgeprägten tubulären und interstitiellen Alterationen zu diagnostizieren. Immunhistochemisch konnte eine weitere Vermehrung von Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin nachgewiesen werden. Elektronenmikroskopisch zeigten sich eine hochgradige Alteration der Podozyten sowie eine Matrixvermehrung und Proteinakkumulation im Mesangium. Weiterhin ergaben stereologische Analysen eine Zunahme des mittleren Glomerulumvolumens. Eine allometrische Analyse ergab eine überproportionale Vergrößerung der Glomerula. Das Terminalstadium war durch eine diffuse und überwiegend globale Glomerulumverödung, eine diffuse Atrophie von Nephronen sowie multifokale bis diffuse interstitielle tubulozystische Veränderungen nach Art einer polyzystischen Nephropathie geprägt (Wanke 1996).

In den letzten Jahren wurde der Rolle von Podozytenschädigungen in der Pathogenese der Glomerulosklerose immer mehr Aufmerksamkeit geschenkt. Die GH-transgene Maus stellt ein ideales Tiermodell zur Charakterisierung dieser Läsionen dar. Wanke et al. zeigten den Zusammenhang der Podozytenschädigungen zu den renalen Alterationen der GH-transgenen Mäuse (Wanke *et al.* 2001).

Stereologische Analysen an 7 Wochen alten MT-bGH-transgenen Tieren ergaben eine Verdoppelung des mittleren Glomerulumvolumens und eine signifikante Vermehrung der glomerulären Endothel- und der Mesangiumzellen, jedoch keine Unterschiede in der Anzahl der Podozyten pro Glomerulum. Die Podozyten zeigten eine Hypertrophie, Pedikelretraktionen, zytoplasmatische Vakuolen und Poteintropfen sowie Pseudozysten. Bei der Untersuchung älterer Tiere ließ sich eine Zunahme des mittleren Glomerulumvolumens

diagnostizieren. Die Podozyten waren hochgradig vergrößert und überdehnt. Durch die Überdehnung der Podozyten kam es zu herdförmigen Fußfortsatzablösungen von der glomerulären Basalmembran (GBM) sowie zu Podozytenuntergängen mit flächiger Denudation der GBM. Adhäsionen entwickelten sich durch Übertritt von parietalen Epithelzellen auf denudierte Bereiche der GBM und bildeten einen Ausgangspunkt für Synechien zwischen dem Kapillarschlingenkonvolut und der Bowmanschen Kapsel. Im Zusammenhang mit den Synechien konnten subepitheliale Proteinablagerungen in der Bowmanschen Kapsel diagnostiziert werden. Durch diese Läsionen bedingt kam es zur Lückenbildung in der Kapselmembran. Eine direkte Verbindung zwischen den Kapillarsegmenten und dem periglomerulären und peritubulären Raum war geschaffen. Im Zuge der globalen Verödung des Glomerulums kam es zu einer Atrophie des anschließenden Tubulussegments (Wanke *et al.* 2001).

### **2.5.6 Fertilität**

Fruchtbarkeitsprobleme bei GH-transgenen Mäusen wurden erstmals von Hammer *et al.* 1984 beschrieben. Diese Autoren beobachteten, dass bei mMT-rGH-transgenen Hybrid- und lit/lit Mäusen von zehn weiblichen Tieren nur ein Tier fertil war. Dagegen zeigten die männlichen Tiere nur wenig Beeinträchtigung, bei den lit/lit Mäusen war die Fertilität sogar verbessert (Hammer *et al.* 1984).

Die fast normalen Reproduktionscharakteristika bei mMT-bGH Mäusen führten Narr *et al.* auf den, im Vergleich zu anderen GH-transgenen Tieren, niedrigen GH-Plasmaspiegel zurück. Die Mäuse zeigten lediglich ein verlängertes Intervall bis zur nächsten Trächtigkeit und kein Zustandekommen der Trächtigkeit im post partum Östrus (Naar *et al.* 1991).

Bei PEPCCK-bGH-transgenen Mäusen wurden in einer Studie von Cecim *et al.* eine erhöhte Ovulationsrate (Cecim *et al.* 1995b) und ein erniedrigter Plasmasprogesteronspiegel (Cecim *et al.* 1995c) registriert. Progesterongaben konnten die Trächtigkeitsraten erhöhen. Des weiteren zeigten Cecim *et al.*, dass die transplantierten Ovarien der transgenen Tiere in Wildtypmäusen einen voll funktionsfähigen Zyklus mit einer ungestörten Gelbkörperfunktion entwickelten (Cecim *et al.* 1995c). Bei den transgenen Tieren kommt es durch Fehlen des Gelbkörpers zu einem Abbruch der Trächtigkeit (Cecim *et al.* 1995a).

## 2.5.7 Weitere Veränderungen

### 2.5.7.1 Haut

Das Hautgewicht von GH-transgenen Tieren war absolut bei männlichen und weiblichen Tieren als auch auf das Körpergewicht (relatives Hautgewicht), nur bei den männlichen Tieren erhöht (Hoefflich *et al.* 2001; Wanke *et al.* 1999). Dieser auf das männliche Geschlecht beschränkte Phänotyp ist von der Androgenproduktion abhängig (Wanke *et al.* 1999).

### 2.5.7.2 Wundheilung

Bei PEPCK-bGH-transgenen Mäusen konnte eine verzögerte Wundheilung beobachtet werden. Es kam bei diesen Tieren durch die vermehrte Ausbildung von stark vaskularisiertem Granulationsgewebe zu einem verspäteten Wundschluss. Derartige Veränderungen traten vornehmlich bei männlichen Tieren auf (Thorey *et al.* 2004).

### 2.5.7.3 Verhalten

MT-bGH-transgene Tiere zeigen im Vergleich zu ihren nicht-transgenen Geschwistertieren in einer neuen Umgebung eine gesteigerte lokomotorische Aktivität. Zudem lassen sie sich sowohl durch *d*-Amphetamin als auch durch Ethanol in geringer Dosis leichter stimulieren. (Soderpalm *et al.* 1999). Zur Differenzierung der zentralen GH-Effekte von den peripheren Effekten etablierten Bohlooly-Y *et al.* ein Mausmodell, bei welchem das GH unter der Kontrolle des Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) Promotors steht. Diese Mäuse exprimieren das GH ausschließlich im ZNS. Die Serumspiegel lagen mit 200 und 340 ng/ml deutlich unter dem Niveau der MT-bGH-transgenen Mäuse, und es zeigte sich keine Erhöhung des IGF-I-Serumspiegels und des freien T3 Spiegels. Interessanterweise wurde bei diesen Mäusen keine gesteigerte Lokomotivität beobachtet. Diese Daten ließen Bohlooly *et al.* zu dem Schluss kommen, dass durch eine Erhöhung des freien T3 und des IGF-I das Dopamin-Serotonin System beeinflusst und so die Hyperaktivität der MT-bGH-transgenen Tiere induziert wurde (Bohlooly-Y *et al.* 2001b).

### 3 Tiere, Material und Methoden

#### 3.1 Mäuse

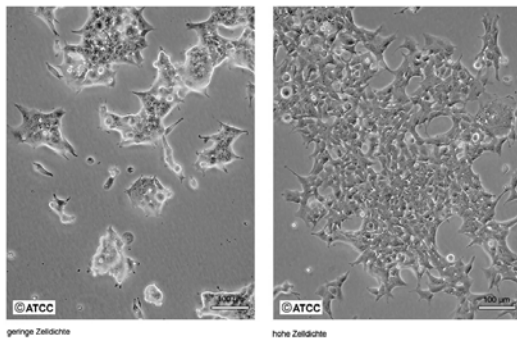
Die Mäuse wurden unter spezifisch pathogen-freien (SPF) Bedingungen bei 22°C, 65 % Luftfeuchtigkeit und einem 12 h Lichtprogramm (Hell-Dunkelrhythmus) im Tierstall des Genzentrums der Ludwig-Maximilians-Universität gehalten. Den Tieren stand Erhaltungsfutter (V1534-Standardfutter, Ssniff, Soest) und Wasser ad libitum zur Verfügung. Sowohl Häuschen aus Holz als auch Kletterspielzeug dienten als „cage enrichment“. Alle beantragten Experimente wurden nach den Vorschriften des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Genehmigungsnummer des Tierversuchantrags: 209.1/211-2531-122/02).

Im Alter von 4 Wochen wurden die Tiere abgesetzt und eine Schwanzprobe von 3-5 mm Länge unter Ethernarkose zur Genotypisierung genommen. Beim Absetzen wurden die Tiere mittels Ohrlochung markiert und nach Geschlecht getrennt in Käfigen aufgestellt.

Als Background der Zucht diente der albino Inzuchtstamm FVB/N von Janvier, Frankreich.

#### 3.2 Verwendete Zelllinien

##### 3.2.1 HEK 293 Zelllinie:

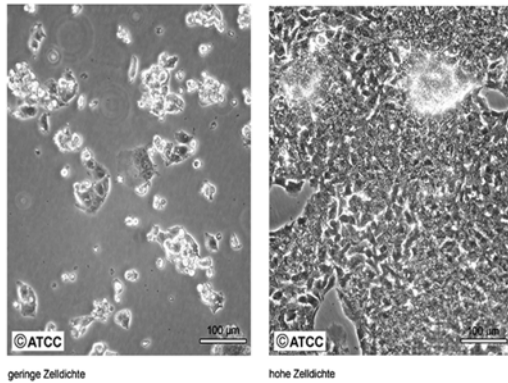


**Abbildung 3: HEK 293 Zelllinie.**

(li) 293 Zellen von geringer Zelldichte (re) 293 Zellen von hoher Zelldichte

Die Zelllinie HEK 293 ist eine humane embryonale Nierenzelllinie (Abbildung 3), die durch Transformation mit Adenovirus Typ 5 hergestellt wurde (Graham *et al.* 1977).

### 3.2.2 HepG2 Zelllinie



**Abbildung 4: HepG2 Zelllinie.**

(li) HepG2 Zellen von geringer Zelldichte; (re) HepG2 Zellen von hoher Zelldichte

HepG2 ist eine humane Leberzellkarzinom Zelllinie (Abbildung 4) (Knowles *et al.* 1980).

## 3.3 Materialien

### 3.3.1 Antikörper

**Tabelle 6: Verwendete Antikörper.**

Verwendeter Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-Digoxigenin-AP-Fab-Fragment	1:1000	Roche, Mannheim
Chicken-anti-bGH	1:300	Prof. M. Erhard, München
Rabbit-anti-chicken IgY (IgG) (whole molecule)-Peroxidase Antikörper	1:5000	Sigma, Deisenhofen

### 3.3.2 Chemikalien

Alle Chemikalien sind, soweit nicht anders angegeben, in p.a.-Qualität verwendet worden.

30 % Acrylamid/Bis Solution (29:1)

BioRad, München

Agar, granuliert

Difco, Detroit, USA

Agarose

Invitrogen, Karlsruhe

Albumin, bovines

Sigma, Deisenhofen

Ammoniumacetat

Merck, Darmstadt



Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
Bacto™ Trypton	BD, Heidelberg
Bacto™ Yeast Extract	Diefco, Detroit, USA
Bicinchoninsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Cover slides	Roth, Karlsruhe
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Deisenhofen
DIG Wash and Block Buffer set	Roche, Mannheim
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Deisenhofen
Dodecylsulfat Natrium	Serva, Heidelberg
DTT (1,4-Dithio-DL-threitol)	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Merck, Darmstadt
Entellan plus	Merck, Darmstadt
Essigsäureanhydrid	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ether (Narkose)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (Lösung 1 %)	Merck, Darmstadt
Fixogum	Marabu, Tamm
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	AppliChem, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kupfer (II) Sulfat	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Merck, Darmstadt

MOPS (3-Morpholino-Propansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Pepsin	Dako Cytochromatin, Hamburg
Salzsäure (37 %)	Merck, Darmstadt
Spermidine	Sigma, Deisenhofen
Super Frost Puls Slides	Roth, Karlsruhe
Temed	Merck, Darmstadt
Triethanolamin	Sigma, Deisenhofen
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween-20-Lösung	Sigma, Deisenhofen
X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside)	Invitrogen, Karlsruhe
Xylol	Merck, Darmstadt

### 3.3.3 Enzyme und sonstige Reagenzien

Biodyne <sup>®</sup> B (0,45 $\mu$ ; 20 cm x 3 m)	Pall Corporation, USA
BM Purple	Roche, Mannheim
DIG RNA Labeling Mix	Roche, Mannheim
DNase I (10 U/ $\mu$ l)	Invitrogen, Karlsruhe
Erststrang-Puffer 5 x für cDNA Synthese	Invitrogen, Karlsruhe
Herculase Polymerase	Stratagene, USA
Human COT-1 DNA (1 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
M-MLV-RT (200 U/ $\mu$ l)	Invitrogen, Karlsruhe
m-RNA <i>In Situ</i> Hybridisation solution	Dako Cytochromatin, Hamburg
Peroxidase Blocking reagent	Dako Cytochromatin, Hamburg
Proteinase K (20 mg/ml)	Roche, Mannheim
Rabbit Immunoglobulin fraction	Dako Cytochromatin, Hamburg
Random Primer Hexamers (600 $\mu$ g/ml)	Roche, Mannheim
Rapid-Hyb buffer	Amersham Bioscience, Freiburg

Restriktionsenzyme und entsprechende Puffer	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Ribonuclease A (RNase A)	Roche, Mannheim
RNA Polymerase SP6	Roche, Mannheim
RNA Polymerase T7	Roche, Mannheim
RNase A	Roche, Mannheim
RNaseOUT™ (40 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase (2000 U/μl) und entsprechender Puffer	MBI Fermentas, St. Leon Roth
TRIzol® Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
t-RNA	Roche, Mannheim

#### Molekulargewichtsstandards für DNA:

Gene Ruler™ (1 kb-DNA-Ladder: SM 0311)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Lambda DNA/EcoRI + HindIII-Marker (SM 01910)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
pUC-Mix-Marker 8 (SM 0431)	MBI Fermentas, St. Leon Roth

#### Molekulargewichtsmarker für Protein:

Protein Molecular Weight Marker (SM 0431)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
---	------------------------------

### **3.3.4 Kits**

Gen Point	Dako Cytochromatin, Hamburg
High Pure PCR Purification Kit	Roche, Mannheim
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Spin Miniprep Kit (250)	Qiagen, Hilden
Rediprime II Random Prime Labeling System®	Amersham Pharmacia, Freiburg
Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen, Hilden
Wizard genomic DNA purification kit®	Promega, Wisconsin, USA
Vektor pGEM®-Teasy	Promega, Wisconsin, USA

### **3.3.5 Verbrauchs- und sonstiges Arbeitsmaterial**

3-Wege-Hahn	Clinico, Bad Hersfeld
96-fach PCR-Reaktionsgefäße	ABgene, Hamburg
Einbettkassetten	Engelbrecht, Ederrmünde
Heidelberger Verlängerung	Dispomed Witt oHG, Gainhausen-Hailer

Infusionsschläuche	BD Infusion Therapy GmbH, Heidelberg
Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Omnifix 2 ml Luer Lock	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
PCR Gefäß 0,2 ml	G. Kisher GbR, Steinfurt
PCR Gefäßdeckel	G. Kisher GbR, Steinfurt
PVDF-Membran (Immobilon-P Transfermembran)	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäße "safe lock" (2, 1,5, 0,5, 0,2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Spritze 20 ml	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Zellkultur Testplatte 96 well	TPP, Schweiz
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Brutschrank	Heraeus, München
Eagleeye II	Stratagene, Heidelberg
Gelkammern für Agarosegele	MWG-Biotech, Ebersberg
Gewebe-Homogenisator (Art-Mirco D8)	ART Labortechnik, Mühlheim
Heizplatte mit Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Mikroskop & Farbkamera	Zeiss, Jena
Milliblot-Graphite Elektrobloetter	Millipore, Bedford, MA, USA
Mini Protein II System	Bio Rad, München
Powersupply POWER PAC 300	Bio Rad, München
Schüttelinkubator KF-4	Infors, Bottmingen
Storage Phosphor Screen	Amersham Pharmacia, Freiburg
Storm 860	Amersham Pharmacia, Freiburg
<u>Zentrifugen:</u>	
GS-15R	Beckman, München
GS-6K	Beckman, München
Sigma 3K-2	Sigma, Osterode am Harz
Tischzentrifugen mit Kühlung (5417R)	Eppendorf, Hamburg

### **3.4 Zusammensetzung der Puffer**

Anmerkung: Als Lösungsmittel diente, soweit nicht anders angegeben, vollentsalztes Wasser (hergestellt durch eine Milliporeanlage), hier bezeichnet als Aqua bidest..

#### **3.4.1 Puffer für molekularbiologische Methoden**

##### **3.4.1.1 DEPC-H<sub>2</sub>O (0,1 % (v/v))**

1 ml DEPC in 1000 ml Aqua bidest. über Nacht bei RT unter Rühren lösen.

Zur Inaktivierung des DEPC mindestens 3 x autoklavieren.

Lagerung: RT

##### **3.4.1.2 Proteinase K Lösung**

20 mg/ml Proteinase K in Aqua bidest. lösen

Aliquotieren

Lagerung: -20°C

##### **3.4.1.3 TE Puffer**

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)

1 mM EDTA (pH 8,0)

##### **3.4.1.4 20 x SSC Puffer**

3 M NaCl

0,3 M Natriumacetat-Trihydrat

pH 7,0

#### **3.4.2 Puffer für Agarosegele**

##### **3.4.2.1 50 x TAE Puffer**

242 g Tris Base

57,1 ml Eisessig

100 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0)

##### **3.4.2.2 6 x Probenpuffer für DNA**

3 ml Glycerin

7 ml	Aqua bidest.
1 Spatelspitze	Bromphenolblau

Aliquotieren

Lagerung: -20°C

### 3.4.3 Lösungen für Bakterienkultur

#### 3.4.3.1 Luria-Bertani-(LB)-Medium

10 g	Bacto™ Trypton
5 g	Bacto™ Yeast Extract
10 g	NaCl

ad 1000 ml Aqua bidest.

pH 7,0 (mit 5 M NaOH einstellen)

Autoklavieren

Lagerung: RT

#### 3.4.3.2 SOC Medium

2 %	Bacto™ Trypton
0,5 %	Bacto™ Yeast Extract
0,05 %	NaCl
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	MgSO <sub>4</sub>
0,4 %	Glucose

MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> und Glucose wurden getrennt autoklaviert und erst danach zugesetzt.

#### 3.4.3.3 Tfb I Puffer

30 mM	KOAc
100 mM	CaCl <sub>2</sub>
15 %	Glyzerin
50 mM	MnCl <sub>2</sub>

MnCl<sub>2</sub> steril filtrieren und nach dem Autoklavieren zugegeben.

#### **3.4.3.4 Tfb II Puffer**

10 mM	MOPS
75 mM	CaCl <sub>2</sub>
10 mM	KCl
15 %	Glyzerin

#### **3.4.3.5 Agar LB Platten**

1000 ml	LB-Medium
15 g	Agar, granuliert

Bei 121°C für 20 min autoklavieren.

Nachdem die Lösung unter ständigem Rühren auf 50°C abkühlte, wurde Ampicillin (fc=100 µg/ml) zugegeben. Anschließend wurde die Lösung auf Petrischalen ausgegossen und nach dem Aushärten des Agars wurden die Platten über Kopf bei 4°C gelagert.

### **3.4.4 Lösungen für Southern Blot**

#### **3.4.4.1 Transferpuffer**

0,5 M	NaOH
1,5 M	NaCl

#### **3.4.4.2 Neutralisationslösung**

1 M	NaCl
0,5 M	Tris/HCl (pH 8,0)

#### **3.4.4.3 Waschlösung I**

2 x SSC  
0,1 % SDS

#### **3.4.4.4 Waschlösung II**

1 x SSC  
0,1 % SDS

### 3.4.5 Lösungen für Northern Blot

#### 3.4.5.1 10 x MOPS

20,93 g MOPS  
8,35 ml 3 M Natriumacetat  
10 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)  
ad 500 ml Aqua bidest.

#### 3.4.5.2 1,7 x RNA-Ladepuffer

211 µl 37 % Formaldehyd  
633 µl 100 % Formamid  
156 µl 10 x MOPS

#### 3.4.5.3 Solution I

75 mM NaOH  
100 mM NaCl

#### 3.4.5.4 Solution II

100 mM Tris (pH 7,5)

#### 3.4.5.5 Transferpuffer

25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6,5)  
25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6,5)

#### 3.4.5.6 Waschlösung I

2 x SSC  
0,1 % SDS

#### 3.4.5.7 Waschlösung II

1 x SSC  
0,1 % SDS



### 3.4.6 Puffer und Lösungen der Proteinanalyse

#### 3.4.6.1 5 x Laemmli-Puffer

65,5 ml	1 M Tris (pH 6,8)
100 ml	Glyzerin 100%
2 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)
20 g	SDS
0,01 %	Bromphenolblau

ad 200 ml Aqua bidest.

#### 3.4.6.2 Proteinextraktionspuffer

2 ml	1 M Tris (pH 7,5)
2 ml	Triton X-100
20 ml	5 x Laemmli-Puffer
76 ml	Aqua bidest.

#### 3.4.6.3 RIPA Puffer

2,5 ml	10 % SDS
15 ml	5 M NaCl
5 ml	NP40
25 ml	10 % Desoxycholate
1 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)

ad 500 ml Aqua bidest.

#### 3.4.6.4 10 x SDS-PAGE-Laufpuffer

15,5 g	Tris/HCl
72 g	Glycin
5 g	SDS 10 %

ad 500 ml Aqua bidest.

#### 3.4.6.5 10 x Transferpuffer

58,2 g	Tris/HCl
29,2 g	Glycin
3,7 g	SDS 10 %

ad 1000 ml Aqua bidest.

### 3.4.6.6 1 x Transferpuffer

Ansatz für 4 Minigele:

20 ml	10 x Transferpuffer
140 ml	Aqua bidest.
40 ml	100 % Methanol

### 3.4.6.7 Coomassiefärbelösung

40 ml	100% Methanol
2 ml	Essigsäure
0,2 g	Coomassie Brillantblau R-250

ad 100 ml Aqua bidest.

### 3.4.6.8 Coomassieentfärbelösung

50 %	Methanol
1 %	Essigsäure

In Aqua bidest.

### 3.4.6.9 Waschlösung (TBS-T)

5 ml	1 M Tris, pH 7,5
30 ml	5 M NaCl
0,5 ml	Tween 20

ad 1000 ml Aqua bidest.

### 3.4.6.10 Blockierungslösung

TBS-T

5 % (w/v)	Magermilchpulver
-----------	------------------

### 3.4.6.11 Primärantikörperlösung

Blockierungslösung

0,02 % (w/v)	Natriumazid
--------------	-------------

### 3.4.6.12 Sekundärantikörperlösung

Blockierungslösung, niemals Natriumazid zugeben!

### 3.4.7 Puffer und Lösungen der eukaryontischen Zellkultur

Alle Lösungen wurden autoklaviert und steril filtriert (0,22 µm).

#### 3.4.7.1 Fetales Kälberserum (FKS)

FKS wurde vor Gebrauch 30 min bei 56°C inaktiviert und steril filtriert.

Aliquotiert

Lagerung: -20°C

#### 3.4.7.2 Nährmedium für HEK293T und HepG2 Zellen

Dulbecco Modified Eagle Medium (Low Glucose)

mit	5 %	FKS
	1 %	Natriumpyruvat (100 mM)
	1 %	nicht essentielle Aminosäuren
	1 %	L-Glutamin (200 mM)
	1 %	Penicillin/Streptomycin (100 x)
	1 µl/100 ml	β-Mercaptoethanol

#### 3.4.7.3 PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7,4)

136 mM	NaCl
8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2,7 mM	KCl
1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

#### 3.4.7.4 2 x Trypsin/EDTA

1 Volumentanteil 10 x Trypsin/EDTA

4 Volumentanteile PBS

Aliquotieren

Lagerung: -20°C

### 3.4.8 Puffer und Lösungen der in situ Hybridisierung ohne Tyramide signal amplification (TSA)

#### 3.4.8.1 Proteinase K Puffer

50 mM	Tris-HCl (pH 7,6)
5 mM	EDTA (pH 8,0)

### 3.4.8.2 NTE Puffer

500 mM	NaCl
10 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
5 mM	EDTA (pH 8,0)

### 3.4.8.3 Puffer I

100 mM	Maleinsäure (pH 7,5)
150 mM	NaCl

### 3.4.8.4 Puffer II

15 ml 10 x Roche Blocking reagent (aus DIG Wash and Block Buffer set, Roche) in 150 ml Buffer I

### 3.4.8.5 Puffer III

100 mM	Tris-HCl (pH 9,5)
100 mM	NaCl
50 mM	MgCl <sub>2</sub>

## 3.4.9 Puffer und Lösungen der in situ Hybridisierung mit Tyramide signal amplification (TSA)

### 3.4.9.1 NTE Puffer

500 mM	NaCl
10 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
5 mM	EDTA (pH 8,0)

### 3.4.9.2 Blockierlösung

bei 55°C lösen:

100 mM	Tris pH 7,5,
150 mM	NaCl
1 % Blocking reagent (Roche)	

Kurz vor Gebrauch:

Rabbit IgG abzentrifugieren

1/20 Rabbit IgG dazugeben

5-10 min auf 37°C erwärmen (Präzipitate!)

5 min abzentrifugieren und bei RT halten

### 3.5 Primer

bGH #1 (sense):	5'	GGG ACA GAG ATA CTC CAT CC	3'
bGH #2 (antisense):	5'	ATG CGA AGC AGC TCC AAG TC	3'
bGH fwd (sense)	5'	CAC CAG CTA TGA TGG CTG CAG	3'
bGH rev (antisense)	5'	GAT GGC TGG CAA CTA GAA GGC	3'
GAPDH (sense)	5'	GTG GCA AAG TGG AGA TTG TTG CC	3'
GAPDH (antisense)	5'	GAT GAT GAC CCG TTT GGC TCC	3'
pTORU seq	5'	CTA CAG CTC CTG GGC AAC GTG	3'
SP6	5'	CAA GCT ATT TAG GTG ACA CTA TAG	3'
T7	5'	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG	3'

### 3.6 Plasmide

pBR322

pSP73

pCDNA3

pCAGGS

### 3.7 Radioaktive Isotope

$\alpha$ -[32P]-dCTP

Amersham Pharmacia, Freiburg

### 3.8 Arbeiten mit DNA

#### 3.8.1 Isolation genomischer DNA aus Mäuseschwänzen

##### 3.8.1.1 Genomische DNA für die Genotypisierung transgener Tiere

Die Gewebeproben der Mäuseschwänze wurden unmittelbar nach der Entnahme auf Trockeneis gelagert. Die Lagerung bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte bei -80°C. Zur Isolierung der genomischen DNA wurden die Schwanzproben in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit dem Wizard genomic DNA purification kit<sup>®</sup> (Promega) nach folgendem Standardprotokoll behandelt. Die Schwanzproben wurden in jeweils 620 µl Mastermix über Nacht bei 55°C inkubiert.

**Mastermix:** 500 µl Nuclei Lysis solution  
120 µl EDTA (0,5 M)  
17,5 µl Proteinase K (20 mg/ml)

Am folgenden Tag wurden jeder Probe 3 µl RNase (4 mg/ml) zugesetzt und bei 37°C 30 min verdaut. Nach 5 min Abkühlung auf Raumtemperatur (RT) wurde jeweils 200 µl Protein Precipitation solution zugegeben, die Proben 20 s gevortext und 5 min auf Eis abgekühlt. Danach wurden die Proben bei 15.000 x g, 20°C für 4 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die DNA-Fällung mit 600 µl Isopropanol und einem einmaligen Waschen des Pellets mit 70 % Ethanol. Nach Trocknung des Pellets an der Luft, wurde es in 50 µl Rehydratationspuffer resuspendiert. Um sicherzustellen, dass die DNA vollständig gelöst war, wurde die DNA mindestens für 12 h bei 4°C gelöst.

### 3.8.1.2 Genomische DNA für Southern Blot Transfer

Gewebeproben der Mäuseschwänze wurden über Nacht bei 58°C mit 500 µl Lysis Puffer und 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) inkubiert.

<b>Lysispuffer:</b> 50 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
100 mM	NaCl
100 mM	EDTA (pH 8,0)
1 %	SDS

Zur weiteren Aufreinigung der DNA wurde eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung durchgeführt. Dem Verdau wurden 600 µl Phenol/Chloroform (1:1) zugegeben, das Reaktionsgefäß 5 min in einem „end-overend“ shaker (Heidolph, Schwabach) gemischt und danach bei 15.000 x g, 20°C, 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmals mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) im „end-overend“ shaker 5 min gemischt und danach bei 15.000 x g, 20°C, 5 min abzentrifugiert. Anschließend erfolgte die DNA-Fällung mit dem Überstand aus der Chloroform/Isoamylalkoholreinigung mit der 2,5-fachen Menge des Überstandsvolumens mit Ethanol und einem einmaligen Waschen mit 1 ml 70 % Ethanol. Das Pellet wurde

anschließend in 100 µl TE Puffer resuspendiert und zur vollständigen Lösung mindestens 12 h bei 4°C gelagert.

### 3.8.2 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentrationsbestimmung der doppelsträngigen DNA erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm an einem Spektralphotometer. Eine Absorption von eins entspricht dabei einer Konzentration von 50 ng/µl.

### 3.8.3 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zum Animpfen wurden Einzelkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 3 ml ampicillinhaltiges LB-Medium überführt. Nach 8-10 h bei 37°C unter konstantem Schütteln bei 170 rpm hat die Kultur die späte logarithmische Phase erreicht.

Aus 1 ml der Kultur wurden glycerinhaltige Bakterienstocks angefertigt, die restlichen 2 ml der Kultur wurden 10 min bei 20.800 g und 4°C sedimentiert. Die Isolation der DNA erfolgte mit dem QIAquick<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit entsprechend den Herstellerangaben.

Benötigte man größere Mengen an Plasmid-DNA, wurde eine MIDIprep durchgeführt. Hierzu wurde aus der 3 ml Vorkultur im Verhältnis 1:500 bis 1:1000 in selektives LB-Medium in einem Erlenmayerkolben (ca. die vierfache Größe des Kulturvolumens) verdünnt und 8-10 Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator bei 170 rpm inkubiert.

Die Plasmid DNA wurde mit den QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid MIDI Kit entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

### 3.8.4 Genotypisierung der transgenen Tiere

#### 3.8.4.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zum Nachweis der Transgenintegration wurden folgende konstruktsspezifische Primer verwendet:

bGH #1 (sense):                    5' GGG ACA GAG ATA CTC CAT CC 3'

bGH #2 (antisense):                5' ATG CGA AGC AGC TCC AAG TC 3'

Um die Integrität der isolierten genomischen DNA zu bestätigen, wurde mit spezifischen Primern das GAPDH-Gen nachgewiesen:

GAPDH #1 (sense):                5' GTG GCA AAG TGG AGA TTG TTG CC 3'

GAPDH #2 (antisense): 5' GAT GAT GAC CC TTT GGC TCC 3'

Die PCR-Reaktionen wurden auf Eis in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen als 20 µl Ansatz unter Verwendung der Hot Star Taq Polymerase (5 U/µl; Qiagen) nach folgendem Protokoll angesetzt:



## bGH Nachweis:

10 x Reaction buffer (Qiagen)	2 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,25 µl
dNTP's (1 mM)	2 µl
Primer bGH #1 (2 µM)	1 µl
Primer bGH #2 (2 µM)	1 µl
Aqua bidest.	11,65 µl
Hot Star Taq Polymerase	0,1 µl
Template DNA (ca. 60 ng)	1 µl

## GAPDH Nachweis:

10 x Reaction buffer (Qiagen)	2 µl
Q-Solution (Qiagen)	4 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,25 µl
dNTP's (1 mM)	1 µl
Primer bGH #1 (2 µM)	1 µl
Primer bGH #2 (2 µM)	1 µl
Aqua bidest.	8,65 µl
Hot Star Taq Polymerase	0,1 µl
Template DNA (ca. 60 ng)	1 µl

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen in einem Eppendorf Mastercycler Gradient durchgeführt:

**Tabelle 7: PCR Programm zum bGH und GAPDH Nachweis.**

Programmschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	94°C	15 min
Denaturierung	94°C	1 min
Primer Annealing	62°C	1 min
Elongation	72°C	1 min
Finale Elongation	72°C	10 min
Kühlung	4°C	∞

}

35 Zyklen

Als Positivkontrolle diente das Transgenkonstrukt bzw. DNA eines schon genotypisierten transgenen Tieres, als Negativkontrolle Aqua bidest.

### 3.8.5 Agarosegelelektrophorese

Agarosegele ermöglichen eine Auftrennung von Nukleinsäuren aufgrund ihrer Größe. DNA Fragmente zwischen 0,1 und 25 kb Größe können damit aufgetrennt werden.

Die Konzentration der Agarosegele hängt von der Größe der zu analysierenden DNA Fragmente ab (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Agarosegelkonzentration für ausgewählte DNA-Fragmentgrößen.**

Agarosegelkonzentration (% w/v)	DNA-Fragmentgröße (kb)
0,5	1-30
0,7	0,8-12
1,0	0,5-10
1,2	0,4-7
1,5	0,2-3
2,0	0,05-2

Routinemäßig werden TBE (Tris-Borsäure-EDTA) und TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer zur Herstellung der Gele verwendet. TBE-Gele ermöglichen eine höhere Auflösung und eine

schärfere Bandenzeichnung, sie werden daher für die Analyse von DNA-Fragmenten kleiner als 1 kb Größe empfohlen. Der Nachteil der TBE-Gele ist allerdings, dass die Borationen Komplexe mit den cis-diol Gruppen der Zucker Monomere und Polymere bilden können. Dies führt zu Problemen bei der Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.

Zur Analyse der PCR-Produkte wurden TAE-Agarosegele eingesetzt. Die Agarosekonzentration betrug 2 %. Die Gellösung wurde mit Ethidiumbromid mit einer finalen Konzentration  $f_c = 0,5 \mu\text{g/ml}$  versetzt. Die PCR Produkte wurden mit 6 x Loading Buffer gemischt und im Agarosegel aufgetrennt. Die Gele wurden unter Verwendung des „Stratagene Eagle Eye II“ Geldokumentationssystem dokumentiert.

### 3.8.6 Southern Blot

#### 3.8.6.1 Restriktionsendonukleaseverdau

Die genomische DNA wurde über Nacht bei 37°C in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß im Wärmeschrank nach folgenden Schema verdaut:

##### Restriktionsverdau der $c\beta$ -bGH DNA:

DNA	x $\mu\text{l}$ (10 $\mu\text{g}$ )
<i>EcoRI</i> (10 U/ $\mu\text{l}$ )	3 $\mu\text{l}$
10 x Buffer O+	3 $\mu\text{l}$
Spermidine (0,1 M)	1 $\mu\text{l}$
Aqua bidest.	ad 30 $\mu\text{l}$

##### Restriktionsverdau der $h\alpha_1$ AT-bGH DNA:

DNA	x $\mu\text{l}$ (10 $\mu\text{g}$ )
<i>BglII</i> (10 U/ $\mu\text{l}$ )	3 $\mu\text{l}$
10 x Buffer O+	3 $\mu\text{l}$
Spermidine (0,1 M)	1 $\mu\text{l}$
Aqua bidest.	ad 30 $\mu\text{l}$

Am nächsten Morgen wurden jedem Verdau 1  $\mu\text{l}$  des entsprechenden Enzyms zugegeben und nochmals mindestens 2 h bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.

### 3.8.6.2 Auftrennung der DNA im Agarosegel und Transfer

Die restriktionsverdauten DNA Fragmente wurden entsprechend ihrem Molekulargewicht in einem 0,8 % -TAE Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Den Proben wurden vor dem Auftragen 6 µl 6 x Loading Buffer zugesetzt. Jeweils rechts und links der Proben wurde ein Größenstandard (1 kb Marker der Firma MBI und NEB) aufgetragen. Nach photographischer Dokumentation unter UV Licht mit einem Lineal als Hilfsstandard wurde das Gel 15 min in 0,25 M HCl geschwenkt (Depurinierung). Anschließend wurde das Gel zweimal in Aqua bidest. gewaschen und weitere 30 min in 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl denaturiert. Über Nacht wurde die DNA mittels Kapillartransfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Biodyne<sup>®</sup>B) transferiert. Der Transfer erfolgte nach dem in Abbildung 5 gezeigten Aufbau und wurde mit einem Gewicht von 500 g beschwert.

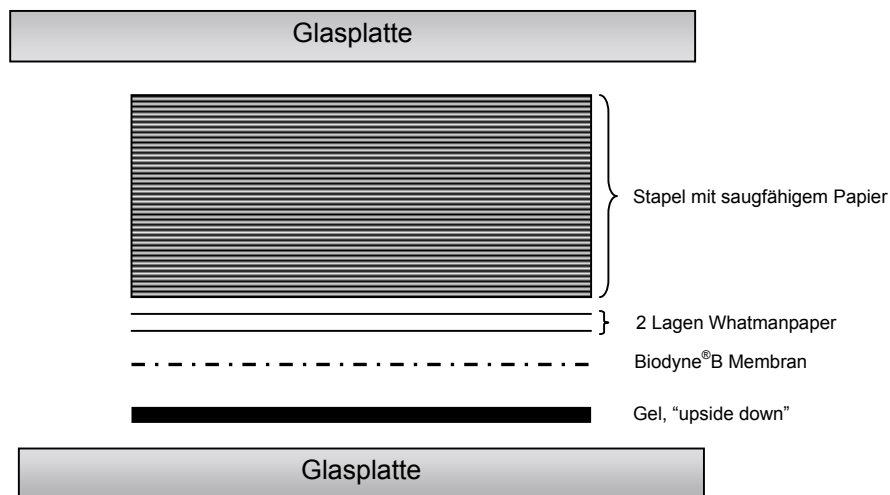


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Southern Blot Transfers.

Am nächsten Morgen erfolgte die Neutralisation der Membran in 1 M NaCl, 0,5 M Tris pH 8,0 für 5 min. Anschließend wurde die Membran auf einem Whatmanpapier für 10 min getrocknet. Zur Quervernetzung der transferierten DNA Stränge wurde die Membran mit UV-Licht exponiert (120 J/cm<sup>2</sup>).

### 3.8.6.3 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Die Herstellung der Sonde erfolgte durch einen *PstI* Verdau des cβa-bGH Konstruktes im pCAGGS Vektor. Die Bande bei 1039 bp wurde aus dem Gel, wie in Abschnitt 3.8.7 beschrieben, extrahiert (QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit). Zur Konzentrationsbestimmung und

zur Verifizierung der eluierten Bande ist ein Aliquot von 2 µl auf ein 1 % TAE Agarosegel aufgetragen worden.

50 ng der zu verwendenden Sonde wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und mit TE Puffer auf ein Volumen von 47 µl gebracht. Anschließend wurde der Sondenmix bei 95°C 5 min gekocht und danach 2 min auf Eis gelagert. Alle weiteren Schritte erfolgten im Isotopenlabor. Hier wurden 45 µl des Sondenmixes in das Rediprime II Random Prime Labeling System® Reaktionsgefäß überführt und mit 5 µl <sup>32</sup>P-dCTP (10 µCi/µl) 12 min bei 37°C radioaktiv markiert. Die Reaktion wurde durch 5 µl einer 0,2 M EDTA Lösung gestoppt. Die Entfernung nicht gebundener Radionukleotide erfolgte mittels MicroSpin™ S-300 HR Säulen.

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden 5 µl einer 1:100 Verdünnung in ein Szintillationsgefäß pipettiert. Die Anzahl der Zerfälle pro Minute (counts per minute = cpm) wurde in einem Szintillationszähler (LS 6500, Beckman) gemessen. Die Berechnung des cpm-Wertes erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{cpm}/\mu\text{l} = \text{cpm} * 20 (\text{Verdünnungsfaktor}) * 1,55 (\text{Cerenkov})$$

Für die Messung ohne Szintillationsflüssigkeit muss der Korrekturfaktor: 1,55 in die Formel eingefügt werden.

#### **3.8.6.4 Southern Blot Hybridisierung, Waschen und Signaldetektion**

Die Nylonmembran wurde in ein Hybridisierungsröhrchen überführt und mit folgender Lösung bei 65°C mindestens 1 h geblockt bzw. prähybridisiert:

Blockier/Prähybridisierungslösung:

15 ml Rapid Hyb Buffer (Amersham)

150 µl denaturierte Lachsspermien DNA (10 mg/ml)

Zur Hybridisierung ist eine Konzentration der Sonde von  $2 \times 10^6$  cpm pro ml Hybridisierungslösung erforderlich. Der Sonde wurden für die Hybridisierung denaturierte Lachsspermien DNA (fc = 100 µg/ml) und Cot-1 DNA (fc = 1 µg/ml) zugegeben. Kurz vor Zugabe der Sonde zur Hybridisierungslösung wurde die Sonde 6 min bei 95°C denaturiert und direkt auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Sondenmix mit der Hybridisierungslösung gemischt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C.

Am nächsten Morgen wurde unspezifisch gebundene Radioaktivität durch 3 Waschschrte von der Membran entfernt: 1 x 20 min bei RT mit 2 x SSC/0,1 % SDS und 2 x 15 min bei 65°C mit 1 x SSC/0,1 % SDS.

Die gewaschene Membran wurde in Folie eingeschweißt und die Exposition erfolgte auf einen „Storage Phosphor Screen“. Die Auslesung der gespeicherten Signale wurde mit Hilfe eines Phosphor-Imagers (Storm 860) vorgenommen.

### 3.8.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Gewünschte DNA-Fragmente können im Agarosegel von nicht benötigten Fragmenten getrennt werden.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einem ethidiumbromidhaltigen 1-1,5 % TAE-Agarosegel (Durchführung der Agarosegelelektrophorese siehe Abschnitt 3.4.5).

Nach photographischer Dokumentation unter UV Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm (Eagle Eye II) wurde die gewünschte Bande mit einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

Die Konzentration der isolierten DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese in einem ethidiumbromidhaltigen 1-1,5 % TAE Gel, unter Verwendung von 1 µg des Lamda/*Hind*III+*Eco*RI-Markers, abgeschätzt.

### 3.8.8 Ligation

Unter Ligation versteht man die Verbindung eines Vektormoleküls mit dem zu klonierenden DNA Molekül (Insert) unter Zuhilfenahme des Enzyms DNA-Ligase.

100 ng Vektor DNA wurden mit dem zwei-bis dreifachen molaren Überschuss an Insert DNA in einem 20 µl Ansatz mit 2 µl T4 DNA Ligase und 2 µl 10 x Ligationspuffer angesetzt.

Die Berechnung der erforderlichen DNA Insert Menge erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{ng Insert} = \frac{\text{ng Vektor} * \text{kb-Größe des Inserts} * \text{molare (Vektor : Insert) DNA Ratio}}{\text{kb-Größe des Vektors}}$$

Die Inkubationsdauer erfolgte 2 h bei RT.

### 3.8.9 Dephosphorylierung der 5'-Enden

Um einen Vektor vor einer Religation zu schützen, werden die Phosphatgruppen am 5'-Ende entfernt. Der Vektor wurde mit Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) nach folgendem Schema für 30 min bei 37°C im Thermoblock dephosphoryliert.

10 x CIAP reaction buffer	10 µl
CIAP (0,01 unit/pmol of ends)	1-2 µl
Ad Aqua bidest.	20 µl

Die CIAP wurde bei 85°C für 15 min inaktiviert.

## 3.9 Arbeiten mit RNA

### 3.9.1 Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Beim Arbeiten mit RNA wurden folgende Maßnahmen zur Vermeidung einer RNase Kontamination ergriffen:

- Alle Arbeiten wurden mit Einmalhandschuhen durchgeführt.
- Wenn möglich, wurden sterile Einmalplastikwaren benutzt, die weitgehend RNase frei sind.
- Glaswaren wurden vor Gebrauch mindestens 2 h bei 180°C sterilisiert (Inaktivierung der RNasen).
- Unsterile Plastikwaren wurden mindestens für 30 min in 0.2 N NaOH oder 1 % SDS Lösung gelegt und dann mit RNase-freiem Wasser gewaschen.
- Alle Reagenzien mit Ausnahme der Tris-haltigen Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt.

### 3.9.2 Isolation von RNA aus Gewebe

Zur Isolation von RNA aus Gewebe wurden je 30 mg der bis zur Verarbeitung bei -80°C gelagerten Organproben in ein 5 ml Plastikröhrchen überführt. Nach Zugabe von 1000 µl TRIzol® (Invitrogen) wurden die Proben mit Hilfe eines Gewebe-Homogenisators (Micra D8, ART Labortechnik Mülheim) 2 min auf der Stufe D (23.500 rpm) homogenisiert. Der Homogenisator wurde nach jeder Probe mit 0,2 N NaOH Lösung und DEPC behandeltem Aqua bidest. gereinigt. Die RNA wurde entsprechend den Herstellerangaben isoliert und je nach Pelletgröße in 50-200 µl DEPC behandeltem Aqua bidest. resuspendiert.

### 3.9.3 DNase I Verdau

Zur Vermeidung eventueller DNA Kontamination der RNA Probe wurde ein DNase I Verdau durchgeführt.

1 µg der isolierten RNA wurde in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit folgendem Mastermix 15 min bei RT verdaut.

DNase I	1 µl
10 x DNase I Puffer	3 µl
Aqua bidest.	6 µl

Die DNase I wurde mittels 1 µl einer 0,25 M EDTA Lösung 10 min lang bei 65°C im Thermoblock inaktiviert. Anschließend wurden die Quantität spektrophotometrisch und die Qualität in einem 1 % Agarosegel bestimmt.

### 3.9.4 Reverse Transkription und PCR (RT-PCR)

Als Reverse Transkriptase wurde die MMLV-RT, die aus dem Moloney-Maus-Leukämievirus gewonnen wird, eingesetzt. Die cDNA Erststrangsynthese erfolgte mittels Random-Hexamer-Oligomeren, diese können als Primer an verschiedenen Stellen des RNA Moleküls hybridisieren und somit eine cDNA Synthese über die gesamte Länge der RNA einleiten.

Für die Reverse Transkription wurden 400 ng der DNase I verdauten RNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und wie folgt eingesetzt:

RNA (DNase I verdaut, 400 ng)	x µl
Random Primer	1 µl
dNTP's (10 mM)	1 µl
ad Aqua bidest.	12 µl

Es folgte eine Inkubation für 2 min bei 65°C im Thermoblock mit sofortiger Abkühlung für 2 min auf Eis.



Anschließend wurden in jedes Reaktionsgefäß

5 x first strang buffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNase out	1 µl

pipettiert und für 10 min bei RT inkubiert. Bevor die Zugabe von 1 µl MMLV-RT erfolgte, wurde jede Probe 2 min bei 37°C im Thermoblock vorinkubiert. Es folgte die reverse Transkription für 50 min bei 37°C. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte 15 min lang bei 70°C, mit anschließender Abkühlung auf Eis für 2 min.

1 µl der cDNA wurden als Matrize für die PCR eingesetzt (PCR siehe 3.8.4.1).

### 3.9.5 Northern Blot-Transfer und Hybridisierung

Gelelektrophoretisch aufgetrennte RNA wird auf eine Membran transferiert und immobilisiert.

#### 3.9.5.1 Auftrennung von RNA im denaturierenden Agarosegel

Das Formaldehydgel wurde in einem Erlenmeyerkolben unter einem Abzug wie folgt angesetzt:

Agarose	1,5 g
Aqua bidest.	111 ml
10 x MOPS	15 ml
37 % Formaldehyd	24,3 ml
1 % Ethidiumbromid	8 µl

Agarose wurde mit Aqua bidest. zusammen aufgeköcht, die anderen Komponenten wurden nach dem Kochen unter Rühren zugefügt.

10 µg der Gesamt-RNA wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, mit dem 1,7 fachen Volumenanteil an RNA Ladepuffer und mit je 3 µl 6 x Ladepuffer (MBI) gemischt. Anschließend wurden die Proben 20 min bei 70°C inkubiert und sofort auf Eis gestellt.

Danach erfolgte die Gelelektrophorese bei 100 V für 2-3 h. Als Laufpuffer diente 1 x MOPS.

Die photographische Geldokumentation wurde am Eagle Eye II mit UV Licht unter Verwendung eines Lineals als Hilfsstandard durchgeführt.

### 3.9.5.2 Northern Blot Transfer

Das Gel wurde zunächst kurz in Aqua bidest. gewaschen und danach jeweils 40 min in Solution I und Solution II (Transferpuffer) in einem Horizontalschüttler (Rocky, Förbel Labortechnik, Wasserburg) bei RT geschwenkt.

Anschließend erfolgte der luftblasenfreie Blotaufbau wie in Abbildung 6 dargestellt.

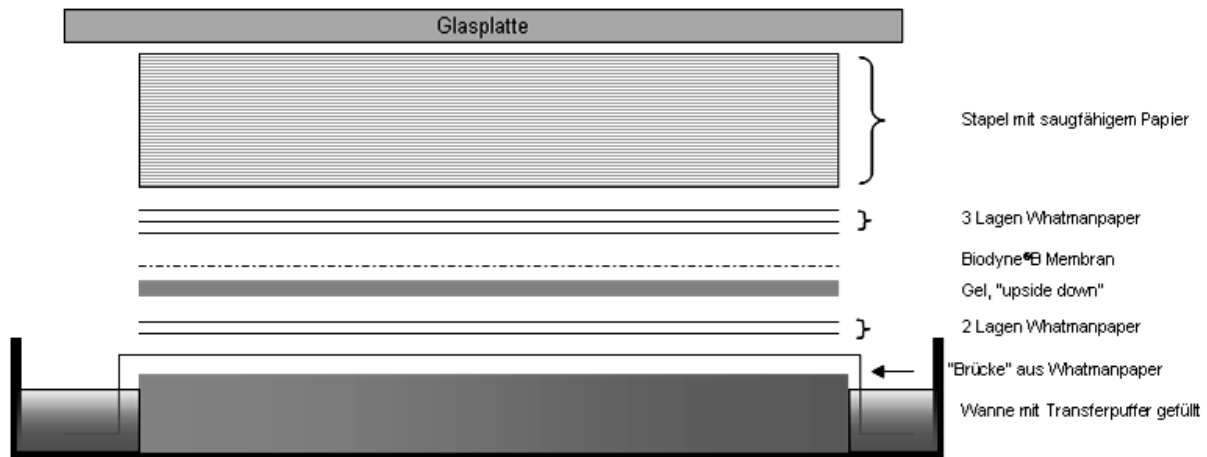


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Northern Blot Transfers.

Der RNA Transfer erfolgte über Nacht. Am nächsten Morgen wurden die RNA Fragmente mittels UV Licht ( $120\text{J}/\text{cm}^2$ ) immobilisiert.

### 3.9.5.3 Hybridisierung, Waschen und Signaldetektion

Die radioaktive Markierung der DNA Sonde, die Hybridisierung, das Waschen und die Signaldetektion erfolgten wie in den Abschnitten 3.8.6.3 und 3.8.6.4 beschrieben.

## 3.9.6 *In situ* Hybridisierung

### 3.9.6.1 Herstellung Digoxigenin markierter Sonden

RNA Sequenzen können mittels DNA-oder RNA-Sonden nachgewiesen werden. Die optimale Länge der Sonden liegt bei mindestens 100 bp, sollte aber nicht länger als 1 kb sein, da sie sonst schlecht in das Gewebe eindringen können.

Die Ribosonde wurde aus einer PEPCK-bGH transgenen Maus hergestellt. Aus Lebergewebe wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit sondenspezifischen Primern amplifiziert.

bGH fwd (sense) 5' CAC CAG CTA TGA TGG CTG CAG 3'

bGH rev (antisense) 5' GAT GGC TGG CAA CTA GAA GGC 3'

Das PCR Produkt wurde in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-Teasy (Promega) kloniert. Der Vektor enthält jeweils eine Promotorsequenz der Bakteriophagen-RNA-Polymerasen T7 und SP6.

Vor der *in vitro* Transkription wurde der Vektor mit einer Restriktionsendonuclease, *NcoI* für die antisense Sonde und *SacI* für die sense Sonde, linearisiert. Die Markierung mit Digoxigenin wurde wie folgt für 2,5 h bei 37°C im Thermoblock durchgeführt:

Linearisiertes Plasmid (1 µg)	10 µl
DIG RNA labeling mix	2 µl
RNA Polymerase	2 µl
10 x RNA Polymerase Puffer	2 µl
RNase Inhibitor (Ambion)	1 µl
Aqua bidest.	3 µl

Anschließend wurde die verbleibende DNA mit 2 µl DNase I 15 min im Thermomixer bei 37°C entfernt.

Die RNA Fällung erfolgte über Nacht bei -80°C mit Hilfe von t-RNA:

tRNA (10 µg/µl)	1 µl
Aqua bidest.	100 µl
NH <sub>4</sub> OAc (7,5 M)	33 µl
100 % EtOH	300 µl

Am nächsten Morgen wurde die RNA bei 4°C, 13.000 rpm, 5 min absedimentiert und anschließend 1 x mit 300 µl 70 % EtOH gewaschen. Das Pellet wurde in 100 µl Aqua bidest. resuspendiert. Die Konzentration und die Länge der Ribosonde wurde in einem 1 % ethidiumbromidhaltigen TAE Gel überprüft.

### 3.9.6.2 *In situ* Hybridisierung ohne Tyramide signal amplification (TSA)

#### 3.9.6.2.1 Vorbehandlung der Paraffinschnitte

Die Schnitte wurden 2 x 10 min in Xylol deparaffinisiert, in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 1 min 100 % EtOH; 1 x 5 min 70 % EtOH) rehydriert und in Aqua bidest. und PBS jeweils 3 min gewaschen. Anschließend erfolgte eine Refixation für 20 min in einer eisgekühlten 4 % Paraformaldehyd-PBS-Lösung. Nachdem die Schnitte 2 x je 5 min mit PBS gewaschen waren, wurden sie 7 min mit einer Proteinase K Lösung (20 µg/ml, in Proteinase K Puffer) permeabilisiert. Bevor die Schnitte nochmals für 20 min bei RT in 4 % Paraformaldehyd-PBS-Lösung fixiert wurden, mussten sie für 5 min in PBS gewaschen werden.

Nach einem weiteren Waschschrift für 5 min in PBS wurden die Schnitte 10 min mit 0,25 % Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin acetyliert. Nach Äquilibration mit 5 x SSC für 2 x 5 min wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (EtOH 60 %, 75 %, 95 % und 100 % je 1 min) dehydriert.

#### 3.9.6.2.2 Hybridisierung und Waschen

Die Schnitte wurden mit 20 µl Hybridisierungslösung (m-RNA Hybridisierungslösung) eine Stunde im Wasserbad bei Hybridisierungstemperatur prähybridisiert. In der Zwischenzeit wurde die Sonde bei 80°C 5 min denaturiert und mit der Hybridisierungslösung im Verhältnis von 1:50 und einer  $f_c = 100\text{-}200$  ng/ml gemischt.

Die Hybridisierungstemperatur wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\begin{aligned} \text{Hybridisierungstemperatur:} \quad & HT = 41 + 0.41(\%GC) - 500/n \\ & \% GC = \% GC \text{ Anteil der Sonde} \\ & n = \text{Sondenlänge in Basenpaaren} \end{aligned}$$

Die Schnitte wurden nach dem Aufbringen der Sonde mit Deckgläschen eingedeckelt und mit Fixogum wasserdicht abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgte im Wasserbad bei 65°C. Prähybridisierung und Hybridisierung wurden in einer verschlossenen Tupperdose im Wasserbad durchgeführt.

Am nächsten Morgen wurden zunächst die Deckgläschen vorsichtig in 4 x SSC abgelöst und anschließend 4 x 5 min in 4 x SSC gewaschen. Zur Reduzierung des Hintergrundsignals

wurden die Schnitte 30 min bei 37°C in RNase A (20 µg/ml RNaseA in NTE Puffer) inkubiert. Anschließend folgten bei RT stringente Waschschrte 2 x SSC/1 mM DTT 2 x 5 min, 1 x SSC/1 mM DTT 1 x 10 min, 0,5 x SSC/1 mM DTT 1 x 10 min gefolgt von 0,1 x SSC/1 mM DTT 2 x 30 min bei Hybridisierungstemperatur. Anschließend wurden die Schnitte 30 min in 0,1 x SSC 2 x 10 min gewaschen.

### **3.9.6.2.3 Cytochemische Detektion der hybridisierten Sonde**

Die Schnitte wurden in Puffer I 1 min bei RT äquiliibriert und anschließend 30 min bei RT mit Puffer II geblockt. Danach erfolgte die Antikörperinkubation (anti-DIG-AP, 1:1000) für 2 h. Nach zwei weiteren Waschschrten mit Puffer I für 2 x 15 min und 2 x 2 min mit Puffer III, erfolgte die Färbung der Hybridisierungsstelle mit BM Purple unter Sichtkontrolle.

Die Enzymreaktion dauerte 60 min. Die Schnitte wurden mit Vectashield Eindeckmedium eingedeckelt.

### **3.9.6.3 *In situ* Hybridisierung mit Tyramide signal amplification (TSA)**

#### **3.9.6.3.1 Vorbehandlung der Paraffinschnitte**

Die Schnitte wurden 2 x 10 min in Xylol deparaffinisiert, in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 1 min 100 % EtOH; 1 x 5 min 70 % EtOH) rehydriert und in Aqua bidest. und PBS jeweils 5 min gewaschen. Anschließend erfolgte eine Refixation für 20 min in einer eisgekühlten 4 % Paraformaldehyd-PBS-Lösung. Nachdem die Schnitte 2 x je 5 min bei RT mit PBS gewaschen sowie 5 min in 0,2 N HCl bei RT inkubiert waren, wurden sie mit einer 0,8 % Pepsinlösung 6 min permeabilisiert. Nach einem Waschschrte für 5 min in PBS wurden die Schnitte 10 min mit 0,25 % Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin bei RT acetyliert. Es folgte ein Waschschrte in PBS für 5 min bei RT und die Äquiliibriierung mit 5 x SSC für 2 x 5 min.

#### **3.9.6.3.2 Hybridisierung und Waschen**

Die Sondenvorbereitung und die Hybridisierung wurde analog zum Abschnitt 3.9.6.2.2 ausgeführt. Die Hybridisierungstemperatur betrug 55°C.

Am nächsten Morgen wurden die Deckgläschen in 2 x SSC bei 45°C vorsichtig abgelöst und weitere 5 min in 2 x SSC bei 45°C inkubiert. Es folgten die Präinkubation 2 x 5 min bei 45°C in NTE Puffer und der RNase Verdau (20 µg/ml RNaseA in NTE Puffer) für 30 min bei 37°C. Anschließend wurden die Schnitte in 2 x SSC/50 % Formamid 2 x 20 min, 55°C; 0,08 x SSC

Stringent Wash (DAKO) 20 min, 55°C und 2 x 3 min, RT in TBS-T (DAKO) gewaschen. Danach folgte das Blocken der endogenen Peroxidase mit 1 Tropfen „Peroxidase Blocking reagent“ (DAKO) für 10 min bei RT und einem weiteren Waschschrift mit TBS-T für 3 x 5 min bei RT.

### **3.9.6.3.3 Cytochemische Detektion der hybridisierten Sonde**

Die Schnitte wurden 30 min bei RT mit 150 µl Blocking Puffer pro Objektträger geblockt. Danach erfolgte die Antikörperinkubation mit Rabbit HRP anti-DIG (1:75) für 45 min bei RT in einer feuchten Kammer, gefolgt von 3 Waschschriften mit TBS-T für 4 min bei RT. Anschließend wurde ein Tropfen Biotinyl-Tyramid auf die Schnitte appliziert und für 8 min im Dunkeln bei RT inkubiert, wiederum gefolgt von 3 Waschschriften mit TBS-T für 4 min bei RT. Beim nächsten Vorgang wurde der Sekundärantikörper Avidin HRP (DAKO) jeweils mit einem Tropfen auf die Schnitte für 15 min bei RT appliziert. Zum Entfernen des Antikörpers wurden die Schnitte 3 x 5 min mit TBS-T bei RT gewaschen. Durch die Enzymreaktion mit Diaminobenzidin (DAB) wurde die Hybridisierungsstelle sichtbar gemacht (braunes Signal). Je nach Organ dauerte die Enzymreaktion 10-30 s. Die Farbreaktion wurde unter fließendem Leitungswasser gestoppt.

Vor dem Eindecken der Schnitte mit Entellan neu<sup>®</sup> wurden die Schnitte 30 s mit Hematoxylin gegengefärbt, die Färbereaktion unter fließenden Wasser gestoppt und danach 10 min im Wasserbad inkubiert, bis eine violette Farbreaktion zu erkennen war. Darauf folgte eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 %) mit Ethanol, 1 x 100 % Isopropanol für je 1 min bei RT. Zur Klärung wurden die Schnitte 1 min bei RT in Xylol verbracht.

## **3.10 Arbeiten mit Proteinen**

### **3.11 Isolation von Proteinen**

#### **3.11.1.1 Isolation von Proteinen aus Geweben**

In ein 10 ml Plastikröhrchen wurden 20 mg der bis zur Verarbeitung bei -80°C gelagerten Organproben überführt. Nach Zugabe von 500 µl Proteinextraktionspuffer wurden die Proben mit Hilfe eines Gewebe-Homogenisators 2 min auf der Stufe D (23.500 rpm) homogenisiert. Der Homogenisator wurde nach jeder Probe mit Aqua bidest. und 1 x PBS gereinigt. Die homogenisierten Gewebeproben wurden auf Eis gelagert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Proben im Heizblock bei 95°C 5 min gekocht und 3 min auf Eis abgekühlt. Nach einem Sedimentationsschritt (12.000 rpm, 4°C, 5 min) wurde der

Überstand in 150 µl Aliquots in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

### 3.11.1.2 Isolation von Proteinen aus Zellen

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80 % auf einer 6-Well Platte kultiviert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt. Die Zellen wurden in PBS aufgenommen und 2 x in 1 x PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 100 µl RIPA Puffer aufgenommen.

### 3.11.2 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) werden Makromoleküle durch ein elektrisches Feld in einer quervernetzten Polyacrylamid-Matrix aufgetrennt. Natriumdodecylsulfat denaturiert Proteine und lagert sich ungefähr proportional zum Molekulargewicht an Proteine an. Bestehende Ladungsunterschiede werden so kompensiert. Die Wanderung im elektrischen Feld wird daher im Wesentlichen durch das Molekulargewicht bestimmt. Durch Vergleich des Laufverhaltens von Proteinen mit bekannten Molekulargewichten (Rf-Werte) kann so das Molekulargewicht bisher unbekannter Proteine abgeschätzt werden.

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden die aufgetragenen Proben in einem vorgeschalteten Sammelgel zunächst fokussiert. Dadurch wird die Schärfe der Banden wesentlich verbessert.

#### 3.11.2.1 Herstellung der Polyacrylamidgele

Die SDS-PAGE wurde in einem vertikalen Gelelektrophoresesystem (Miniprotean III Sytem) mit einer Dicke von 1 mm und einer Trennstrecke von ungefähr 5 cm durchgeführt. Unmittelbar nach dem Gießen wurde das Trenngel (5 %) mit Wasser überschichtet, welches vor dem Gießen des Sammelgels (12 %) sorgfältig entfernt wurde.

**Tabelle 9: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels für jeweils vier Minigele.**

	<b>Trenngel 12 %</b>	<b>Sammelgel 5 %</b>
Aqua bidest.	8 ml	7 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	6 ml	-
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	1,25 ml

30 % Acrylamid/Bis Solution 29:1	9,6 ml	1,5 ml
10 % SDS	240 µl	100 µl
Temed	12 µl	5 µl
10 % APS	120 µl	100 µl

Die Käbme wurden in das flüssige Sammelgel gesteckt.

### 3.11.2.2 Elektrophoresebedingungen

Die Proteinproben wurden, wenn sie nicht mit Proteinextraktionspuffer isoliert wurden, mit 5-fach konzentriertem SDS-Denaturierungspuffer versetzt, 2 min bei 95°C erhitzt, kurz auf Eis abgekühlt und anschließend in die Taschen eines vorbereiteten Gels aufgetragen. Zur Orientierung wurde ein Molekulargewichtstandard (Protein Molecular Weight Marker, MBI) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte zunächst bei 100 V bis zum Erreichen des Trenngels und danach ca. 1 h lang bei 160 V in einem glycinreichen alkalischen Laufpuffer.

### 3.11.3 „Semi – dry – blot“ Western Blot Transfer

Unmittelbar nach Abschluss erfolgte der Transfer der im SDS-PAGE getrennten Proteine auf eine proteinbindende PVDF-Membran mit Hilfe des „semi-dry-blot“ Verfahrens unter Verwendung des Milliblot-Graphit Elektrobloppers (Millipore).

Die Membran wurde zunächst 10 min in 100 % Methanol aktiviert und 30 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Blot wurde luftblasenfrei nach Abbildung 7 aufgebaut.

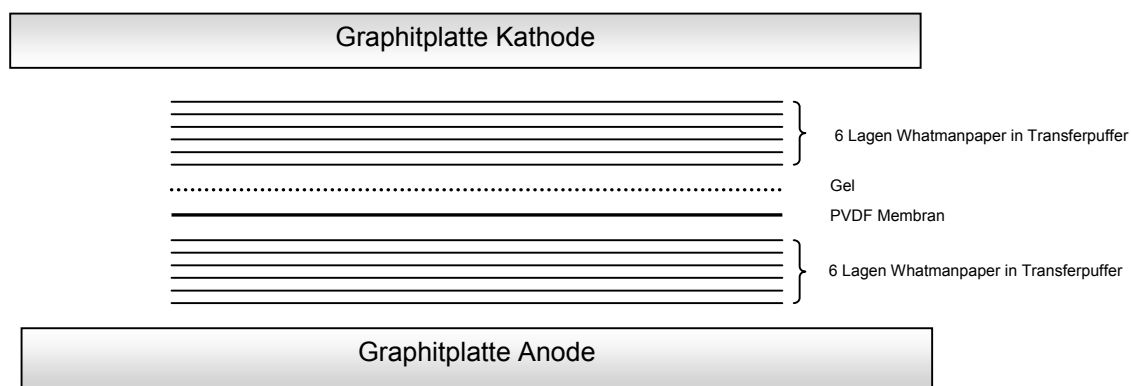


Abbildung 7: Schematischer Aufbau des Western Blot Transfers.

Die Proteine wurden mit  $1 \text{ mA/cm}^2$  90 min lang auf die Membran transferiert.



### 3.11.4 Färbung der Proteine nach Coomassie Brilliantblau R-250

Der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie Brilliantblau R-250 bindet im sauren Medium vor allem durch elektrostatische Wechselwirkungen an freie geladene Amino- und Iminogruppen der Proteine. Dadurch ergibt sich eine signifikante Korrelation zwischen der Farbintensität und dem Anteil des jeweiligen Proteins an Lysin-, Arginin- und Histidinresten. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei 0,3-1 µg pro Proteinbande. Somit kann die Effizienz eines Blotvorganges sehr gut durch die hohe Effizienz des Farbstoffes überprüft werden.

Die PVDF-Membran wurde 1-5 min in der Färbelösung auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgegossen und durch die Entfärbelösung ersetzt. Der Entfärbevorgang wurde unter Beobachtung solange fortgesetzt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden und nur noch eine leicht blaue Hintergrundfärbung bestand. Die Membran wurde nach dem Entfärbevorgang auf einem Whatmanpaper getrocknet.

Für die Durchführung des Immunnachweises wurde die PVDF-Membran kurz in 100 % Methanol eingetaucht und anschließend direkt in die Blockierungslösung überführt.

### 3.11.5 Immunoblot

Beim Immunoblot wird die Molmasse eines Proteins über die Bindung spezifischer Antikörper bzw. die Spezifität von Antikörpern gegenüber einem Antigen ermittelt.

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran nach kurzem Waschen in Waschpuffer für 60 min bei RT in Blockierungspuffer inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem in Natriumazid-haltigem Blockierungspuffer verdünnten Primärantikörper für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen (3 x 10 min) in Waschpuffer wurde die Membran eine Stunde mit einem peroxidasegekoppelten, gegen den Isotyp und die Spezies des Primärantikörper gerichteten, Zweitantikörper in Blockierungspuffer inkubiert. Nach erneutem Waschen (3 x 15 min) erfolgte der Nachweis gebundener Antikörper mit Hilfe des „Western blotting luminol“ (Santa Cruz) nach den Angaben des Herstellers. Bei der Oxidation des Substrates Luminol durch die Peroxidase wird Licht emittiert. Dies kann durch Exposition der Membran auf Röntgenfilmen (Hyperfilm ECL) sichtbar gemacht werden.

## **3.12 Arbeiten mit Bakterien**

### **3.12.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien**

Transformationskompetente Bakterien sind Bakterien, die die Fähigkeit besitzen, DNA in ihr Inneres aufzunehmen.

Der Bakterienstamm TOP10 Escherichia coli wurde in einer 300 ml Luria-Bertani Medium (LB) bei 37°C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,7-0,8 wurden die Kulturen 10 min auf Eis gelagert. Danach wurden die Zellen 10 min bei 4°C und 4000 rpm (Beckmann GS-6K Zentrifuge) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 225 ml eisgekühltem TfbI-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis gelagert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (4°C, 10 min, 4000 rpm) wurde das Pellet in 9 ml eiskalten TfbII-Puffer resuspendiert. Die kompetenten Bakterien wurden nun in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße zu je 200 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### **3.12.2 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA**

Unter Transformation von Bakterien versteht man die Aufnahme von DNA in die Zelle.

Die Plasmidklonierungsvektoren besitzen mindestens ein Gen, das den Wirtszellen eine Antibiotikaresistenz verleiht. Zur Selektion der Transformanten werden die Zellen auf ein antibiotikahaltiges Nährmedium ausplattiert, so dass sich nur noch Kolonien mit dem Resistenzgen vermehren können.

Die transformationskompetenten Bakterien (TOP10) wurden auf Eis langsam aufgetaut. Bei einer Plasmidretransformation wurden 1 µg DNA bzw. bei einer Ligationstransformation 10 µl des Liagationsansatzes zu den Bakterien pipettiert, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock von exakt 45 s bei 37°C und eine 5 minütige Lagerung auf Eis folgten. Nach Zugabe von 800 µl SOC Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden anschließend mit einer sterilen Impföse oder einer Pipettenspitze auf Agar-LB-Amp-Platten mittels eines fraktionierten Ausstrichs ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank bebrütet. Nach 12 bis 16 Stunden waren Einzelkolonien sichtbar.

### **3.12.3 Herstellung von DMSO-stocks**

Zur Stammhaltung wurde 1 ml einer dichten Bakteriensuspension mit 70 µl DMSO bei -70°C in Cryotubes (NUNC) eingefroren.

### 3.13 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt.

#### 3.13.1 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 5 %CO<sub>2</sub> in Luft und maximaler Luftfeuchtigkeit in Gewebekulturschalen. Ein Wechsel des Kulturmediums wurde im Abstand von zwei bis drei Tagen durchgeführt. Das alte Medium wurde abgesaugt und neues Medium in der entsprechenden Menge wieder zugegeben.

#### 3.13.2 Auftauen der Zellen

Kryokonservierte Zellen wurden etwa 1 min lang bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Nach zweimaligem Waschen im Kulturmedium wurde das Pellet im neuen Medium aufgenommen und die Zellen in Kulturschalen überführt.

#### 3.13.3 Kryokonservierung der Zellen

Erreichten die Zellen eine Dichte von ca. 90 % wurden sie einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 x Trypsin-EDTA bei 37°C inkubiert. Bei beginnender Ablösung und Vereinzelung der Zellen von der Kulturschale wurde die Trypsinierungsreaktion durch Zugabe der vierfachen Menge an serumhaltigem Medium gestoppt. Daraufhin wurden die Zellen 5 min bei 300 x g pelletiert. In einem 1,8 ml Kryogefäß (Nunc) wurden 100 µl DMSO vorgelegt. Das Zellpellet wurde in 900 µl FKS resuspendiert und mit dem vorgelegten DMSO resuspendiert. Die Zellen wurden über Nacht bei -80°C gelagert und anschließend zur weiteren Lagerung in Flüssigstickstoff überführt.

#### 3.13.4 Transfektion von Zellen

Die Zellen wurden in einer six-well Platte bei einer Konfluenz von 60 % mit FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche) transfiziert. Pro Well wurde folgender Transfektionsansatz bereitet:

DNA	1 µg
FuGENE 6	4 µl
Optimem	100 µl

Der Transfektionsansatz wurde 15 min bei RT inkubiert. Inzwischen wurde bei den Zellen ein Mediumwechsel vorgenommen. Anschließend wurden in jedes Well 100 µl des Transfektionsansatzes pipettiert und die Platten vorsichtig zum Mischen des

Transfektionsansatzes geschwenkt. Nach 48 Stunden konnten die transfizierten Zellen geerntet werden.

### **3.14 Untersuchungen an Tieren**

#### **3.14.1 Ermitteln der täglichen Gewichtszunahmen und der Organgewichte**

Die Würfe wurden je nach Größe der Nachkommen am fünften oder sechsten Lebenstag zur Identifizierung am Fuß tätowiert. Größere Würfe wurden erst am sechsten Lebenstag tätowiert, da sonst die Gefahr bestand, dass die Mutter ihre Nachkommen aufgrund der Manipulation aufgefressen hätte.

Die Tiere wurden vom 5. bis zum 55. Lebenstag täglich zwischen 10 und 12 Uhr auf 0,1 g genau gewogen. Nach dem 55. Lebenstag wurden die Tiere nur noch 2 x pro Woche bis zum 65. Lebenstag gewogen. Im Alter von 65 Tagen wurden die Tiere unter Ethernarkose nochmals gewogen und Blut aus dem retrobulbären Plexus entnommen. Unter tiefer Narkose wurde die NRL gemessen. Es wurde die Länge zwischen Nasenspitze und Schwanzansatz auf einen mm genau bestimmt. Mit Hilfe eines Gewichts von 25 ml Wasser, das am Schwanz befestigt wurde, wurden die Tiere gleichmäßig gestreckt. Anschließend wurden die Tiere durch zervicale Dislokation getötet. Sofort nach dem Öffnen der Bauchhöhle wurde das Pankreas auf 0,1 mg genau gewogen und entweder bei -80°C für RNA- oder Proteinisolation oder in 4 % PFA für histologische Untersuchungen asserviert. Mit den weiteren Organen wurde ebenso verfahren. Nach Entnahme aller Organe wurde das Karkassengewicht (Rumpf mit Muskeln und Knochen, ohne Kopf und Haut) auf 0,1 g genau bestimmt.

#### **3.14.2 Klinisch-chemische Untersuchungen**

Um Auswirkungen der bGH-Genexpression auf den Stoffwechsel und Organfunktionen zu erfassen, wurden klinisch-chemische Parameter im Serum von c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäusen untersucht. Die Proben wurden in der German Mouse Clinic (GMC) des Research Center for Environment and Health (GSF) analysiert.

Die Tiere wurden in zwei Altersgruppen eingeteilt. Zur ersten Gruppe gehörten 22 transgene Tiere im Alter von 65 Tagen, mit einem ungestörten Allgemeinbefinden. Die zweite Gruppe bestand aus 12 älteren Tieren im Alter zwischen 73 und 190 Tagen, die ein reduziertes Allgemeinbefinden aufwiesen. Als Kontrollwerte dienten die Seren der nicht-transgenen Geschwistertiere.

Zur Beurteilung der Leberfunktion wurden folgende Parameter untersucht: Aspartat-Amino-Transferase (AST, früher GOT), Alanin-Amino-Transferase (ALT, früher GPT) und die Alkalische Phosphatase (AP). Zur Erfassung der Nierenfunktion wurden folgende Parameter erhoben: Kreatinin- (Crea), Harnsäure- (HS) und Harnstoffspiegel (HST) sowie Amylase und Lipase. Weitere Untersuchungsparameter waren Glukose, Gesamtprotein, Triglyceride, Cholesterin, Ferritin, Transferrin, die Elektrolyte Natrium, Kalium, Kalzium, Chlorid und Phosphat und der muskelspezifische Parameter, die Kreatinkinase (CK). Um sich ein Bild über eine mögliche Entzündungsreaktion zu verschaffen, wurde zusätzlich das C-reaktive Protein (CRP) bestimmt.

### **3.14.3 Bestimmung der bGH-Konzentration im Serum**

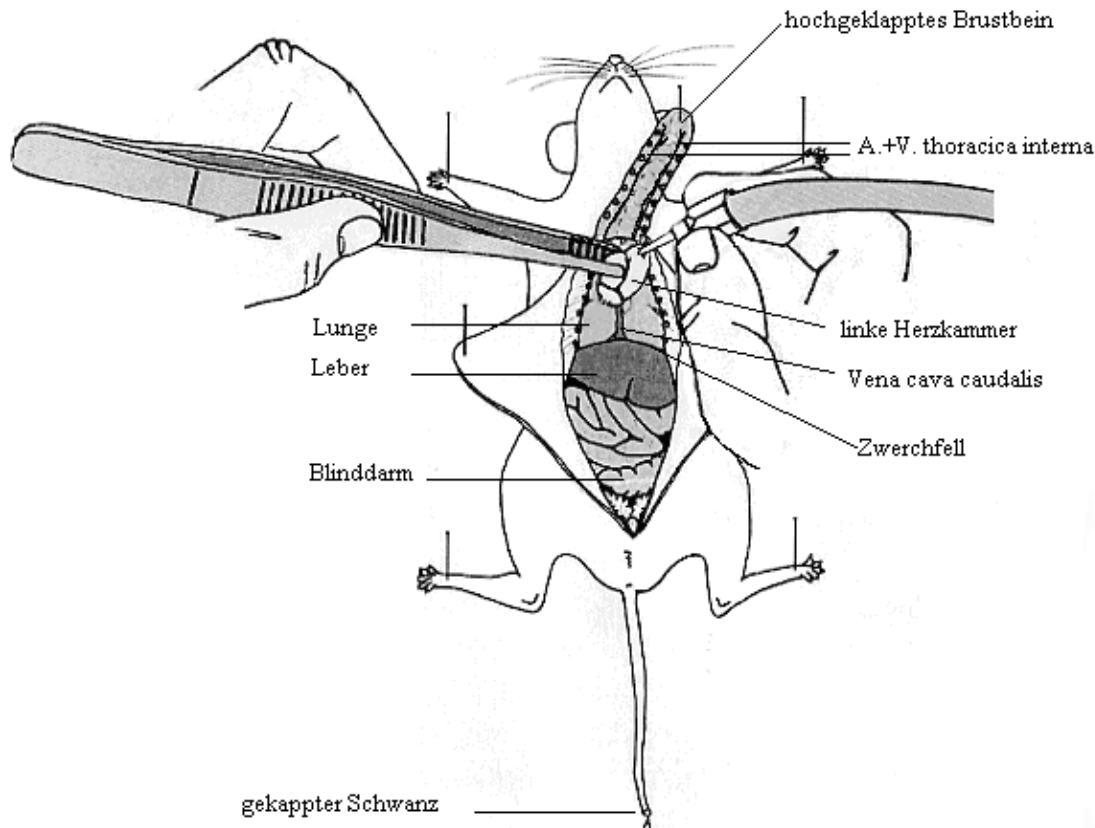
Die Serumkonzentration des bovinen Wachstumshormons wurde am Institut für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung der Ludwig-Maximilians-Universität München bestimmt. Im ELISA (Erhard *et al.* 1994) wurden bei 39 c $\beta$ a-bGH-transgenen Tieren im Alter von 65-187 Tagen die bGH-Konzentration bestimmt. Bei den nicht-transgenen Kontrolltieren konnte im ELISA kein bovines Wachstumshormon detektiert werden.

## **3.15 Anfertigen histologischer Präparate**

### **3.15.1 Gewinnung von perfundierten Nieren für die pathomorphologischen Untersuchungen**

Die Fixierung der Nieren für die histologischen Untersuchungen wurde durch vaskuläre Perfusion mit 5 % Formaldehydlösung (Formalin 1:7 verdünnt mit PBS pH 7,4) durchgeführt. Die Perfusionsfixierung erfolgte unter Verwendung einer Apparatur, die eine Perfusion durch die Schwerkraft ermöglicht (= Fallstromperfusion). Die auf 37°C erwärmten Lösungen wurden durch Infusionsschläuche über eine Heidelbergerverlängerung zum Tier geleitet. Die Umstellung von PBS (pH 7,4) auf 5 % Formaldehydlösung erfolgte über einen integrierten 3-Wege Hahn. Unmittelbar nach der Euthanasie der Mäuse durch Etherinhalation wurde das Gefäßsystem über den linken Herzventrikel (siehe Abbildung 8) mit körperwarmem PBS und 2 ml Procasel<sup>®</sup> 2 % gespült. Gleichzeitig mit dem Beginn der Infusion wurde die hintere Hohlvene zwischen Leber und Zwerchfell zur Drainage eröffnet. Nach 20 s Spülung unter einem hydrostatischen Druck von 100 mm Hg wurde, ohne Unterbrechung des Perfusionsflusses und unter Beibehaltung des Drucks, zur Fixierung 5 min mit 5 % Formaldehydlösung perfundiert. Nach Beendigung der Perfusion wurden die Nieren aus dem

Tierkörper entfernt und nach Entfernung der Nierenkapsel wurden die Nieren über Nacht in einem Gefäß im selben Fixationsmittel bis zur weiteren Präparation aufbewahrt.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Perfusionsfixation.**

Dargestellt ist das Einführen der Kanüle in die linke Herzkammer (Andreas Blutke, 2004).

### 3.15.2 Paraffinhistologie

Die Organe wurden direkt nach der Entnahme aus dem Organismus für 12 Stunden mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Organe in Stücke geschnitten und in Gewebekapseln verbracht. Fixierte Gewebeproben wurden in einem Histomaster 2050/DI (Bavimed, Birkenau) im Routinebetrieb des Instituts für Tierpathologie der LMU München weiterverarbeitet. Das Paraffin-durchtränkte Gewebe wurde mit Paraffin in Blöcke gegossen und in einer Dicke von 3-4 µm mit einem HM 315 Mikrotom geschnitten. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet.

Zur weiteren histologischen Bewertung wurden die Schnitte mit Hämalaun-Eosin (H&E) oder Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach McManus (PAS) gefärbt. Die gefärbten Präparate wurden

in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, in Xylol überführt und mit Eukitt eingedeckelt.

### **3.15.3 Kunststoffhistologie**

Die fixierten Organscheiben wurden in Gewebekapseln verbracht und in einem Citadel 1000 (Shandon, Frankfurt) Einbettautomaten im Routinebetrieb des Instituts für Tierpathologie der LMU München weiterverarbeitet. Im Anschluss an die Polymerisation wurden Schnitte von 1,5 µm Dicke mit einem Reichert-Jung 2050 Supercut Rotationsmikrotom (Cambridge Instruments, Nussloch) angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Nachdem die Schnitte 30 min bei 60°C getrocknet waren, wurden sie mit H&E gefärbt. In ausgewählten Fällen wurden die Präparate mit PAS oder einer kombinierten Färbung mit Perjodsäure-Methenaminsilber, Schiff'sn Reagenz und Hämalaun gefärbt (PAMS-PAS).

### **3.15.4 Entparaffinisieren und Rehydrieren**

Nach folgendem Protokoll wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert und rehydriert:

**Tabelle 10: Entparaffinieren und Rehydrieren von Paraffinschnitten.**

Schritt	Lösung	Zeit
1	Xylol	10 min
2	Xylol	10 min
3	Isopropanol	2 min
4	96 % Ethanol	2 min
5	70 % Ethanol	2 min
6	Aqua bidest.	2 min

### 3.15.5 Färbungen für Paraffinschnitte

#### 3.15.5.1 Hämalaun und Eosin

Tabelle 11: H&E Färbung an Paraffinschnitten.

Schritt	Lösung	Zeit
1	Mayer's Hämalaun	5 min
2	Waschen mit Leitungswasser	5 min
3	0,5 % HCl-Alkohol	bis die Objektträger klar waren
4	Waschen mit Leitungswasser	5 min
5	Eosin Y	Objektträger 2-7 x dippen
6	Aqua bidest. 3 x	3 s

#### 3.15.5.2 Perjodsäure-Schiff-Reaktion

Tabelle 12: PAS Färbung an Paraffinschnitten.

Schritt	Lösung	Zeit
1	1 % Perjodsäure	10 min
2	Waschen mit Leitungswasser	10 min
3	Aqua bidest. 3 x	3 s
4	Schiff's Reagenz	30 min
5	Waschen mit Leitungswasser	5 min
6	Mayer's Hämalaun	2 min
7	Waschen mit Leitungswasser	5 min
8	1 % HCl-Alkohol	1 s
9	Waschen mit Leitungswasser	5 min



### 3.15.6 Färbungen für in Kunststoff eingebettete Schnitte

#### 3.15.6.1 Hämalaun und Eosin

Tabelle 13: H&E Färbung an Kunststoffschnitten.

Schritt	Lösung	Zeit
1	Mayer's Hämalaun	30 min
2	Waschen mit Leitungswasser	10 min
3	0,5 % HCl-Alkohol	1 s
4	Waschen mit Leitungswasser	10 min
5	Trocknen lassen	
6	Eosin Y	5 min
7	Aqua bidest. 3 x	3 s

#### 3.15.6.2 Perjodsäure-Schiff-Reaktion

Tabelle 14: PAS Färbung an Kunststoffschnitten.

Schritt	Lösung	Zeit
1	1 % Perjodsäure	15 min
2	Aqua bidest. 3 x	3 s
3	Trocknen lassen	
4	Schiff's Reagenz	30-60 min
5	Mayer's Hämalaun	2 min
6	Waschen mit Leitungswasser	5 min
7	1 % HCl-Alkohol	1 s
8	Waschen mit Leitungswasser	5 min
9	Trocknen lassen	

### 3.15.6.3 Kombinierte Färbung mit Perjodsäure-Methenaminsilber, Schiff's Reagenz und Hämalaun

Tabelle 15: PAMS-PAS Färbung an Kunststoffschnitten.

Schritt	Lösung	Zeit
1	1 % Perjodsäure	15 min
2	Aqua bidest. 3 x	3 s
3	Trocknen lassen	
4	Methenaminsilber Färbelösung	15-50 min
5	Aqua bidest. 3 x	3 s
6	1,5 % Natriumthiosulfat	2 min
7	Leitungswasser	5 min
8	Trocknen lassen	
9	Schiff's Reagenz	60 min
10	Leitungswasser	5 min
11	Trocknen lassen	5 min
12	Mayer's Hämalaun	25 min
13	Leitungswasser	10 min
14	1 % HCl-Alkohol	1 s
15	Leitungswasser	10 min
16	Trocknen lassen	

Danach wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Histofluid® eingedeckt.

### 3.16 Statistik

Die Körpergewichtsdaten wurden zunächst statistisch linear interpoliert (Wolf *et al.* 1991d). Danach wurden die Least Square Means (LSM) und die Standardfehler (SE) der Körpergewichtsdaten, des Organgewichtes und der klinisch-chemischen Blutparameter mit der General Linear Model (GLM) Prozedur (SAS Institute, Inc., Cary, NC) unter Einbeziehung der Gruppe und des Geschlechtes analysiert.

Die Vererbung des Transgens wurde mit dem Vorzeichentest nach Dixon und Mood statistisch überprüft.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Herstellung des DNA-Konstruktes für bGH-transgene Tiere auf Inzuchtbasis

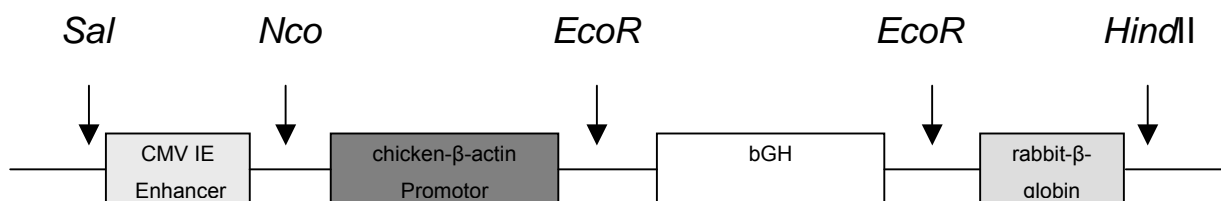
#### 4.1.1 bGH-Transgen unter der Kontrolle des chicken- $\beta$ -Actin-Promotors

Die genomische Sequenz des bGH Gens (großzügigerweise von Prof. Maurer, Oregon Health Science Institut, Portland, USA, überlassen) wurde mit *BamHI* und *KpnI* aus dem Vektor pBR322 herausgeschnitten und in den mit *BamHI* und *KpnI* geöffneten und dephosphorylierten Vektor pSP73 ligiert. Ein *BamHI*-*BglIII* Fragment wurde in die korrespondierenden Schnittstellen des Vektors pCDNA3 ligiert. Im letzten Schritt wurde dann das bGH Gen mit *EcoRI* herausgeschnitten und in den mit *EcoRI* geöffneten pCAGGS Vektor (Niwa *et al.* 1991) (großzügigerweise von Dr. Schneider, Genzentrum, LMU München zur Verfügung gestellt) ligiert, der den immediate-early enhancer des Cytomegalovirus (CMV-IE enhancer) und den Promoter, der das erste untranslatierte Exon und das erste Intron des chicken- $\beta$ -actin-Gens enthält. Am 3'-Ende der Insertionsstelle befindet sich zudem das rabbit- $\beta$ -globin Polyadenylierungssignal (pA).

Die Integrationsrichtung des bGH Gens wurde durch Sequenzierung mit dem Primer pTORU seq überprüft.

pTORU seq            5' CTA CAG CTC CTG GGC AAC GTG 3'

Für die Mikroinjektion wurde das 4,2 kb grosse Injektionsfragment durch einen *SalI*, *HindIII* Verdau ausgeschnitten.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung des c $\beta$ a-bGH Injektionskonstruktes.**

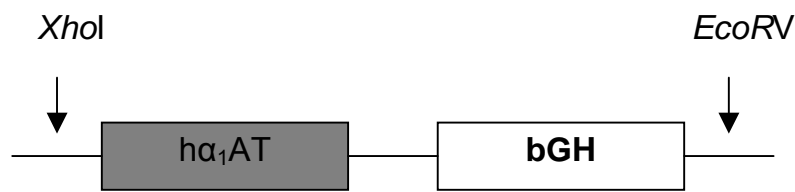
CMV IE Enhancer: humaner Cytomegalovirus immediate-early enhancer; Chicken- $\beta$ -actin Promotor: Promotor (1,7 kb) mit dem ersten transkribierten, aber nicht translatierten Exon, gefolgt vom ersten Intron; bGH: bovines growth hormone Gen (1,9 kb); rabbit- $\beta$ -globin PA; rabbit- $\beta$ -globin Polyadenylierungssignal (600 bp).

#### 4.1.2 bGH-Transgen unter der Kontrolle des humanen $\alpha_1$ -anti-Trypsin-Promotors

Der humane  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Promotor (großzügigerweise von Dr. Cortese, Istituto Di Ricerca Di Biologia Molecolare, Rom überlassen) wurde unter Einfügen einer *XbaI* Schnittstelle mittels PCR amplifiziert. Das *XbaI* Fragment wurde in die korrespondierenden Schnittstellen des Vektors pSP73 Vektor ligiert, der das bGH Gen enthielt. Die Integrationsrichtung des  $\alpha_1$ -Antitrypsin Promotors wurde mit Sequenzierung (Primer T7) überprüft.

T7:            5'     GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG            3'

Für die Mikroinjektion wurde das 2,7 kb grosse Injektionsfragment (siehe Abbildung 10) durch einen *EcoRV*, *XhoI* Verdau ausgeschnitten.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung des  $h\alpha_1$ AT-bGH Injektionskonstruktes.**

$h\alpha_1$ AT = humaner  $\alpha_1$ -anti-Trypsin Promotor (730 bp); bGH = bovines growth hormone Gen (1,9 kb) mit einem endogenen PA

## 4.2 Austestung der Konstrukte in vitro

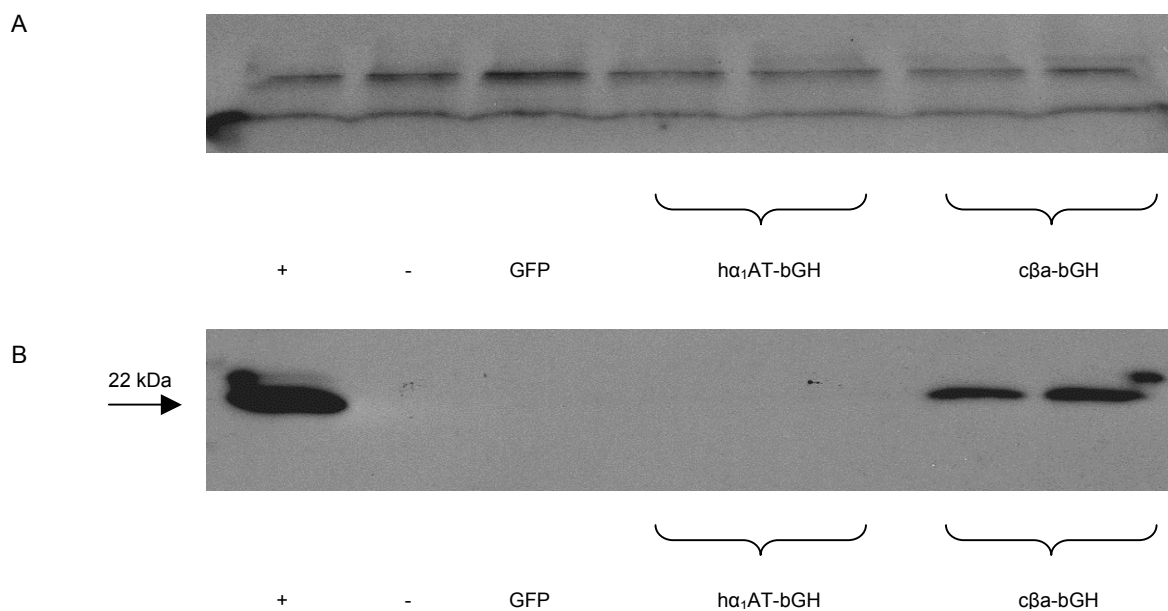
Zur Austestung der Funktionalität der verwendeten Promotoren wurden das c $\beta$ a-bGH und das  $h\alpha_1$ AT-bGH Konstrukt zunächst in vitro in Zelllinien transfiziert. Dabei wurde zur Austestung des  $h\alpha_1$ AT-bGH Konstruktes die hepatozelluläre Karzinomzelllinie HepG2 verwendet. Als extrahepatische Zelllinie, in der nur der ubiquitär aktive chicken- $\beta$ -actin Promoter aktiv sein sollte, wurde die humane embryonale Nierenzelllinie 293 verwendet.

Die Zellkultur-Überstände wurden 36 h nach Transfektion geerntet und im Western-Immunoblot analysiert. Als Negativkontrolle dienten Überstände derselben Zelllinien, die mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) transfiziert wurden. Als Positivkontrolle wurde Serum einer bGH-transgenen Maus herangezogen. Da in Zellkulturüberständen kein Aktin nachgewiesen werden kann, diente hier als Ladekontrolle eine unspezifische Reaktion des verwendeten Erstantikörpers mit Serumproteinen.

Das in der Positivkontrolle vorhandene Signal auf der Höhe von 22 kDa zeigt sich in den Überständen der 293 Zellen lediglich bei Transfektion des c $\beta$ a-bGH Konstruktes. Das h $\alpha$ <sub>1</sub>AT-bGH scheint hier nicht aktiv zu sein (siehe Abbildung 11).

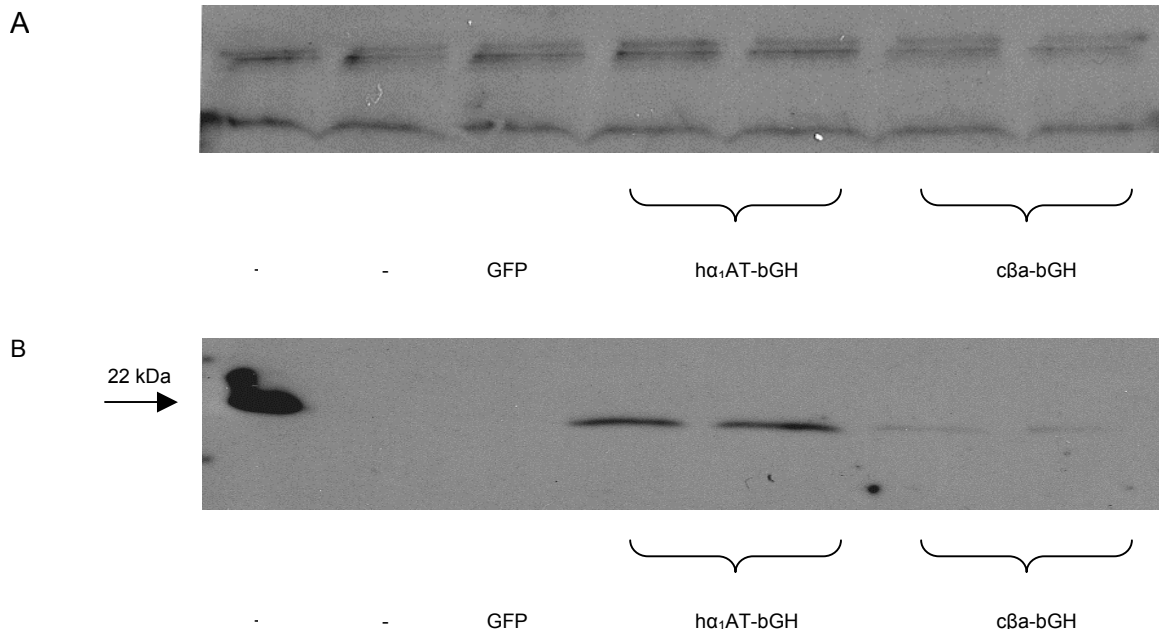
Erwartungsgemäß zeigt sich hingegen in den HepG2 Zellen sowohl ein Signal bei Transfektion des ubiquitär aktiven c $\beta$ a-bGH Konstruktes als auch bei Transfektion des leberspezifischen h $\alpha$ <sub>1</sub>AT-bGH Konstruktes (siehe Abbildung 12).

Soweit in der Zellkultur evaluierbar, zeigte sich also für beide Konstrukte die erwartete Aktivität.



**Abbildung 11: Austestung des h $\alpha$ <sub>1</sub>AT-bGH und des c $\beta$ a-bGH Konstruktes durch transiente Transfektion in die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293.**

(A): Unspezifische Reaktion des Antikörpers als Ladekontrolle; (B): Spezifische bGH Bande auf Höhe der Bande in der Positivkontrolle. + = Positivkontrolle (Serum einer PEPCK-bGH-Maus); - = Negativkontrolle (nicht transfizierte 293 Zellen); GFP = mit einem Expressionskonstrukt für green fluorescent protein (GFP) transfizierte 293 Zellen; h $\alpha$ <sub>1</sub>AT-bGH = mit h $\alpha$ <sub>1</sub>AT-bGH-Konstrukt transfizierte 293 Zellen; c $\beta$ a-bGH = mit c $\beta$ a-bGH-Konstrukt transfizierte 293 Zellen.



**Abbildung 12: Austestung des  $h\alpha_1$ AT-bGH und des  $c\beta a$ -bGH Konstruktes durch transiente Transfektion in der humanen hepatozellulären Karzinomzelllinie HepG2.**

A: Unspezifische Reaktion des Antikörpers als Ladekontrolle; B: Spezifische bGH Bande auf Höhe der Bande in der Positivkontrolle. + = Positivkontrolle (Serum einer PEPCK-bGH-Maus); - = Negativkontrolle (nicht transfizierte 293 Zellen); GFP = mit einem Expressionskonstrukt für green fluorescent protein (GFP) transfizierte 293 Zellen;  $h\alpha_1$ AT-bGH = mit  $h\alpha_1$ AT-bGH-Konstrukt transfizierte HepG2 Zellen;  $c\beta a$ -bGH = mit  $c\beta a$ -bGH-Konstrukt transfizierte HepG2 Zellen.

### 4.3 Ergebnisse der pronukleären Injektion

#### 4.3.1 bGH-Transgen unter Kontrolle des chicken- $\beta$ -actin Promoters

Es wurden 390 befruchtete FVB-Zygoten mit dem chicken- $\beta$ -actin-bGH Konstrukt mikroinjiziert. Die Mikroinjektion überlebten 77 % (299 Zygoten). Diese 299 Embryonen wurden in 12 Transfers in den Eileiter synchronisierter Empfängertiere eingebracht. Drei dieser Empfängertiere zeigten keine Gewichtszunahme. Sie wurden seziiert. Die Sektionen ergaben keinen Anhalt für eine Trächtigkeit. 16,7 % (40 Tiere) der tatsächlich transferierten Embryonen wurden geboren. Davon waren zwei Tiere (5,3 %) transgen.

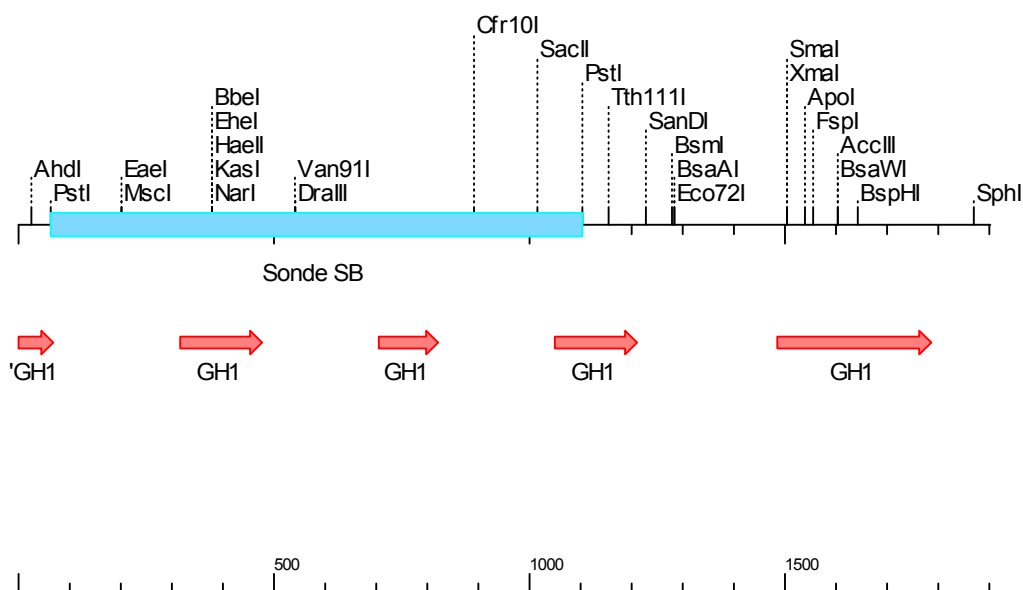
### 4.3.2 bGH-Transgen unter der Kontrolle des humanen $\alpha_1$ -Antitrypsin-Promoters

Es wurden 1119 befruchtete FVB-Zygoten mit dem humanen  $\alpha_1$ -Antitrypsin-bGH Konstrukt mikroiinjiziert. Die Mikroiinjektion überlebten 77 % (882 Zygoten). Diese 882 Embryonen wurden in 37 Transfers in die Eileiter synchronisierter Empfängertiere überführt. Neun dieser Empfängertiere zeigten keine Gewichtszunahme. In der Sektion konnte bei diesen Tieren keine Trächtigkeit festgestellt werden. 20,7 % (123 Tiere) der tatsächlich transferierten Embryonen wurden geboren. Davon war ein Tier transgen und überlebte (entsprechend 0,9 % der geborenen Tiere). Vier transgene Tiere starben sofort nach der Geburt.

### 4.4 Genotypisierung der Tiere

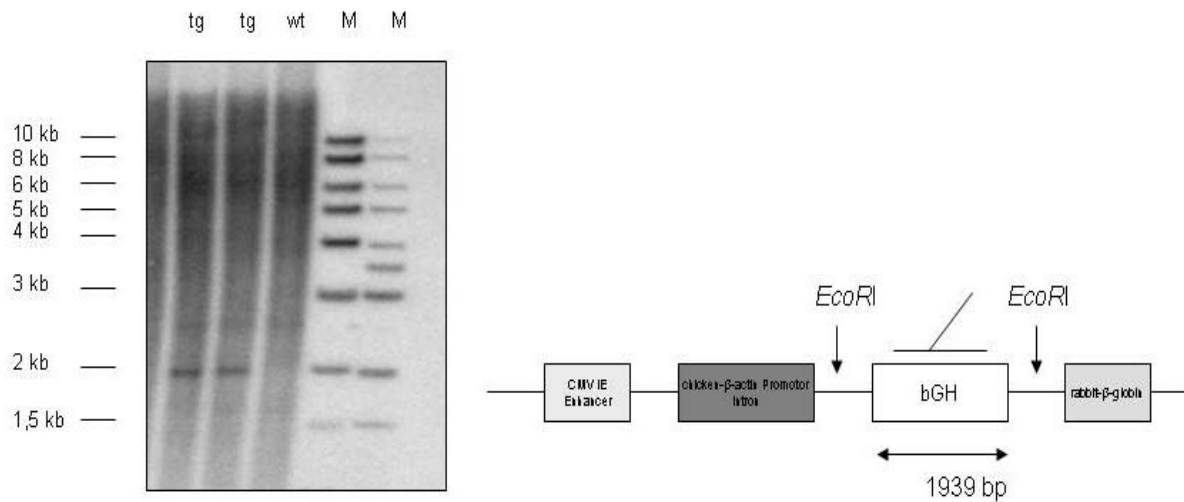
Bei der Herstellung transgener Tiere müssen sowohl die aus der Mikroiinjektion resultierenden Tiere („Foundertiere“) als auch die nachfolgenden Generationen auf die Anwesenheit des Transgens untersucht werden.

Für die Foundertiere wurde zunächst ein Southern Blot durchgeführt, um die Anzahl der integrierten Transgenkopien zu bestimmen. Als Sonde zur Hybridisierung diente für beide Konstrukte eine Sequenz, die im Bereich des bGH Gens hybridisiert. Die 1039 bp lange Sonde wurde durch einen *PstI* Restriktionsverdau aus der bGH Sequenz ausgeschnitten (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13: Schematische Darstellung der Sonde für die Southern Blot Analyse.**

blau = bGH-Sonde; rot = Exons des bGH Gens

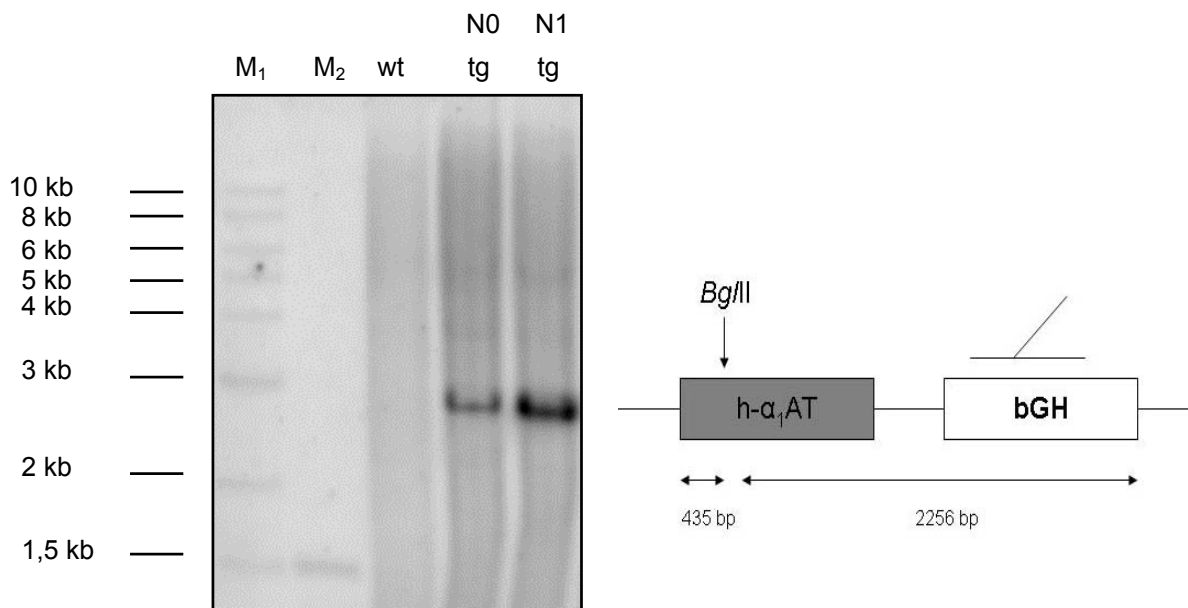


Bei den  $c\beta a$ -bGH Mäusen wurde die genomische DNA mit *EcoRI* verdaut. *EcoRI* schneidet am 3'-Ende und am 5'-Ende des bGH Gens. Die detektierte Bande zeigte die Größe von 1,9 kb, entsprechend der Größe des bGH Gens (Abbildung 14).

**Abbildung 14: Southern Blot der  $c\beta a$ -bGH-transgener Mäuse.**

M<sub>1</sub> = 1 kb Marker (MBI); M<sub>2</sub> = 1 kb Marker (NEB); wt = FVB Wildtypmaus; tg =  $c\beta a$ -bGH-tg Maus

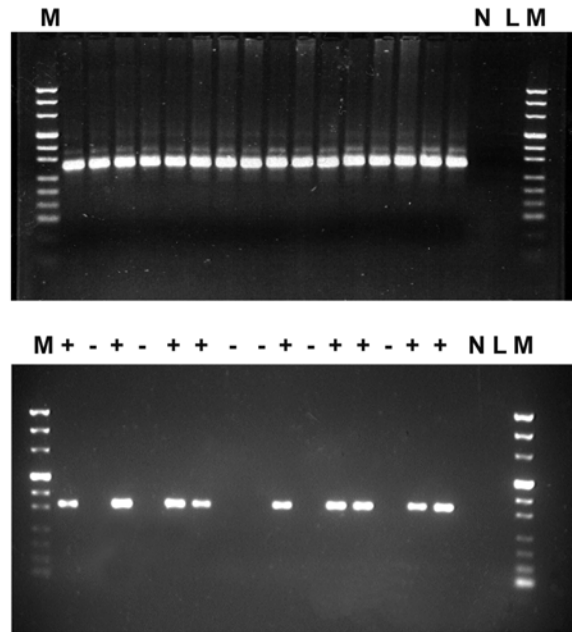
Bei den  $h\alpha_1$ AT-bGH Mäusen wurde die genomische DNA mit der Restriktionsendonuklease *BglII* verdaut. Mittels einer Sonde, die im Bereich des bGH Gens hybridisiert, konnte eine Bande auf der Höhe von 2,7 kb detektiert werden. In der Wildtypmaus-DNA wurde kein Signal detektiert (Abbildung 15).





**Abbildung 15: Southern Blot der  $\alpha_1$ AT-bGH-transgener Mäuse.**

M<sub>1</sub> = 1 kb Marker (MBI); M<sub>2</sub> =  $\lambda$ -DNA *HindIII/EcoRI* Marker (MBI); wt = FVB Wildtypmaus; N0 tg =  $\alpha_1$ AT-bGH Foundertier; N1tg = N1  $\alpha_1$ AT-bGH Maus



Bei allen weiteren Generationen erfolgte die Identifizierung transgener Mäuse aus Schwanzspitzen-DNA im Alter von vier Wochen durch PCR-Analysen (Abbildung 16).

**Abbildung 16: PCR A zur Identifizierung GH-transgener Mäuse.**

(A) Als Kontrolle wurde für jede Probe eine PCR mit GAPDH-spezifischen Primern durchgeführt. M = Marker, pUC8, N = Negativkontrolle (Aqua. bidest), L = Spur ist nicht belegt;

(B) Transgen spezifische PCR Analyse für bGH. M = Marker, pUC8, + = transgen, - = nicht-transgen für das untersuchte Transgen, N = Negativkontrolle (Aqua. bidest), L = Spur ist nicht belegt.

**B**

343 bp  
←

## 4.5 Charakterisierung der transgenen Tiere

### 4.5.1 Vererbungsschema

#### 4.5.1.1 Vererbungsschema der c $\beta$ a-bGH Mäuse

Die Vererbung für das c $\beta$ a-bGH-Transgen ist in Tabelle 16 zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 16: Vererbung des c $\beta$ a-bGH-Transgens.**

Generation	Transgenes Elterntier	Würfe	Nachkommen		
			m (tg)	w (tg)	insg. (tg)
N1	415-10 (w)	1	3 (0)	7 (2)	10 (2)
N2	415-10-6 (w)	1	3 (0)	5 (2)	8 (2)
	415-10-8 (w)	1	1 (0)	1 (0)	2 (0) <sup>1</sup>
N3	415-10-6-4 (w)	1	2 (1)	5 (4)	7 (5)
	415-10-6-6 (w)	1	6 (4)	5 (0)	11 (4)
N4	415-10-6-6-12 (m)	3	9 (4)	12 (4)	21 (8)
	415-10-6-4-3 (w)	1	2 (1)	2 (0)	4 (1) <sup>1</sup>
	415-10-6-6-9 (m)	1	4 (0)	3 (2)	7 (2)
	415-10-6-4-4 (w)	1	1 (1)	1 (0)	2 (1) <sup>1</sup>
	415-10-6-6-8 (m)	1	5 (3)	3 (2)	8 (5)
	415-10-6-6-10 (m)	1	4 (3)	4 (3)	8 (6)
N5	415-10-6-6-9-14 (w)	1	3 (2)	4 (2)	7 (4)
	415-10-6-6-9-16 (w)	1	2 (2)	4 (2)	6 (4)
	415-10-6-4-4-17 (m)	1	4 (2)	6 (2)	10 (4)
	415-10-6-6-10-36 (m)	1	5 (1)	3 (2)	8 (3)
	415-10-6-6-12-28 (m)	2	10 (1)	9 (3)	19 (4) <sup>**</sup>
	415-10-6-6-8-21 (m)	1	5 (3)	1 (0)	6 (3)
	415-10-6-6-12-43 (m)	1	2 (0)	3 (1)	5 (1)
	415-10-6-6-8-23 (m)	1	3 (1)	4 (2)	7 (3)
N6	415-10-6-6-9-14/16-3 (w)	1	2 (1)	5 (3)	7 (4)
	415-10-6-6-8-21-45 (m)	1	3 (3)	2 (1)	5 (4)
	415-10-6-6-12-28-39 (w)	1	1 (0)	4 (4)	5 (4)
	415-10-6-6-10-36-29 (w)	1	3 (0)	6 (3)	9 (3)
	415-10-6-6-10-36-30 (w)	1	2 (0)	3 (1)	5 (1)
	415-10-6-6-10-35-25 (m)	2	6 (3)	6 (3)	12 (6)
	415-10-6-6-12-28-51 (m)	2	4 (2)	6 (2)	10 (4)
	415-10-6-6-8-23-63 (m)	1	5 (3)	3 (1)	8 (4)

<sup>\*\*</sup> p < 0,01

<sup>1</sup>keine statistische Auswertung mit dem Vorzeichentest nach Dixon und Mood aufgrund der geringen Anzahl möglich.

Die Daten wurden mit dem Vorzeichentest von Dixon und Mood (Sachs 1974) auf eine signifikante Abweichung vom erwarteten Anteil (50 %) transgener Nachkommen überprüft. Zwei der Tiere konnten statistisch nicht mit dem Vorzeichentest von Dixon und Mood überprüft werden, da der Test eine Mindestanzahl von  $n = 5$  erfordert. Eine Maus, Maus Nr. 415-10-6-6-12-28, ein männliches Tier lag außerhalb des Grenzbereiches.

#### 4.5.1.2 Vererbungsschema der $h\alpha_1$ AT-bGH Mäuse

Die Vererbung für das  $h\alpha_1$ AT-bGH-Transgen ist in Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 17: Vererbung des  $h\alpha_1$ AT-bGH-Transgens.**

Generation	Transgenes Elterntier	Würfe	Nachkommen		
			M (tg)	w (tg)	insg. (tg)
N1	819-64 (m)	2	9 (1)	9 (1)	18 (2) **
N2	819-64-5 (m)	1	5 (1)	3 (0)	8 (1)
	819-64-6 (w)	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)

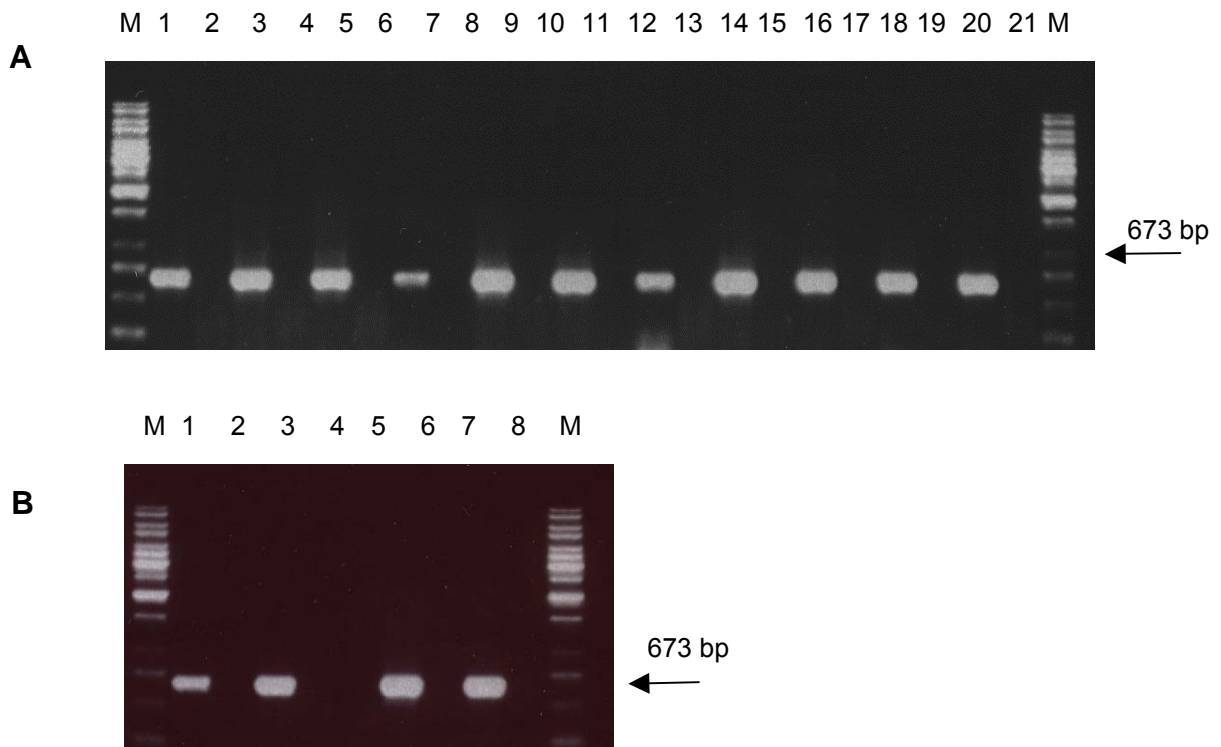
\*\*  $p < 0,01$

Die Daten wurden mit dem Vorzeichentest von Dixon und Mood (Sachs 1974) auf eine signifikante Abweichung vom erwarteten Anteil (50 %) transgener Nachkommen überprüft. Der Founder vererbt sein Transgen nicht mit den erwarteten 50 % an seine Nachkommen weiter. Auch die Tiere aus der F1 Generation zeigen nicht das erwartete Muster. Das Weibchen (819-64-6) bekam keine Nachkommen.

## 4.5.2 RT-PCR

### 4.5.2.1 c $\beta$ a-bGH Mäuse

Bei der RT-PCR Untersuchung der Organe wurde die mRNA Expression des bGH Gens nachgewiesen. Als Kontrolle diente isolierte mRNA der Organe von nicht-transgenen Geschwistertieren (Wildtypen). In allen untersuchten Organen (Leber, Niere, Milz, Pankreas, M. quadriceps, Magen, Lunge, Herz, Nebenniere, Dünndarm, Dickdarm, Auge, Ovar (bei weiblichen Tieren), ZNS und abdominales Fettgewebe) der c $\beta$ a-bGH Mäuse konnte eine Expression des bGH-Gens nachgewiesen werden. Bei den Wildtypen wurde keine Amplifikation des Transgens festgestellt.



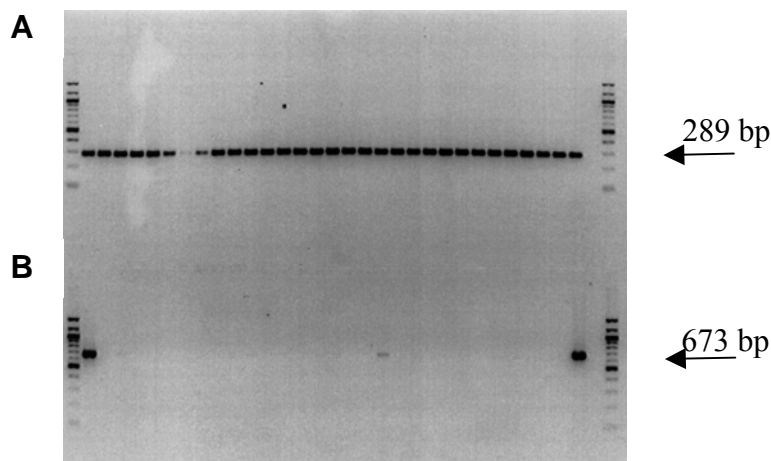
**Abbildung 17: RT PCR-Analyse der c $\beta$ a-bGH Mäuse in verschiedenen Organen.**

(A) M = 1 kb Marker (NEB); 1 = Leber tg; 2 = Leber wt; 3 = Niere tg; 4 = Niere wt; 5 = Milz tg; 6 = Milz wt; 7 = Pankreas tg; 8 = Pankreas wt; 9 = M. quadriceps tg; 10 = M. quadriceps wt; 11 = Magen tg; 12 = Magen wt; 13 = Lunge tg; 14 = Lunge wt; 15 = Herz tg; 16 = Herz wt; 17 = Nebenniere tg; 18 = Nebenniere wt; 19 = Dünndarm tg; 20 = Dünndarm wt; 21 = Dickdarm tg; 22 = Dickdarm wt.

(B) M = 1 kb Marker (NEB), 1 = Auge tg, 2 = Auge wt; 3 = Ovar tg; 4 = Ovar wt; 5 = ZNS wt; 6 = ZNS tg; 7 = abdominales Fettgewebe wt; 8 = abdominales Fettgewebe tg; 9 = Aqua bidest..

#### 4.5.2.2 $\alpha_1$ AT-bGH Mäuse

Die RT-PCR Analyse des  $\alpha_1$ AT-bGH Foundertieres zeigte das erwartete Expressionsmuster von bGH in dem untersuchten Organspektrum. In der Leber konnte eine sehr hohe Expression (+++) und im Magen eine geringere Expression (++) nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle der PCR diente die cDNA des Magens einer  $\alpha$ -bGH Maus. Bei den Wildtypen wurde keine Amplifikation des Transgens festgestellt. Als Kontrolle der cDNA diente die Amplifikation des housekeeping-Gens GAPDH.



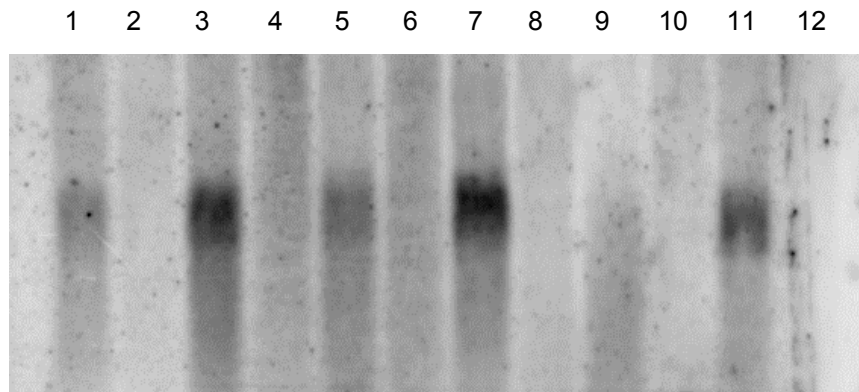
**Abbildung 18: RT PCR-Analyse der  $\alpha$ AT-bGH Maus aus Organen.**

(A) GAPDH PCR: 1 = 1 kb Marker (NEB); 2 = Leber tg; 3 = Leber wt; 4 = Niere tg; 5 = Niere wt; 6 = Nebenniere tg; 7 = Nebenniere wt; 8 = Pankreas tg; 9 = Pankreas wt; 10 = Milz tg; 11 = Milz wt; 12 = Dünndarm tg; 13 = Dünndarm wt; 14 = Dickdarm tg; 15 = Dickdarm wt; 16 = M. quadriceps tg; 17 = M. quadriceps wt; 18 = Hoden tg; 19 = Hoden wt; 20 = Magen tg; 21 = Magen wt; 22 = Lunge tg; 23 = Lunge wt; 24 = Herz tg; 25 = Herz wt; 26 = ZNS tg; 27 = ZNS wt; 28 = Auge tg; 29 = Auge wt; 30 = Gl. mandibularis tg; 31 = Gl. mandibularis wt; 32 = Positivkontrolle; 33 = Negativkontrolle (Aqua bidest.); 34 = 1 kb Marker (NEB)

(B) bGH PCR: 1 = 1 kb Marker (NEB); 2 = Leber tg; 3 = Leber wt; 4 = Niere tg; 5 = Niere wt; 6 = Nebenniere tg; 7 = Nebenniere wt; 8 = Pankreas tg; 9 = Pankreas wt; 10 = Milz tg; 11 = Milz wt; 12 = Dünndarm tg; 13 = Dünndarm wt; 14 = Dickdarm tg; 15 = Dickdarm wt; 16 = M. quadriceps tg; 17 = M. quadriceps wt; 18 = Hoden tg; 19 = Hoden wt; 20 = Magen tg; 21 = Magen wt; 22 = Lunge tg; 23 = Lunge wt; 24 = Herz tg; 25 = Herz wt; 26 = ZNS tg; 27 = ZNS wt; 28 = Auge tg; 29 = Auge wt; 30 = Gl. mandibularis tg; 31 = Gl. mandibularis wt; 32 = Positivkontrolle; 33 = Negativkontrolle (Aqua bidest.); 34 = 1 kb Marker (NEB)

### 4.5.3 Northern Blot

In der Northern Blot-Analyse wurden ausgewählte Organe (Leber, Niere, Milz, Lunge, Herz, M. quadriceps) auf die Expression von bGH-mRNA überprüft. Das stärkste Expressionsniveau wurde in der Niere und Lunge festgestellt, gefolgt von Milz und Muskel. In der Leber zeigte sich nur eine sehr schwache Expression des Transgens. Die RNA der Herzproben, sowohl bei der transgenen Probe als auch bei der Wildtypprobe, ist degradiert.



**Abbildung 19: Northern Blot-Analyse der bGH-mRNA Expression ausgewählter Organe.**

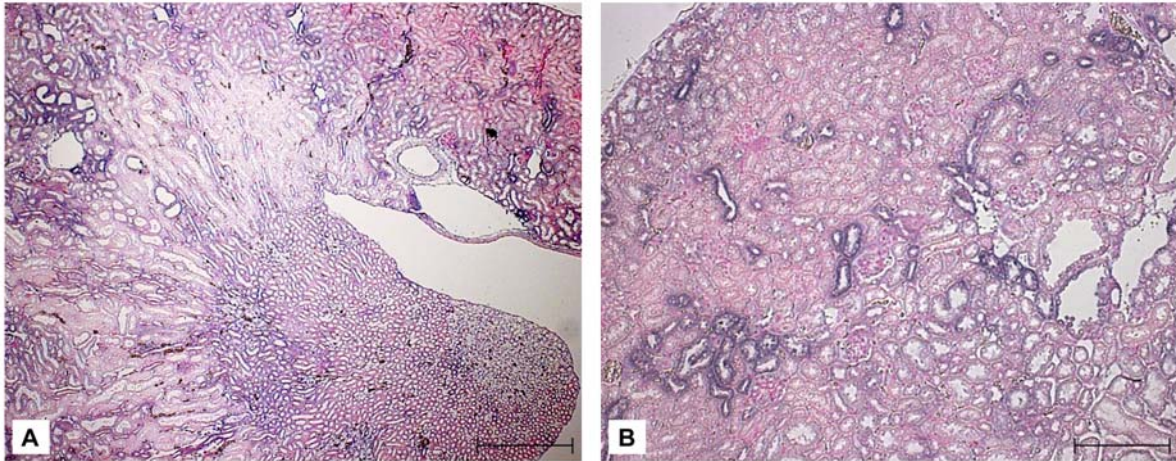
1 = Leber tg; 2 = Leber wt; 3 = Niere tg; 4 = Niere wt, 5 = Milz tg, 6 = Milz wt, 7 = Lunge tg, 8 = Lunge wt, 9 = Herz tg; 10 = Herz wt; 11 = M. quadriceps tg, 12 = M. quadriceps wt

### 4.5.4 *In situ* Hybridisierung

#### 4.5.4.1 *In situ* Hybridisierung ohne ‚Tyramide signal amplification‘ (TSA)

*In situ* Hybridisierungen ohne TSA wurden in Nierenschnitten von 65 Tage alten c $\beta$ a-bGH-Mäusen durchgeführt. In allen untersuchten Nierenpräparaten konnte bGH-mRNA im Zytoplasma der Epithelzellen proximaler und distaler Tubulusabschnitte sowie in den Sammelrohrepithelien der transgenen Tiere nachgewiesen werden. Das Signal war in einigen der oben genannten Abschnitte, aber nicht in allen angeschnittenen Abschnitten zu detektieren. In den Glomerula konnte kein mRNA Signal für bGH mRNA detektiert werden.

Als Negativkontrolle diente zum einen die Hybridisierung mit einer Sonde in ‚sense‘-Orientierung, die nicht mit der mRNA hybridisieren kann, auf Schnitten transgener Tiere und zum anderen die Hybridisierung der ‚antisense‘-Sonde mit einem Wildtyp Präparat. In beiden Fällen konnte kein Signal detektiert werden.



**Abbildung 20: *In situ* Hybridisierung ohne TSA spezifisch für bGH-mRNA.**

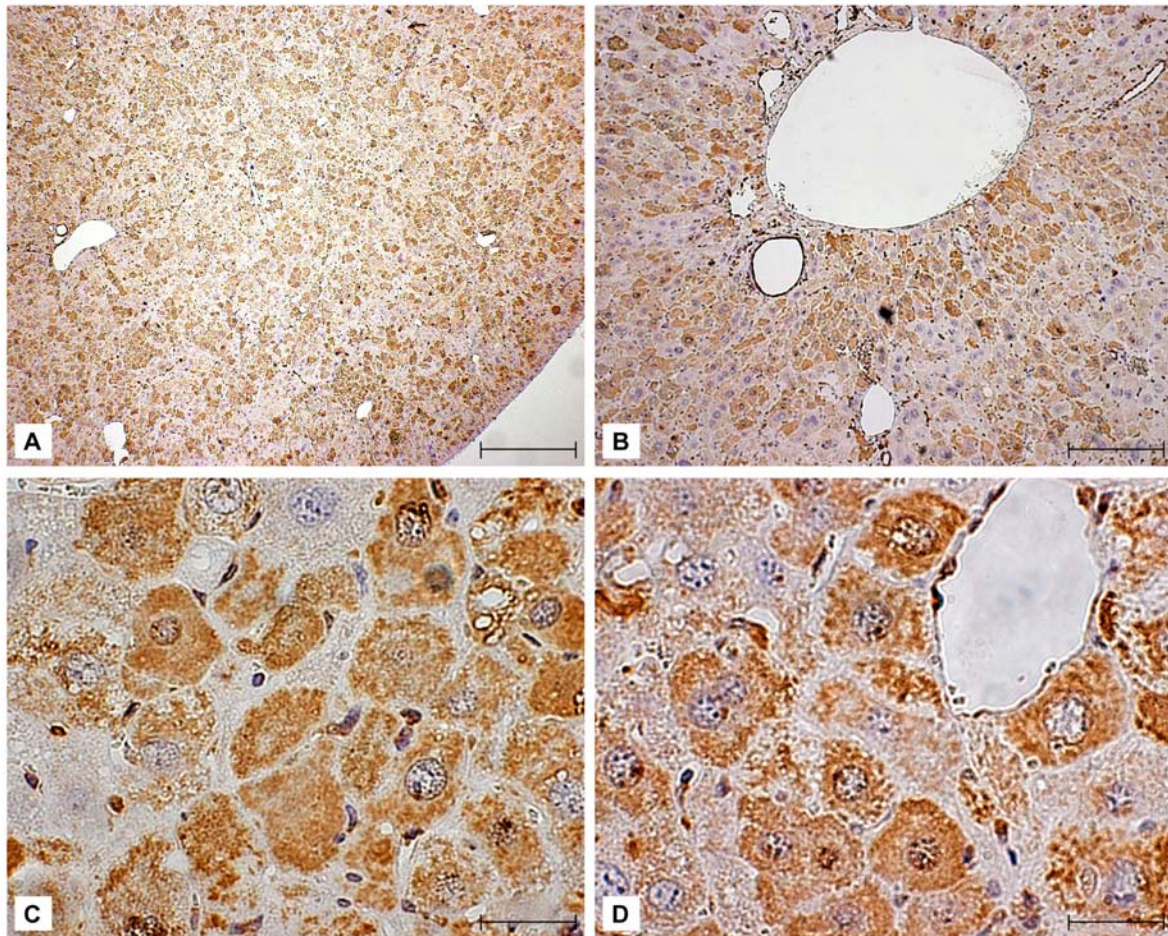
(A) Übersicht über die Niere einer  $c\beta a$ -bGH-transgenen Maus (Alter 65 d): Nierenmark mit Nierenpapille (B) Ausschnitt des renalen Kortex. Der Nachweis der antikörpergekoppelten alkalischen Phosphataseaktivität erfolgte durch eine chromogene Reaktion mit Bildung eines violetten Reaktionsprodukts. Die Gegenfärbung erfolgte mit Kernechtrot. (A) Balken entspricht 500  $\mu\text{m}$  (B) Balken entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

#### **4.5.4.2 *In situ* Hybridisierung mit ‚Tyramide signal amplification‘ (TSA)**

Die *in situ* Hybridisierungen mit TSA wurden von der Leber bei 65 Tagen alten  $c\beta a$ -bGH-transgenen Tieren und bei dem 117 Tage alten Founder ( $c\beta a$ -bGH) durchgeführt.

In allen untersuchten Präparaten der transgenen Tiere zeigte sich ausschließlich im Zytoplasma der Hepatozyten ein Signal bei Hybridisierung der antisense bGH Sonde. Das Signal war ohne ein erkennbares Muster panlobulär über die ganze Leber verteilt. Als Negativkontrolle diente zu jedem antisense hybridisierten Schnitt die Hybridisierung mit einer sense Sonde auf dem Transgenpräparat. Hier konnte kein Signal detektiert werden.





**Abbildung 21: *In situ* Hybridisierung mit TSA für bGH-mRNA.**

(A) Übersichtsaufnahme der Leber einer  $c\beta a$ -bGH-transgenen Maus (Alter:16 Wochen) (B) Ausschnitt mit Zentralvene (C), (D) Detailvergrößerung der Hepatozyten. Die bGH-mRNA kommt hier als braunes Reaktionsprodukt zur Darstellung. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hematoxylin. (A) Balken entspricht 500  $\mu\text{m}$  (B) Balken entspricht 200  $\mu\text{m}$  (C), (D) Balken entspricht 500  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5.5 Westernblotanalyse

##### 4.5.5.1 Nachweis von bGH im Serum $c\beta a$ -bGH-transgener Mäuse

In der Western-Immunoblotanalyse wurden Serumproben aller zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Generationen (N0-N5) auf Anwesenheit des bovinen Wachstumshormons überprüft. Es konnte im Serum aller Generationen mit dem polyklonalen Antikörper gegen bGH ein Protein mit einem Molekulargewicht von 22 kDa, das dem Molekulargewicht des bovinen Wachstumshormons entspricht, detektiert werden. Im Serum einer Wildtypmaus, die in der PCR als nicht-transgene Maus identifiziert wurde, wurde auf dieser Höhe kein Signal detektiert.



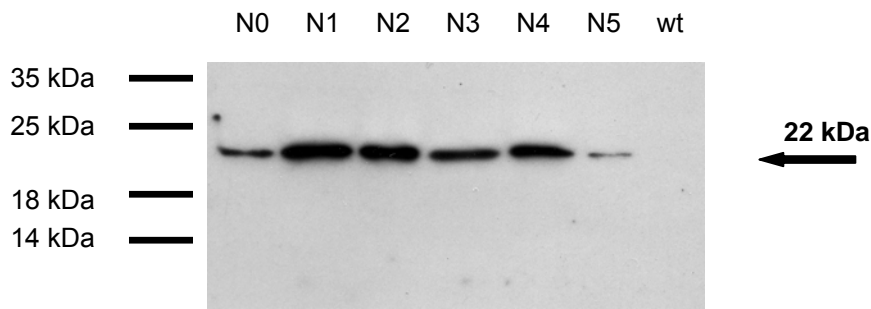


Abbildung 22: Bestimmung von bGH im Serum verschiedener Generationen (N0-N5).

#### 4.5.5.2 Nachweis von bGH im Gewebe der c $\beta$ -bGH-transgenen Tiere

Die festgestellte ubiquitäre Expression des Transgens auf RNA-Ebene spiegelt sich auch auf Proteinebene wider. Zur Analyse der Expression des bGH-Proteins in den Organen der c $\beta$ -bGH-Mäuse wurden Proteinextrakte aus den einzelnen Organen hergestellt. Die Western-Immunoblot-Analysen wurden mit einem polyklonalen Antikörper (chicken-anti-bGH) durchgeführt. Es konnte auf der Höhe von 22 kDa in allen untersuchten Organen bei den transgenen Tieren eine Bande nachgewiesen werden. Diese Bande ist nicht nachweisbar bei den nicht-transgenen Tieren und würde sich auf Höhe der im Serum beobachteten bGH-Bande befinden.

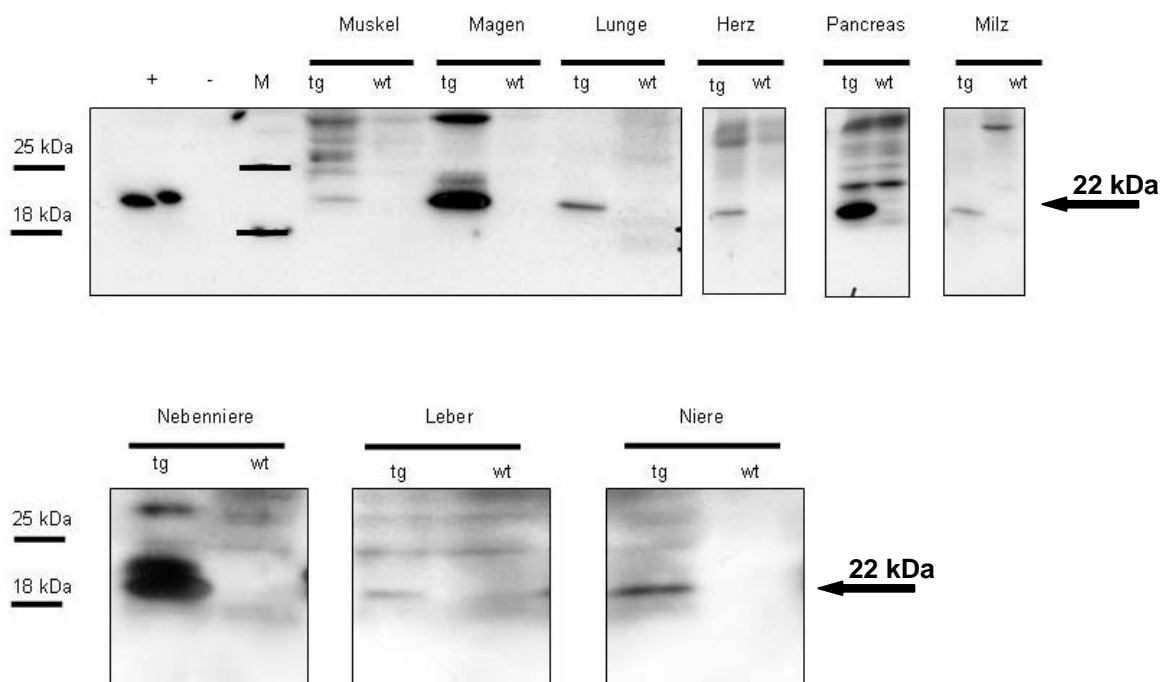
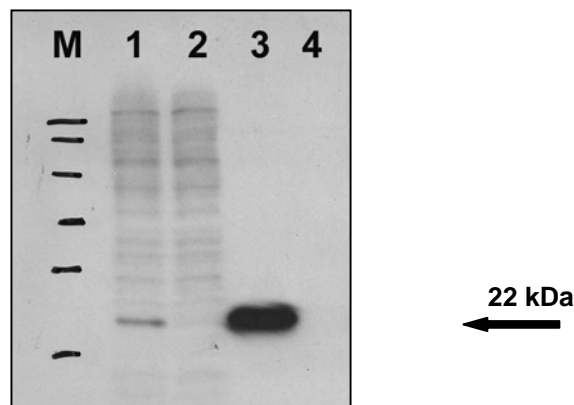


Abbildung 23: Western Immunoblotanalyse an Organen einer c $\beta$ -bGH-transgenen Maus.

In einigen Organen konnten zusätzlich zu der 22 kDa Bande noch einige Banden mit einem größerem Molekulargewicht detektiert werden. Bei einem Teil dieser Banden könnte es sich um unprozessierte oder fehlerhaft glykosylierte Formen des bGH handeln, die in Organen akkumulieren, die keine adäquate Sekretion des bGH erlauben.

Als weitere Erklärung für das Auftreten dieser Banden in den Proteinextrakten aus den Organen könnte das geringere Expressionsniveau in den Organen im Vergleich zum Serum (in der Western-Immunoblotanalyse der Organe als Positivkontrolle verwendet) angeführt werden. Dadurch würde das Verhältnis von Signal (d.h. die Menge des vorhandenen bGH) zu Rauschen (d.h. die Gesamtmenge der Proteine) verringert werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die Zelllysate und Zellkulturüberstände von transient transfizierten 293 Zellen im Western-Immunoblot auf bGH untersucht. In der Tat zeigten sich hier im Vergleich mit den Zelllysaten in den Zellkulturüberständen wesentlich höhere bGH-Spiegel, was dazu führt, dass zum Erreichen ähnlich intensiver Signale längere Filmexpositionen notwendig wurden, wobei dann zusätzliche unspezifische Banden auftraten.



**Abbildung 24: bGH in transfizierten Zellen.**

M: Marker; 1 = Proteinlysate aus bGH transfizierten 293-Zellen, 2 = Proteinlysate aus pCDNA3 transfizierten 293-Zellen, 3 = Proteinlysate aus Zellkulturüberständen aus bGH transfizierten 293-Zellen, 4 = Proteinlysate aus Zellkulturüberständen aus pCDNA3 transfizierten 293-Zellen

#### 4.5.6 bGH-Konzentration im Serum

Bei 39 c $\beta$ a-bGH-Mäusen wurde im ELISA die Serumkonzentration des bovinen Wachstumshormons bestimmt. Die Blutproben wurden jeweils aus dem retrobulbären Plexus vor der Sektion gewonnen.

In der Abbildung 25 ist die bGH-Konzentration in den Seren von 39 Tieren gegen das Alter zum Zeitpunkt der Blutentnahme aufgetragen. Bei den nicht-transgenen Kontrolltieren konnte im ELISA kein bovines Wachstumshormon detektiert werden.

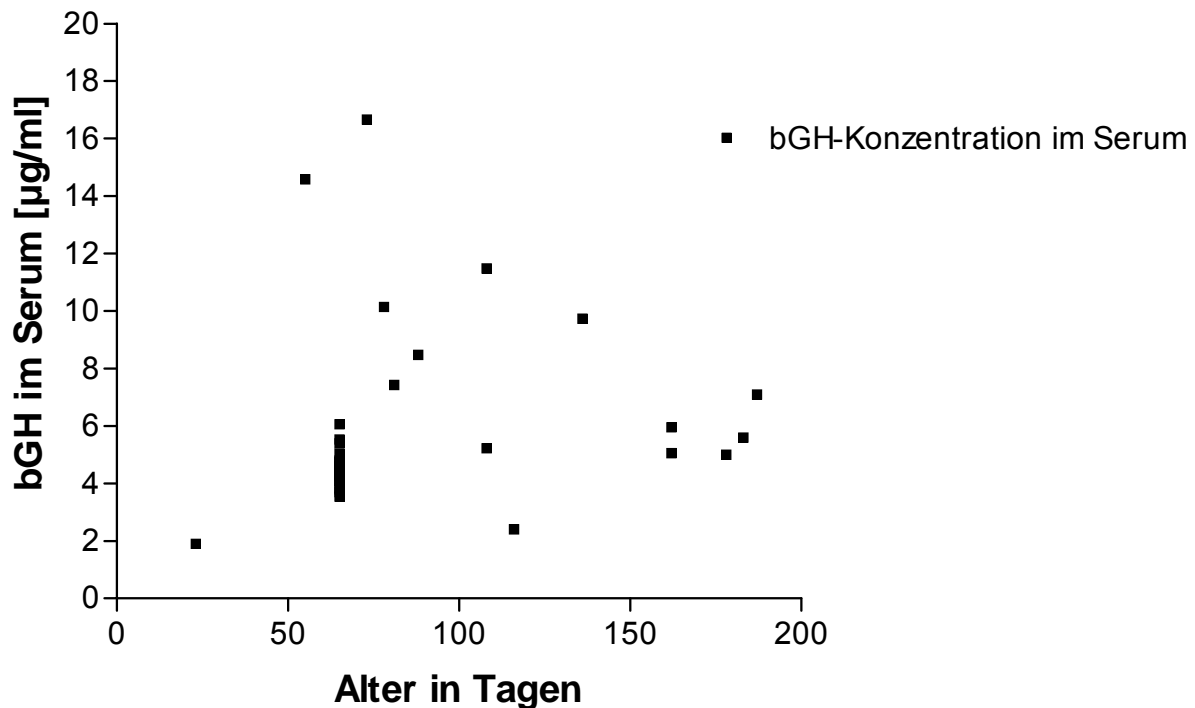


Abbildung 25: bGH-Konzentration im Serum c $\beta$ a-bGH-transgener Mäuse.

Die erhobenen Werte bewegen sich zwischen 1,9  $\mu\text{g/ml}$  und 16,7  $\mu\text{g/ml}$ . Im Alter von 65 Tagen zeigten die Tiere eine bGH-Konzentration von  $4,5 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$  im Serum. Zwischen den Geschlechtern ließ sich am Tag 65 kein Unterschied detektieren (männliche Tiere:  $4,5 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$ , weibliche Tiere:  $4,5 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$ ). Ein Tier zeigte am Tag 55 eine ungewöhnlich hohe Konzentration des Wachstumshormons von 14,55  $\mu\text{g/ml}$ .

Bei älteren Tieren zeigte sich ein zunehmend heterogenes Bild der Serumkonzentration. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Alter und der bGH-Konzentration im Serum war nicht zu erkennen.

#### 4.5.7 Klinisch-chemische Parameter

Die Serumproben der c $\beta$ a-bGH-transgenen Tiere wurden klinisch-chemisch analysiert. Die Tiere wurden in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt. Zur ersten Gruppe zählten zehn männliche und zwölf weibliche transgene Tiere ohne klinische Symptome einer Erkrankung am 65. Lebenstag sowie zwei männliche und fünf weibliche nicht-transgene Geschwistertiere. In der zweiten Gruppe wurden zwölf transgene und zwölf nicht-transgene

Tiere mit klinischen Symptomen analysiert. Die Ergebnisse der Varianzanalyse der klinisch-chemischen Befunde im Serum sind in Tabelle 18 (Befunde der ersten Gruppe) und Tabelle 19 (Befunde der zweiten Gruppe) zusammengefaßt.

Tabelle 18: Klinisch chemische Befunde im Serum von c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäusen, Alter 65d.

Klinisch chemische Befunde im Serum von c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäusen, Alter 65d							
Parameter	Sex	WT		tg		Vergleich der Gruppen	
		LSM	SE	LSM	SE	tg:wt	tg m:tg w
Natrium [mmol/l]	m	154,0	(1,8)	150,6	(0,8)	-	-
	w	152,0	(1,1)	149,3	(0,7)	-	
Kalium [mmol/l]	m	4,2	(1,1)	6,7	(0,5)	-	-
	w	4,6	(0,7)	5,9	(0,5)	-	
Kalzium [mmol/l]	m	2,1	(0,1)	2,6	(0,1)	***	-
	w	2,1	(0,1)	2,7	(0,05)	***	
Chlorid [mmol/l]	m	110,0	(1,5)	109,3	(0,7)	-	*
	w	110,4	(0,9)	107,0	(0,6)	**	
Phosphat [mmol/l]	m	2,4	(0,4)	3,2	(0,2)	*	-
	w	2,5	(0,2)	3,2	(0,1)	-	
Total Protein [g/l]	m	5,5	(0,4)	6,1	(0,2)	-	-
	w	5,3	(0,2)	6,1	(0,2)	**	
Kreatinin [mg/dl]	m	0,3	(0,02)	0,4	(0,008)	-	-
	w	0,3	(0,01)	0,4	(0,007)	**	
Harnstoff [mg/dl]	m	52,2	(11,2)	51,4	(5,0)	-	-
	w	49,5	(7,1)	51,6	(4,6)	-	
Harnsäure [mg/dl]	m	1,7	(0,7)	0,9	(0,3)	-	-
	w	0,5	(0,4)	0,3	(0,3)	-	
Cholesterin [mg/dl]	m	188,7	(11,5)	116,8	(5,1)	***	*
	w	142,0	(7,3)	132,2	(4,7)	-	
Triglyzeride [mg/dl]	m	222,2	(32,1)	172,5	(14,3)	-	-
	w	258,2	(20,3)	141,5	(13,1)	***	
Kreatinkinase [IU/l]	m	103,0	(294,2)	384,4	(131,6)	-	-
	w	416,0	(186,1)	132,8	(120,1)	-	
ALT [IU/l]	m	27,0	(10,5)	51,8	(4,7)	*	-
	w	20,4	(6,6)	51,3	(4,2)	***	
AST [IU/l]	m	29,0	(10,0)	49,8	(4,5)	-	-
	w	45,2	(6,4)	46,3	(4,1)	-	
AP [IU/l]	m	103,0	(6,6)	37,8	(3,0)	***	-
	w	119,2	(4,2)	43,7	(2,7)	***	
Amylase [IU/l]	m	3735,0	(534,5)	6249,0	(239,0)	***	-
	w	3528,8	(338,1)	6606,0	(218,2)	***	
Glucose [mg/dl]	m	196,4	(38,6)	267,9	(17,3)	-	*
	w	142,0	(24,4)	218,8	(15,8)	*	
Ferritin [ $\mu$ g/l]	m	56,4	(15,0)	85,2	(6,7)	-	-
	w	107,3	(9,5)	87,2	(6,1)	-	
Transferritin [ $\mu$ g/dl]	m	141,8	(13,6)	221,4	(6,1)	***	-
	w	141,5	(8,6)	205,2	(5,8)	***	
Lipase [IU/l]	m	68,7	(26,0)	87,7	(11,6)	-	-
	w	64,1	(16,4)	62,5	(10,6)	-	
CRP [mg/l]	m	6,2	(1,2)	12,1	(0,5)	***	-
	w	5,0	(0,7)	11,1	(0,5)	***	

\* p &lt; 0,05; \*\* p &lt; 0,01; \*\*\* p &lt; 0,001

Das Blutbild der 65 Tage alten Tiere lässt Hinweise auf eine Hepatopathie und Nephropathie erkennen. Die ALT und der Kreatininwert zeigten eine geringgradige Erhöhung, die weiteren untersuchten Parameter wiesen keine Veränderungen im Vergleich zu den nicht-transgenen Geschwistertieren auf.

Tabelle 19: Klinisch chemische Befunde im Serum von c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäusen, Alter > 65 d.

Klinisch chemische Befunde im Serum von c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäusen, Alter > 65 d							
Parameter	Sex	WT		tg		Vergleich der Gruppen	
		LSM	SE	LSM	SE	tg:wt	tg m:tg w
Natrium [mmol/l]	m	152,8	(5,5)	148,5	(4,1)	-	-
	w	154,0	(5,8)	155,5	(2,9)	-	
Kalium [mmol/l]	m	4,2	(1,1)	9,4	(1,5)	-	-
	w	4,2	(2,1)	7,1	(1,1)	-	
Kalzium [mmol/l]	m	2,2	(0,2)	2,0	(0,2)	-	-
	w	2,2	(0,1)	2,3	(0,1)	-	
Chlorid [mmol/l]	m	110,0	(1,5)	106,7	(4,5)	-	-
	w	114,0	(6,9)	106,8	(3,5)	-	
Phosphat [mmol/l]	m	3,1	(0,7)	4,1	(0,7)	-	-
	w	2,6	(0,4)	5,6	(0,4)	***	
Total Protein [g/l]	m	5,3	(0,5)	4,6	(0,4)	-	-
	w	5,3	(0,3)	4,9	(0,3)	-	
Kreatinin [mg/dl]	m	0,3	(0,1)	0,6	(0,1)	-	*
	w	0,4	(0,1)	1,0	(0,1)	***	
Harnstoff [mg/dl]	m	45,5	(74,5)	357,6	(64,5)	**	-
	w	44,0	(43,0)	321,2	(45,6)	***	
Harnsäure [mg/dl]	m	0,9	(0,7)	1,1	(0,6)	-	-
	w	0,6	(0,4)	1,1	(0,4)	-	
Cholesterin [mg/dl]	m	198,5	(28,8)	61,4	(24,9)	**	*
	w	159,0	(16,6)	137,6	(17,6)	-	
Triglyzeride [mg/dl]	m	321,6	(60,6)	84,6	(52,4)	**	-
	w	249,4	(35,0)	140,2	(37,1)	*	
Kreatinkinase [IU/l]	m	198,0	(1164,8)	301,5	(1008,7)	-	-
	w	173,3	(672,5)	1547,3	(713,3)	-	
ALT [IU/l]	m	12,7	(20,7)	42,0	(17,9)	-	-
	w	22,4	(11,9)	75,3	(12,7)	**	
AST [IU/l]	m	32,0	(22,9)	75,5	(19,8)	-	*
	w	39,3	(13,2)	121,5	(14,0)	***	
AP [IU/l]	m	78,0	(31,3)	39,0	(27,6)	-	-
	w	99,3	(18,1)	81,5	(19,2)	-	
Amylase [IU/l]	m	3962,0	(1441,5)	9217,0	(1248,4)	*	*
	w	3950,0	(832,2)	13405,5	(882,7)	***	
Glucose [mg/dl]	m	196,4	(29,0)	184,6	(20,5)	-	-
	w	165,1	(15,5)	158,9	(14,5)	-	
Ferritin [ $\mu$ g/l]	m	86,9	(63,5)	160,0	(55,0)	-	-
	w	94,0	(36,7)	248,9	(38,9)	**	
Transferritin [ $\mu$ g/dl]	m	149,1	(17,4)	129,3	(17,4)	-	-
	w	143,6	(10,0)	170,8	(10,6)	-	
Lipase [IU/l]	m	80,3	(23,3)	131,1	(20,1)	-	-
	w	77,4	(13,4)	137,4	(14,3)	**	
CRP [mg/l]	m	2,7	(1,7)	9,2	(1,5)	**	-
	w	3,1	(1,0)	8,4	(1,0)	**	

\* p &lt; 0,05; \*\* p &lt; 0,01; \*\*\* p &lt; 0,001

In der zweiten Gruppe (> 65 Tage, klinisch auffällig) läßt sich anhand der Serumparameter eine deutliche Progression von Nephropathie und Hepathopathie erkennen. Die transgenen Tiere zeigten gegenüber den Kontrollmäusen erhöhte Kreatinin-, Harnstoff- und Harnsäurespiegel. Bei den Leberwerten war sowohl die ALT als auch die AST erhöht. Bei den untersuchten Serum-Elektrolytkonzentrationen war nur der Kaliumspiegel der transgenen Tiere gegenüber der Konrollgruppe erhöht. Die in Einzelfällen exorbitant erhöhten Spiegel von Kreatinkinase und Amylase/Lipase sind wohl am ehesten in das Bild einer terminalen Erkrankung einzuordnen. Amylase und Lipase können im Rahmen einer progressiven Nephropathie erhöht werden. Eine begleitende Pankreatitis oder Myopathie kann jedoch im Einzelfall nicht ausgeschlossen werden.

#### **4.5.8 Lebenserwartung**

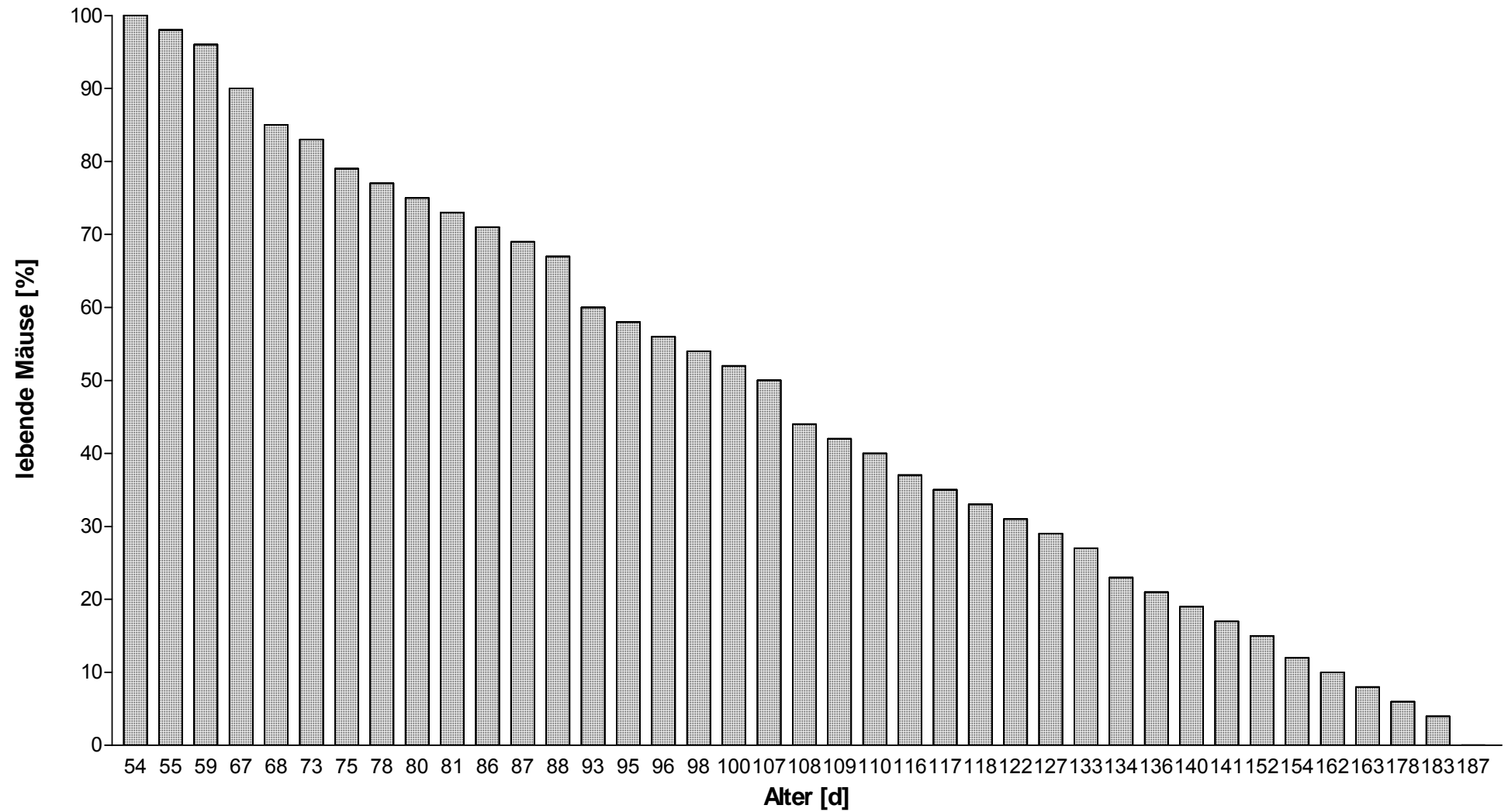
Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäuse zeigten gegenüber nicht-transgenen Kontrolltieren, die durchwegs älter als ein Jahr wurden, eine deutlich verringerte Lebensdauer. Die meisten Tiere mussten aufgrund schwerer klinischer Symptomatik euthanasiert werden oder starben. Transgene Tiere, die ohne klinische Anzeichen seziert wurden, sind in dieser Statistik nicht berücksichtigt.

Die mittlere Lebensspanne der c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäuse betrug  $110 \pm 5$  Tage (n = 48). Die Lebensdauer der weiblichen c $\beta$ a-bGH-transgenen Maus lag bei  $123 \pm 8$  Tage (n = 24), die der männlichen Mäuse bei  $97 \pm 6$  Tage (n = 24). 50 % der Mäusepopulation lebten bis zum 107. Lebenstag.

Die Abbildung 26 zeigt die prozentualen Anteile der noch lebenden transgenen Mäuse am jeweiligen Lebenstag.



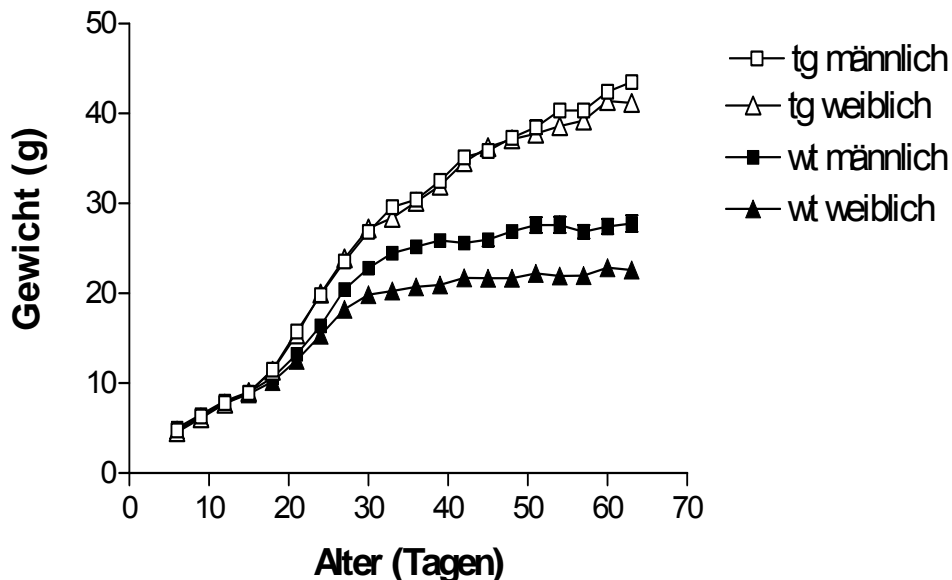
Abbildung 26: Lebenserwartung von c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäusen.



### 4.5.9 Körpergewichtsentwicklung

Zur Beurteilung der Gewichtsentwicklung wurden 14 männliche, 14 weibliche transgene Mäuse sowie 11 männliche und 13 weibliche Wildtyp-Mäuse zwischen dem 5. Lebenstag und 55. Lebenstag täglich auf 0,1 Gramm genau zwischen 10 und 12 Uhr gewogen. Ab dem 55. Lebenstag bis zum Alter von 65 Tagen wurden die Tiere zweimal pro Woche gewogen. Um die durchschnittliche Gewichtsentwicklung der einzelnen Gruppen besser vergleichen zu können, wurden die Werte statistisch linear interpoliert, indem ein Gewichtswert für jeden dritten Tag errechnet wurde.

Die Gewichtsentwicklung der c $\beta$ a-bGH-transgenen Tiere im Vergleich zu ihren nicht-transgenen Geschwistertieren (wt) ist in Abbildung 27 dargestellt.



\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Abbildung 27: Gewichtsentwicklung der c $\beta$ a-bGH Mäuse.

Die Gewichtsentwicklung lässt sich folgendermaßen charakterisieren:

- Ab dem Alter von 18 Tagen ist der Gewichtsunterschied zwischen den männlichen tg und den wt signifikant (\*) und ab Tag 21 hochsignifikant (\*\*\*)).
- Ab dem Alter von 18 Tagen ist der Gewichtsunterschied zwischen den weiblichen tg und den wt signifikant (\*\*) und ab Tag 21 hochsignifikant (\*\*\*)).
- Die Gewichtsentwicklung im Vergleich zu den Kontrollgruppen nimmt signifikant im Alter von 3 Wochen zu.

- Die Wachstumskurven der Kontrollgruppe zeigen einen Geschlechtsdimorphismus ab dem Tag 24 (\*) und ab dem Tag 27 (\*\*\*)
- Die Wachstumskurven der transgenen Tiere zeigen keinen Geschlechtsdimorphismus. Die mittleren Gewichte sind zu keinem Zeitpunkt zwischen den Geschlechtern signifikant verschieden.

#### **4.5.10 Organometrie**

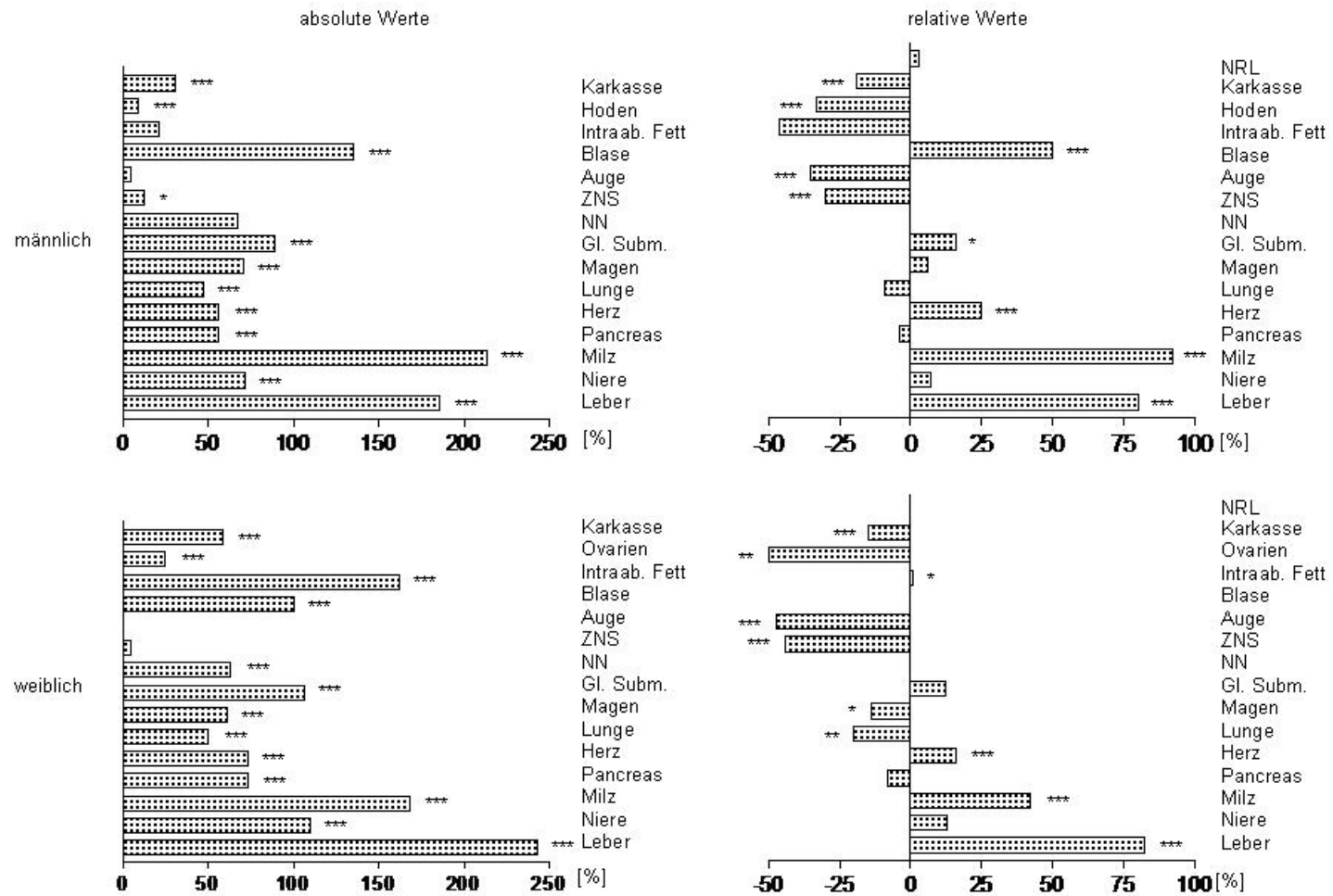
Nachdem das Gesamtkörpergewicht der transgenen Tiere ab dem 18. Lebenstag signifikant höher als bei den Kontrolltieren war, stellte sich die Frage, ob einzelne Organe von dieser Gewichtszunahme überproportional betroffen sind. Aus diesem Grund wurden die Organengewichte von neun männlichen transgenen Tieren, elf weiblichen transgenen Tieren, zehn männlichen Kontrolltieren und sechs weiblichen Kontrolltieren am 65. Lebenstag auf 0,1 mg genau gewogen.

Die statistische Auswertung der Gewichtsdaten sind den Tabellen (Tabelle 20 und Tabelle 21) zu entnehmen.

Tabelle 20: Absolute Organgewichte am 65. Lebenstag.

Absolute Werte							
Organ	Sex	WT		tg		Vergleich der Gruppen	
		LSM	SE	LSM	SE	tg:wt	tg m:tg w
Leber [g]	m	1,51	(0,16)	4,30	(0,13)	***	*
	w	1,12	(0,12)	3,85	(0,12)	***	
Niere [mg]	m	225	(14)	386	(12)	***	***
	w	135	(11)	284	(11)	***	
Milz [mg]	m	104	(11)	325	(9)	***	-
	w	122	(9)	327	(8)	***	
Pankreas [mg]	m	243	(22)	378	(18)	***	-
	w	212	(17)	366	(16)	***	
Herz [mg]	m	131	(8)	268	(7)	***	*
	w	114	(6)	247	(6)	***	
Lunge [mg]	m	153	(12)	225	(10)	***	-
	w	136	(9)	203	(9)	***	
Magen [mg]	m	147	(13)	251	(11)	***	-
	w	157	(10)	252	(10)	***	
Glandula Submandibularis [mg]	m	169	(9)	319	(8)	***	***
	w	96	(7)	198	(7)	***	
NN [mg]	m	3	(1)	5	(1)	-	***
	w	8	(1)	13	(1)	***	
ZNS [mg]	m	458	(20)	517	(16)	*	-
	w	457	(16)	482	(15)	-	
Auge [mg]	m	38	(2)	40	(1)	-	-
	w	38	(1)	38	(1)	-	
Harnblase [mg]	m	23	(3)	54	(3)	***	***
	w	13	(2)	26	(2)	***	
Intraabd. Fettgewebe [mg]	m	532	(112)	646	(91)	-	***
	w	435	(87)	1139	(83)	***	
Ovar [mg]	w	8	(1)	10	(1)	***	
Hoden [mg]	m	89	(3)	97	(3)	***	
Karkasse [g]	m	10,78	(0,32)	14,14	(0,26)	***	-
	w	8,85	(0,25)	14,05	(0,23)	***	

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$



\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001

Abbildung 28: Absolute und relative Organ Gewichte von cβa-bGH-transgenen Mäusen im Verhältnis zu ihren nicht-transgenen Geschwistertieren.

Die Organgewichtsdaten lassen sich folgendermaßen charakterisieren:

Wie der Tabelle 20 und der Abbildung 28 zu entnehmen ist, zeigten die meisten Organe ein signifikant erhöhtes Gewicht bei den transgenen Tieren. Die absoluten Organvergrößerungen variierten von keiner prozentualen Erhöhung des absoluten Wertes im Falle der Augen bis zu einer Vergrößerung von 244 % im Falle der Leber der weiblichen transgenen Tiere im Vergleich zu ihren nicht-transgenen Kontrolltieren. Die größten prozentualen Vergrößerungen des Organgewichtes waren in der Leber (185 % m, 244 % w), Milz (212 % m, 168 % w) und im intraabdominalen Fettgewebe (161 % w) zu finden. Ausnahmen bildeten hier die Nebennieren des männlichen Tieres, das ZNS des weiblichen Tieres, die Augen bei beiden Geschlechtern und das intraabdominale Fettgewebe der männlichen Tiere, bei diesen Organen ist keine Signifikanz gegenüber den nicht-transgenen Tieren zu erkennen.

Interessanterweise war der Geschlechtsdimorphismus der transgenen Tiere lediglich beim Vergleich der absoluten Werte einiger Organe (Milz, Pankreas, Lunge, Magen, ZNS, Auge und Karkasse) aufgehoben.

Um einen genaueren Einblick zu gewinnen, ob einzelne Organe überproportional viel zur Gewichtszunahme der transgenen Tiere beitragen, wurden die relativen Organgewichte berechnet (siehe Tabelle 21 und Abbildung 28). Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigte sich eine signifikante Erhöhung der relativen Gewichte der Leber, der Milz und des Herzens bei beiden Geschlechtern. Das relative Gewicht der Harnblase war nur bei den männlichen Tieren und das relative Gewicht des intraabdominalen Fettgewebes nur bei den weiblichen Tieren signifikant vergrößert. Im Gegensatz dazu waren die auf das Körpergewicht bezogenen Gewichte von ZNS, Auge, Karkasse, Ovar und Hoden im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erniedrigt. Eine ähnliche Verringerung konnte bei Lunge und Magen der weiblichen Tiere detektiert werden. Der Vergleich der männlichen und weiblichen Tiere der transgenen Gruppe zeigt auch bei Einbeziehung des Körpergewichts eine Aufhebung des Geschlechtsdimorphismus bei folgenden Organen: Pankreas, Herz, Lunge, Magen, ZNS und Auge.

Tabelle 21: Relative Organgewichte am 65. Lebensstag.

Relative Werte							
Organ	Sex	wt		Tg		Vergleich der Gruppen	
		LSM	SE	LSM	SE	tg:wt	tg m:tg w
Leber [%]	m	5,54	(0,21)	9,96	(0,17)	***	*
	w	5,05	(0,16)	9,21	(0,16)	***	
Niere [%]	m	0,82	(0,05)	0,88	(0,04)	-	***
	w	0,61	(0,04)	0,69	(0,03)	-	
Milz [%]	m	0,38	(0,02)	0,73	(0,02)	***	*
	w	0,55	(0,01)	0,78	(0,01)	***	
Pankreas [%]	m	0,89	(0,07)	0,85	(0,06)	-	-
	w	0,96	(0,05)	0,88	(0,05)	-	
Herz [%]	m	0,48	(0,02)	0,60	(0,01)	***	-
	w	0,51	(0,01)	0,59	(0,01)	***	
Lunge [%]	m	0,56	(0,04)	0,51	(0,03)	-	-
	w	0,61	(0,03)	0,49	(0,03)	**	
Magen [%]	m	0,54	(0,04)	0,57	(0,03)	-	-
	w	0,71	(0,03)	0,61	(0,03)	*	
Glandula submandibularis [%]	m	0,62	(0,03)	0,72	(0,02)	*	***
	w	0,43	(0,02)	0,48	(0,02)	-	
NN [%]	m	0,01	(0,003)	0,01	(0,002)	-	***
	w	0,03	(0,002)	0,03	(0,002)	-	
ZNS [%]	m	1,68	(0,06)	1,17	(0,05)	***	-
	w	2,06	(0,05)	1,16	(0,05)	***	
Auge [%]	m	0,14	(0,01)	0,09	(0,004)	***	-
	w	0,17	(0,004)	0,09	(0,004)	***	
Harnblase [%]	m	0,08	(0,01)	0,12	(0,01)	***	***
	w	0,06	(0,01)	0,06	(0,01)	-	
intraab. Fettgewebe [%]	m	2,70	(0,24)	1,45	(0,26)	-	**
	w	1,92	(0,25)	1,93	(0,32)	*	
Ovar [%]	w	0,04	(0,003)	0,02	(0,002)	**	
Hoden [%]	m	0,3	(0,01)	0,2	(0,004)	***	
Karkasse [%]	m	39,59	(0,53)	31,99	(0,43)	***	**
	W	39,90	(0,41)	33,72	(0,43)	***	
NRL [cm/g <sup>1/3</sup> ]	M	0,31	(0,004)	0,32	0,004	-	-
	M	0,33	(0,005)	0,33	0,003	-	

\* p &lt; 0,05; \*\* p &lt; 0,01; \*\*\* p &lt; 0,001

## **4.5.11 Morphologische Befunde**

### **4.5.11.1 Pathomorphologische Veränderungen der Niere**

#### **4.5.11.1.1 Frühstadien renaler Alterationen**

Frühstadien renaler Alterationen wurden einheitlich bei Tieren in der 5. Lebenswoche (Tag 35) diagnostiziert und auch bei einzelnen Tieren bis zum 65. Lebenstag, die keine klinischen Krankheitsanzeichen einer Nephropathie zeigten. Als Kontrolle dienten nicht-transgene Wurfgeschwister.

##### **4.5.11.1.1.1 Makroskopische Befunde**

Makroskopisch zeigte sich lediglich eine renale Hypertrophie gegenüber den Kontrollorganen.

##### **4.5.11.1.1.2 Histopathologische Befunde**

Lichtmikroskopisch ließen die Nieren der bGH-transgenen Tiere regelmässig glomeruläre Veränderungen erkennen. Vornehmlich traten dabei eine diffuse Hypertrophie der Glomerula und eine Expansion des Mesangiums auf.

Die in mehr als der Hälfte der vergrößerten Glomerula beobachteten mesangialen Alterationen waren in segmentaler Form sowohl in hilusnahen als auch peripheren Abschnitten des Kapillarkonvolutes zu finden. Gelegentlich zeigte sich jedoch auch ein panglomerulär-axiales Muster, zum Teil mit segmentaler Obliteration des Schlingenkonvolutes.

Die Kapillarprofile der hypertrophierten Glomerula wiesen häufig ein ungewöhnlich großes Kaliber auf. Charakteristisch für die transgenen Tiere waren dabei die dilatierten und deformierten Kapillaren.

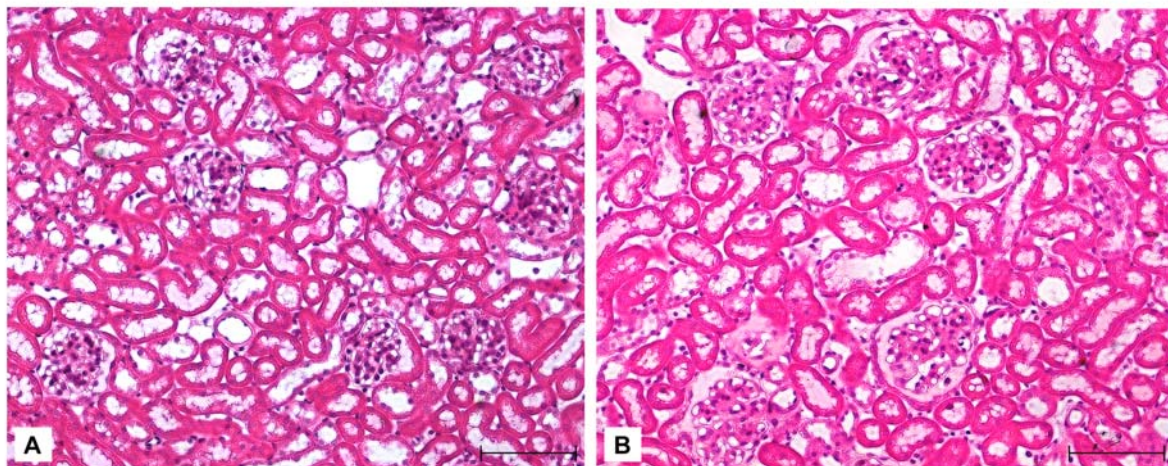
Ogleich auch bei den Kontrolltieren gelegentlich ein heterogenes Kapillarschlingenmuster der Glomerula zu erkennen war, zeigten sich derartige Veränderungen nur in einer sehr geringen Anzahl der Glomerula.

Bei einem Teil der hier betrachteten transgenen Tiere schloß das Spektrum der glomerulären Alterationen geringgradige fokal-segmentale Hyalinosen ein. Lichtmikroskopisch zeigte sich hierbei eine Einengung der Lumina der Kapillaren durch PAS-positive, hyaline, subendotheliale Ablagerungen. Derartige Veränderungen traten bei den Kontrolltieren nicht auf. Das lichtmikroskopische Erscheinungsbild der Basalmembran der Glomerulumkapillaren



entsprach dem der Kontrolltiere und ließ gelegentlich einzelne agyrophile Protuberanzen erkennen. In den viszeralen Epithelzellen der Glomerula zeigten sich bei den transgenen Individuen regelmäßig strukturelle Veränderungen. Am auffälligsten waren dabei eine unterschiedlich starke Zellvergrößerung, eine intrazytoplasmatische Vakuolisierung und hyalintropfige Proteinakkumulation sowie blasenförmige Auftreibungen der Zellkörper der Podozyten. In einer größeren Anzahl der transgenen Individuen zeigten sich Proteinansammlungen im Bowmanschen Raum sowie eine hyalintropfige Proteinspeicherung in den Epithelzellen der Bowmanschen Kapsel. Segmentale Adhäsionen zwischen dem glomerulären Kapillarkonvolut und Bowmanschen Kapsel traten fokal auf und stellten ebenso wie epitheliale Halbmonde einen nur gelegentlich zu erhebenden Befund dar.

Die tubulären Veränderungen der transgenen Tiere waren insgesamt als geringgradig einzustufen. Als Ausdruck einer gesteigerten glomerulären Proteinurie fanden sich im allgemeinen eine herdförmige hyalintropfige Proteinspeicherung in Epithelzellen der proximalen Tubulussegmente sowie einzelne hyaline Zylinder in geraden und gewundenen Abschnitten distaler Tubuli. Die Epithelzellen proximaler Tubulusabschnitte erschienen etwas vergrößert und ließen häufiger Mitosefiguren erkennen als dies bei Kontrolltieren der Fall war. Gelegentlich waren geringgradig erweiterte proximale Tubuli im Außenstreifen des Nierenmarks zu beobachten. Das Niereninterstitium zeigte keine nennenswerten Veränderungen.



**Abbildung 29: Lichtmikroskopische Ausschnitte der Nierenrinde.**

(A) Kontrolle (B) diffuse glomeruläre Hypertrophie (A) gleichaltriges Kontrolltier (Wurfgeschwister) (B) weibliche  $c\beta$ a-bGH-transgene Maus, 35 Tage. Kunststoffschnitte, Färbung H&E. (A) (B) Balken entspricht 100  $\mu$ m.

#### **4.5.11.1.2 Progression renaler Alterationen**

In diesem Abschnitt werden die renalen Veränderungen von klinisch unauffälligen Tieren im Alter zwischen dem 35. und 65. Lebenstag beschrieben. Als Kontrolle dienten nicht-transgene Wurfgeschwister.

##### **4.5.11.1.2.1 Makroskopische Befunde**

Makroskopisch zeigten die Nieren der transgenen Tiere eine Vergrößerung gegenüber denen der Kontrolltiere. Sowohl an der Oberfläche als auch an der Anschnittfläche konnten einzelne miliare Zysten festgestellt werden, die eine klare Flüssigkeit enthielten. Zum Teil konnte makroskopisch eine Aufhellung und bräunliche Verfärbung des Nierenparenchyms festgestellt werden.

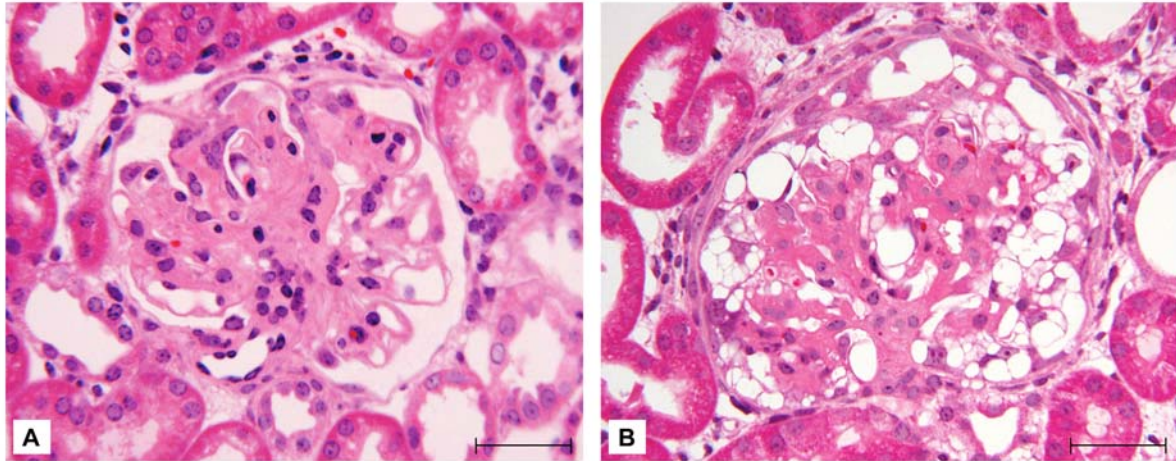
##### **4.5.11.1.2.2 Histopathologische Befunde**

Die Progression der renalen Alterationen zeigte sich histologisch vor allem in der Zunahme der glomerulären Alterationen, Anzeichen einer gesteigerten Proteinurie und den immer ausgeprägteren tubulo-interstitiellen Veränderungen.

Die bereits in Frühstadien beobachtete Vergrößerung der Glomerula war deutlich progredient. Einige Glomerula wiesen eine zystisch erweiterte Bowmansche Kapsel auf. Verschiedene Stadien und Schemata der Glomerulaverödung zeigten sich nebeneinander: Bei den nur wenig veränderten Glomerula stand eine Mesangiumexpansion mit mesangialer Hyperzellularität und einer Zunahme der Matrix sowie der argyrophilen Fibrillen im Vordergrund (Abbildung 30). Daneben wurden immer komplexere Formen der glomerulären Alterationen in Form einer mesangialen Sklerose, einer segmentalen Hyalinose, eines Kapillarschlingenkollaps und auch extrakapillärer Läsionen erkennbar.

Auch extrakapilläre Veränderungen wiesen ein weitgefächertes Spektrum an Alterationen auf. Im Bereich der Podozyten zeigten sich eine Zellhypertrophie, eine hyalintropfige Proteinspeicherung sowie eine Vakuolisierung des Zytoplasmas (Abbildung 30).

Kleinere Proteinablagerungen waren tropfenförmig zwischen dem Epithel und der Basalmembran der Bowmanschen Kapsel zu finden. Größere Proteinmengen lagerten sich sichelförmig zwischen der Basalmembran der Bowmanschen Kapsel und einer vom parietalen Blatt neu gebildeten Basalmembran ab. Im Bereich von Synechien des Kapillarschlingenkonvolutes mit der Bowmanschen Kapsel kam es oftmals durch die diskontinuierliche Kapsel zu einer Verbindung mit dem Niereninterstitium.

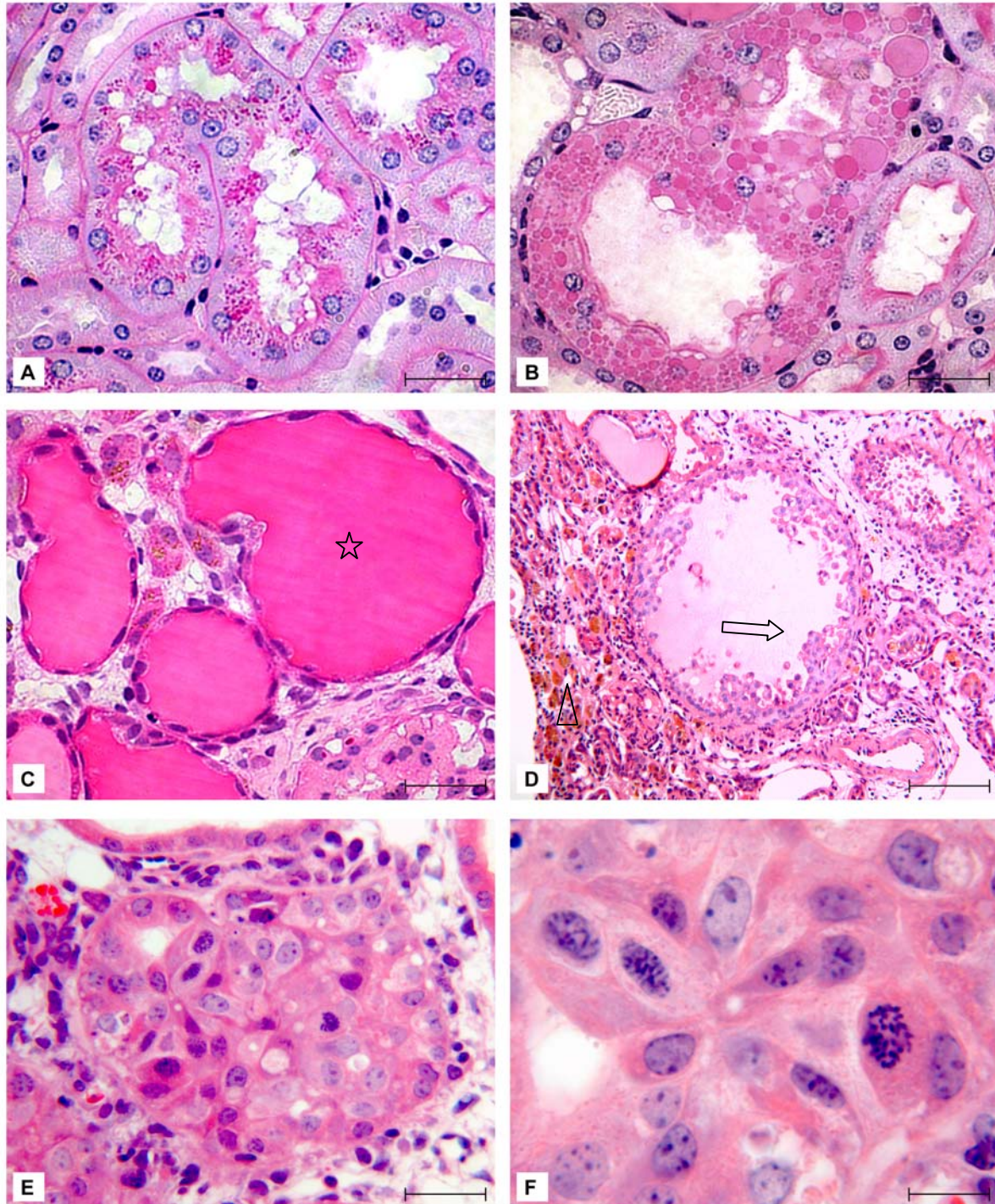


**Abbildung 30: Glomeruläre Alterationen.**

(A) Mesangiumexpansion; (B) Vakuolisierung des Zytoplasmas der Podozyten. (A)(B) weibliche c $\beta$ a-bGH-transgene Maus, 65 Tage. Kunststoffschnitte, Färbung H&E. (A) (B) Balken entspricht 50  $\mu$ m

In den Tubuli dominierten vor allem Anzeichen der vermehrten Proteinurie. Dies manifestierte sich in den proximalen Tubulusabschnitten vor allem als hyalintropfige Proteinspeicherung in den Tubulusepithelzellen und in den distalen Abschnitten als multiple hyaline Zylinder (Abbildung 31). Bevorzugt konnte man eine Dilatation in den proximalen Tubuli erkennen, die sich auf die distalen Segmente ausweitete und im Laufe der Progression zu Zysten erweiterte. Die Zysten waren unterschiedlich groß, teilweise waren sie sogar makroskopisch zu erkennen. Die kleineren Zysten waren mit einem mehrschichtigen Epithel ausgekleidet, es kam zur Ausbildung von polypoiden Epithelproliferationsgebilden (Abbildung 31). In den größeren Zysten war ein stark abgeflachtes und stellenweise regressiv verändertes Epithel anzutreffen. In den erweiterten Abschnitten proximaler Tubuli konnten häufig Mitosefiguren in den Epithelzellen beobachtet werden.





**Abbildung 31: Histologische Anzeichen bei gesteigerter Proteinurie.**

(A) geringgradige hyalintropfige Proteinspeicherung in den Epithelzellen proximaler Tubuli (B) hochgradige hyalintropfige Proteinspeicherung in den Epithelzellen proximaler Tubuli (C) hyaline Zylinder in distalen Tubuli (Stern) (D) polypoide Tubulusepithelproliferation (Pfeil), Ödematisierung, Hämosiderinbeladene Makrophagen im Interstitium (Pfeilspitze) (E) solides Epithelzellproliferat, Mitosefiguren in Epithelzellen (siehe Detailvergrößerung (F)). (A) (B) weibliche  $c\beta a$ -bGH-transgene Maus, 65 Tage, Paraffinschnitte, Färbung PAS (C) (D) (E) (F) weibliche  $c\beta a$ -bGH-transgene Maus, 65 Tage, Paraffinschnitte, Färbung H&E. (A) (B) (C) Balken entspricht 50  $\mu\text{m}$

Lichtmikroskopisch war hier keine Zuordnung zu einem bestimmten Tubulussegment mehr möglich. Der Inhalt der Zysten war sehr unterschiedlich, er reichte von keinem optisch erkennbaren Inhalt über flockiges, schwach angefärbtes Material, Makrophagen, desquamierte Epithelzellen bis hin zu PAS-positiven Proteinablagerungen in den distalen Segmenten.

Im Interstitium fanden sich vor allem im Kortextbereich fokale Fibrosen mit plasmazellulären und lymphohistozytären Infiltraten sowie einzelne hämosiderinbeladene Makrophagen, die in der Regel mit atrophischen Tubuli assoziiert waren.

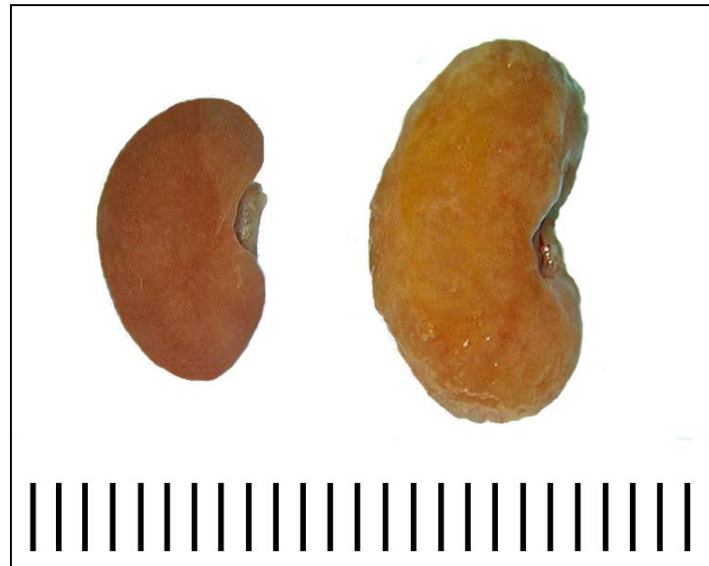
#### **4.5.11.1.3 Terminalstadium der renalen Alterationen**

Die unter dem Terminalstadium der renalen Alterationen geschilderten nephropathologischen Befunde wurden bei Mäusen erhoben, die klinische Symptome wie Apathie, Dyspnoe, Anämie und einen aufgekrümmten Rücken aufwiesen. Die Darstellung bezieht sich auf Fälle, bei denen die Nephropathie als krankheitsbestimmend zu werten war. Bei den  $c\beta$ -bGH-transgenen Mäusen wurden diese Veränderungen bei Tieren ab dem 69. Lebensstag diagnostiziert.

##### **4.5.11.1.3.1 Makroskopische Befunde**

Makroskopisch waren bilaterale Veränderungen der Nieren zu erkennen. Sie waren einheitlich vergrößert und blaßgelb verfärbt. Die Kapsel ließ sich leicht ablösen. Die Oberfläche war feingranuliert und wurde von einzelnen, bis etwa 2 mm durchmessenden Zysten hervorgewölbt. Auf der Schnittfläche waren in der Rinde und im äußeren Markbereich mit einer klaren, farblosen Flüssigkeit gefüllte Zysten zu sehen. Bei einem Teil der untersuchten Tiere konnte eine meist bilaterale Dilatation des Nierenbeckens festgestellt werden.



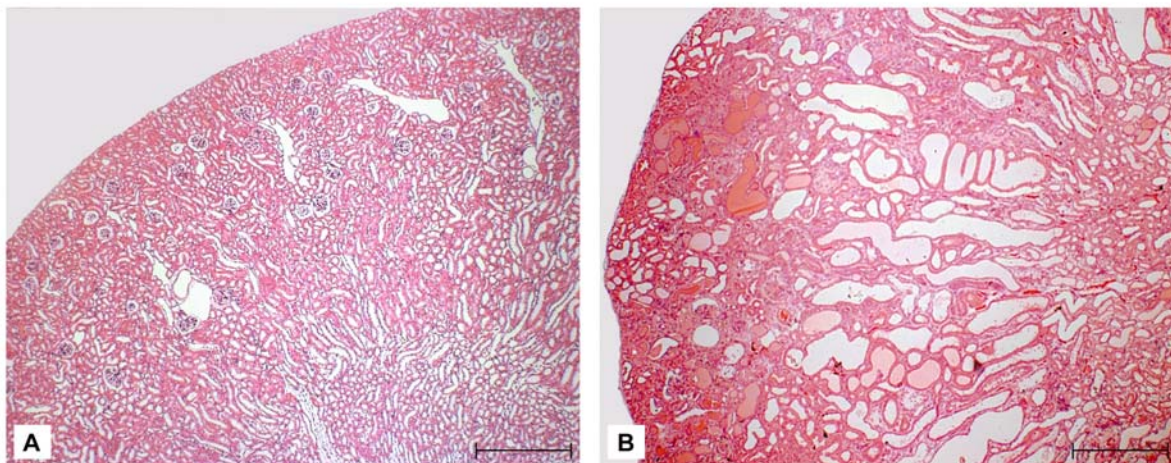


**Abbildung 32: Makroskopische Ansicht zweier Nieren.**

(links) Niere eines nicht-transgenen Geschwistertieres (rechts) Niere einer weiblichen  $c\beta a$ -bGH-transgenen Maus (Alter 78 d). Strichabstand entspricht 1 mm.

#### 4.5.11.1.3.2 Histopathologische Befunde

Histologisch waren die Endstadien der Nephropathie durch hochgradige glomeruläre und tubulo-interstitielle Alterationen mit Atrophie von Nephronen sowie Anzeichen einer ausgeprägten Proteinurie gekennzeichnet.



**Abbildung 33: Übersichtspräparate der Niere.**

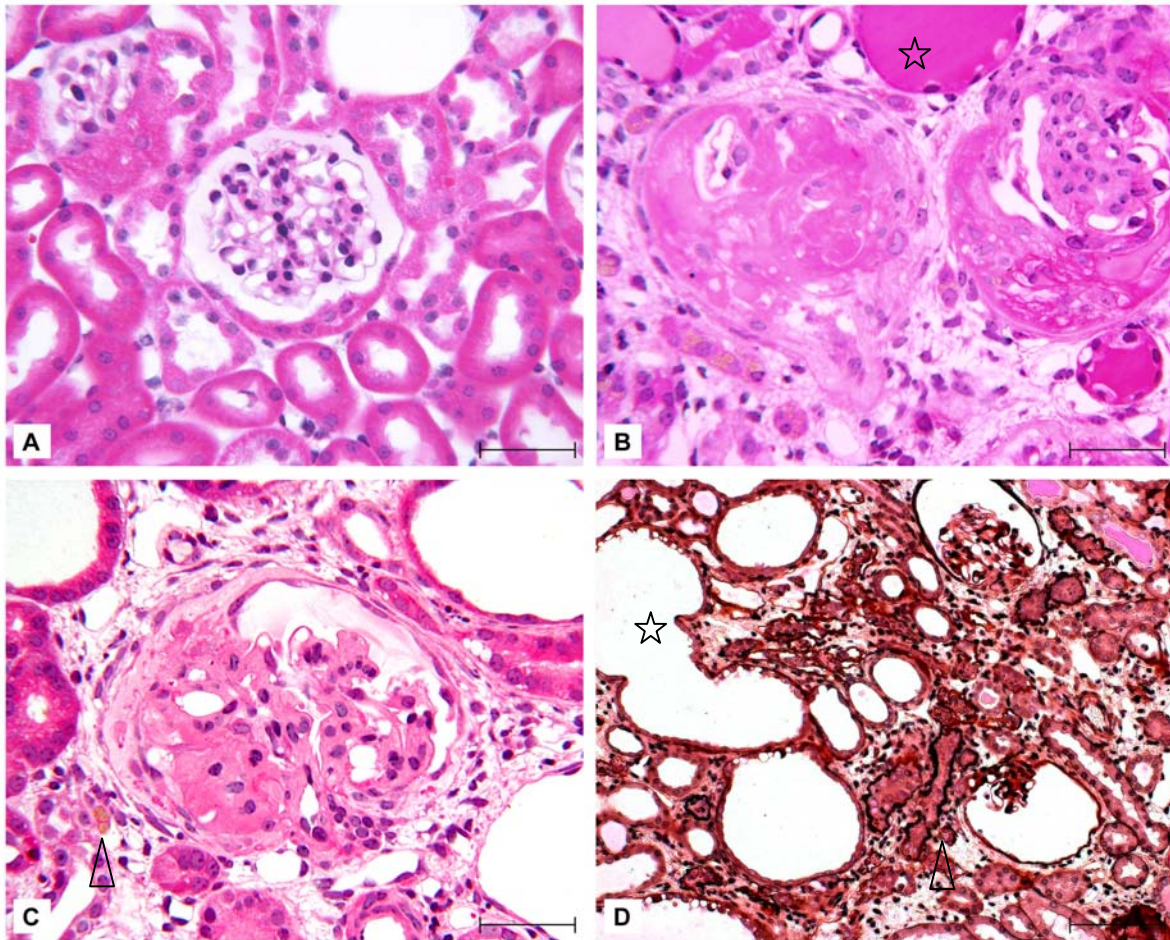
(A) unverändertes Vergleichsorgan (B) vergrößerte Niere, multiple dilatierte und zystische Tubuli, hyaline Zylinder in den Tubuluslumina. (A) weibliches Kontrolltier (Alter 108 d) (B) Männliche  $c\beta a$ -bGH-transgene Maus (Alter 108 d). Paraffinschnitte, Färbung: H&E. (A) (B) Balken entspricht 500  $\mu\text{m}$ .

Die Glomerula dieser Tiere zeigten ausnahmslos pathologische Veränderungen. Einerseits konnten hier Mischformen aus Mesangiumsklerose, segmentaler Hyalinose,

Kapillarschlingenkollaps und extrakapillären Läsionen diagnostiziert werden, andererseits zeigten sich daneben auch uniforme Varianten der glomerulären Veränderungen. Bei letzteren konnten vier Typen differenziert werden:

1. Der Matrixtyp mit einer starken Vermehrung der argyrophilen mesangialen Grundsubstanz.
2. Der Hyalinose- bzw. Insudationstyp mit massiven homogenen, argyrophoben, schwach PAS-positiven subendothelialen und mesangialen Ablagerungen.
3. Der Kollapstyp mit einer gefältelten, dicht beieinander liegenden oder die mesangiale Matrix umschließenden Basalmembran, einer geringeren Größe des Glomerulums und einer Zellarmut.
4. Der selten als eigenständige Variante auftretende Kompressionstyp, bei dem es durch eine Halbmondbildung zu einer Verödung des Kapillarkonvolutes kommt.

Bei den Tubulusalterationen konnten zwei verschiedene Formen unterschieden werden. Nebeneinander anzutreffen waren zum einem eine multifokale bis diffuse Tubulusatrophie mit regressiver Veränderung und Untergang des Epithels und zum anderen eine Epithelhyperplasie mit einer Tendenz zur Zystenbildung. Die ausgeprägte Proteinurie spiegelte sich als hyalintropfige Speicherung in den proximalen Tubuli und als hyaline Zylinder in distalen Tubuli wider.



**Abbildung 34: Glomeruläre und interstitielle Läsionen.**

(A) unverändertes Glomerulum (B) linkes Glomerulum: glomeruläre Hypertrophie, globale Verödung des Glomerulums (Hyalinose), rechtes Glomerulum: panglomeruläre Sklerose, periglomeruläre Fibrose, Siderophagen, Ödematisierung, hyaline Zylinder (Stern) (C) ausgedehnte Synechien zwischen Kapillarschlingenkonvolut und Bowmanscher Kapsel, Proteininsudation in den Bowmanschen Raum, Siderophagen (Pfeilspitze), Ödematisierung (D) Tubulusatrophie (Pfeilspitze), Tubuli mit gefalteter Basalmembran, interstitielle Fibrose, dilatierte Tubuli (Stern). (A) nicht-transgene weibliche Maus (Alter 108 d), Kunststoffschnitt, Färbung H&E (B) (C) weibliche  $c\beta$ -bGH-transgenen Maus (Alter 108 d) Kunststoffschnitte, Färbung H&E (D) männliche  $c\beta$ -bGH-transgene Maus (Alter 127 d) Kunststoffschnitt, kombinierte Färbung PAMS-PAS. (A) (B) (C) Balken entspricht 50  $\mu$ m (D) Balken entspricht 100  $\mu$ m.

Die interstitiellen Alterationen waren durch multifokale bis diffuse Fibrosierung in Rinde und Mark, multifokale mononukleäre, betont plasmazelluläre Infiltrate und durch herdförmige Ansammlungen hämosiderinbeladener Makrophagen (Siderophagen) gekennzeichnet.

#### 4.5.11.2 Pathomorphologische Veränderungen der Leber

Eine pathomorphologische Untersuchung der Leber wurde an drei verschiedenen Altersgruppen durchgeführt: 9, 11 und 26 Wochen alten Mäusen.

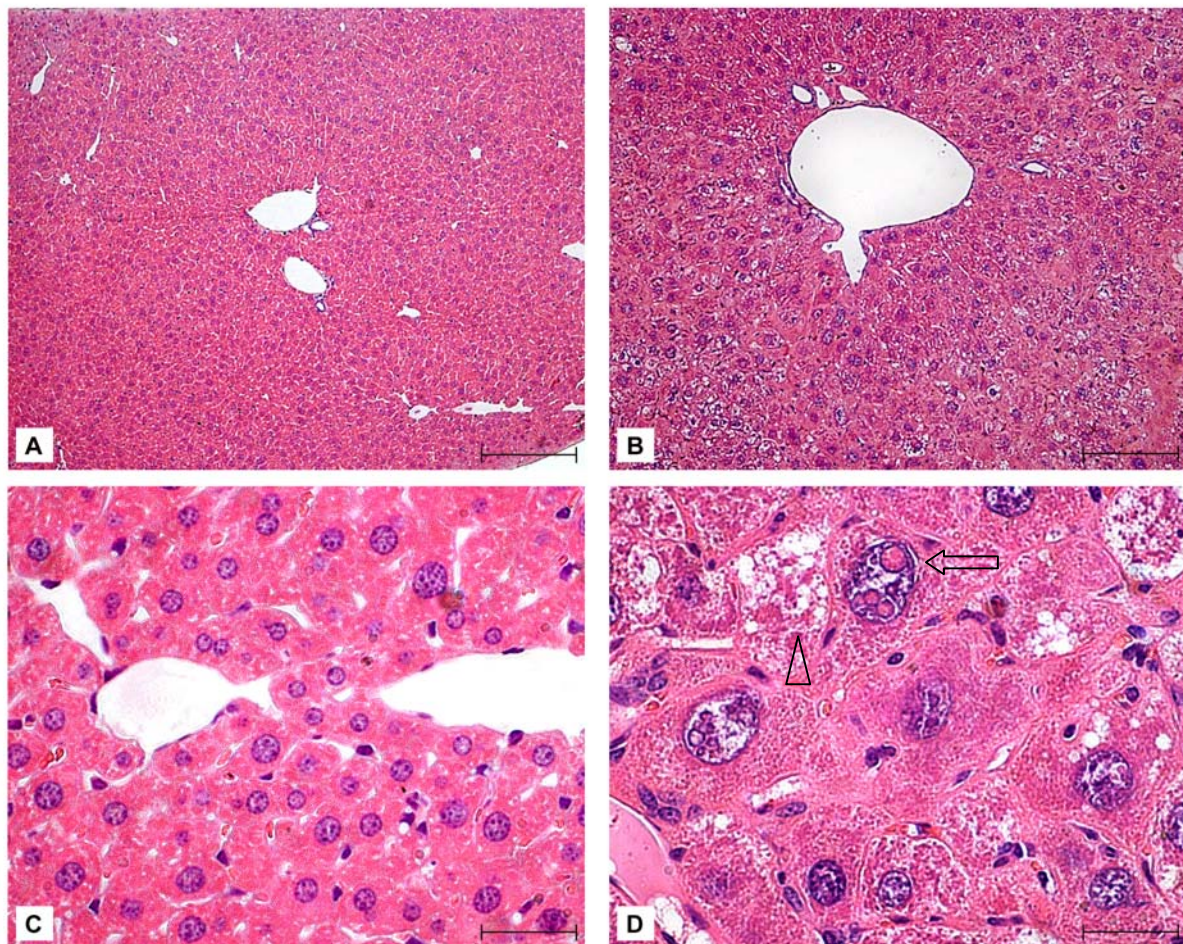


#### 4.5.11.2.1 Makroskopische Befunde

Makroskopisch konnte bei jeder Altersgruppe der  $\text{c}\beta\text{a-bGH}$ -transgenen Tieren eine Hepatomegalie mit einer deutlichen Läppchenzeichnung festgestellt werden.

#### 4.5.11.2.2 Histopathologische Befunde

Die histologischen Untersuchungen ergaben bei allen drei Altersgruppen eine panlobulare Hypertrophie und Polymorphie der Hepatozyten und der Leberzellkerne. Häufig konnten bei den transgenen Tieren in den Zellkernen einzelne oder mehrere homogene eosinophile Pseudoinklusionen festgestellt werden, die bei den Kontrolltieren des gleichen Alters nicht zu finden waren. Die zum Teil vakuolisierten Hepatozyten sind auf Glykogeneinlagerungen zurückzuführen. Vereinzelt konnten Einzelzellnekrosen festgestellt werden. In Einzelfällen zeigten sich postnekrotische Fibrosen, Ovalzellhyperplasien und Gallengangsproliferate. Bei einer 27 Wochen alten transgenen Maus konnte ein Klarzellfokus festgestellt werden.



**Abbildung 35: Leberveränderungen  $\text{c}\beta\text{a-bGH}$ -transgener Mäuse.**

(A) (C) Kontrolltier (B) Hypertrophie und Polymorphie der Hepatozyten und Leberzellkernen (D) intra-nukleäre Pseudoinklusionen (Pfeil), intrazytoplasmatische Vakuolen nach Art von einer tropfigen Verfettung (Pfeilspitze).

(A) (C) weibliche nicht-transgene FVB-Maus (Alter 158 d) (B) (D) weibliche c $\beta$ a-bGH-transgene Maus (Alter 165). Paraffinschnitte, Färbung H&E. (A) (B) Balken entspricht 200  $\mu$ m (C) (D) Balken entspricht 50  $\mu$ m.

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion der c $\beta$ a-bGH-transgenen Tiere

#### 5.1.1 In vitro Analyse der chicken- $\beta$ -actin Promotoraktivität

Der in dieser Arbeit verwendete chicken- $\beta$ -actin Promotor stellt eine Kombination regulatorischer Elemente mehrerer Promotoren dar und wurde hergestellt mit dem Ziel, eine ubiquitäre Expression von Transgenen zu erreichen. Ein 1,3 kb großes Fragment aus dem chicken- $\beta$ -actin Promotor und die Enhancer Region des CMV immediate-early Promotors erlauben eine Expression in vielen Zelllinien und Organen. Durch das Einfügen der Polyadenylierungsregion des  $\beta$ -Globin Gens am 3'-Ende konnte die Promotoraktivität um das 2,5-fache (im  $\beta$ -Galaktosidase Reporterassay) gesteigert werden (Miyazaki *et al.* 1989; Niwa *et al.* 1991). Der Promotor zeigt nicht nur in vielen Zelllinien eine starke Aktivität, sondern auch in allen überprüften Geweben bei transgenen Tieren, wie z.B. der *green mice*, einer transgenen Mauslinie, bei der GFP unter der Kontrolle des chicken- $\beta$ -actin Promotors steht (Okabe *et al.* 1997).

In vitro zeigte sich eine starke Aktivität in verschiedenen Zelllinien. Nach Transfektion des c $\beta$ a-bGH-Konstruktes in 293- und in HepG2-Zellen konnte in beiden Zelllinien eine Expression nachgewiesen werden (Abbildung 11 und Abbildung 12). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das Konstrukt für die Mikroinjektion zur Erstellung der transgenen Tiere verwendet.

#### 5.1.2 Identifizierung und Charakterisierung der Transgenintegration des c $\beta$ a-bGH Konstruktes

Zur Charakterisierung des Transgenintegrationsmusters der c $\beta$ a-bGH-transgenen Mauslinie wurden Southern Blot-Analysen durchgeführt. Trotz der Verwendung verschiedener Restriktionsendonukleasen und des Einsatzes verschiedener Sonden konnte im Southern Blot nicht die Anzahl der integrierten Konstrukt kopien nachgewiesen werden, sondern nur die Integration des Konstruktes selbst, da nur ein Verdau der genomischen DNA mit *EcoRI* zu einem Signal führte. *EcoRI* schneidet an beiden Enden des bGH-Transgens. Es wird somit das Transgen herausgeschnitten. Folglich können durch diesen Verdau keine individuellen linienspezifischen „Flanking bands“ dargestellt werden. Die detektierte Bande zeigte die Größe von 1,9 kb, entsprechend der Größe des bGH Gens. Die sehr schwachen Banden auf Höhe von 2,5 kb repräsentieren vermutlich eine Hybridisierung mit einer endogenen Sequenz,

da diese Bande sowohl bei den transgenen Tieren, als auch bei den nicht-transgenen Geschwistern dargestellt werden konnte. Die statistische Überprüfung nach Dixon und Mood zeigte eine Vererbung des Transgens nach Mendel (4.5.1). Dieser Befund lässt darauf schließen, dass es sich bei dem Foundertier nicht um ein Mosaiktier gehandelt hat und macht multiple Integrationsstellen auf verschiedenen Chromosomen unwahrscheinlich.

Bei allen weiteren Generationen aus dieser Founderlinie erfolgte die Identifizierung transgener Mäuse aus Schwanzspitzen-DNA im Alter von vier Wochen mittels PCR-Analysen (Abbildung 16). Diese Methode ist gekennzeichnet durch eine einfache, sichere und rasche Durchführung zur Überprüfung der Tiere auf Integration des Transgenkonstruktes (Schneider & Wolf 2005).

### **5.1.3 Charakterisierung der Transgenexpression der c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäuse**

#### **5.1.3.1 Expressionmuster der c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäuse**

Auf RNA-Ebene wurde die Transgenexpression mittels RT-PCR und in ausgewählten Organen sowohl durch Northern Blot als auch durch *in situ* Hybridisierung nachgewiesen.

Die RT-PCR wurde mit einem intronüberspannenden Primerpaar durchgeführt. Durch die intronüberspannenden Primer kann das Produkt aufgrund der Produktlänge als cDNA von einer eventuell vorliegenden Kontamination mit genomischer DNA unterschieden werden, da im Falle genomischer DNA das dazwischenliegende Intron mitamplifiziert wird. Die Expression des c $\beta$ a-bGH-Konstruktes konnte in allen untersuchten Geweben detektiert werden. In Leber, Niere, Milz, Pankreas, M. quadriceps, Magen, Lunge, Herz, Nebenniere, Dünndarm, Dickdarm, Auge, Ovar, ZNS und intraabdominales Fettgewebe wurde das Konstrukt transkribiert und die RNA korrekt gespleißt.

Die Ergebnisse der RT-PCR wurden in ausgewählten Organen mittels eines Northern Blots verifiziert. In allen untersuchten Organen (Leber, Niere, Milz, Lunge, M. quadriceps) wurde eine Expression nachgewiesen. Bei der Überprüfung der RNA auf Degradation im Agarosegel ließ sich bei der photometrischen Dokumentation der transgenen- und der Wildtyp-Herzprobe keine 18 und 28 S Bande im ethidiumbromidhaltigen Agarosegel darstellen. Die fehlende Expression im Herzen lässt sich daher mit einer Degradation der RNA erklären, welche durch den Abbau der RNA von RNasen zustande kommen kann. Das stärkste Expressionsniveau wurde in der Niere und in der Lunge festgestellt, gefolgt von Milz und Muskel. In der Leber zeigte sich nur eine sehr schwache Expression des Transgens (Abbildung 19).

Da die Mäuse für zukünftige Proteom- und Transkriptomanalysen der Leber und der Niere zur Verfügung stehen werden, war es wichtig, eine *in situ* Hybridisierung zur genauen Expressionslokalisation in Leber und Niere durchzuführen.

*In situ* Hybridisierungen wurden an Schnitten von Nieren 65 Tage alter c $\beta$ -bGH-Tiere durchgeführt. Wie aus Abbildung 20 zu entnehmen ist, konnte in allen untersuchten Nierenpräparaten bGH-mRNA sowohl im Zytoplasma der Epithelzellen proximaler und distaler Tubulusabschnitte als auch in den Sammelrohrethelien der transgenen Tiere nachgewiesen werden. Das Signal war in einigen, nicht aber in allen der oben genannten Abschnitte zu detektieren. In den Glomerula konnte kein Signal für bGH-mRNA detektiert werden. Bisher ist nur berichtet worden, dass der c $\beta$ -Promotor in der Niere aktiv ist (Okabe *et al.* 1997). Es existieren aber noch keine Daten über die genaue zelluläre Lokalisation der Aktivität des Promotors in der Niere, die in dieser Arbeit erstmals dargestellt wurde (Ariyasu *et al.* 2005; Ikeguchi *et al.* 2004; Kobayashi & Ohta 2003; Ueno *et al.* 1999). In der Leber wurde aufgrund des im Northern Blot gezeigten niedrigen Expressionsniveaus die *in situ* Hybridisierung mit einer ‚Tyramide Signal Amplification‘ durchgeführt. Mit Hilfe einer Tyramide Amplifikation können auch schwach exprimierte Gene nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte in der Leber ein panlobuläres bGH mRNA-Expressionsmuster in den Hepatozyten detektiert werden. Bisher lag auch für die Leber noch kein Aktivitätsprofil des c $\beta$ -Promotors vor, was durch diese Arbeit erhoben wurde.

Das Expressionsmuster des c $\beta$ -bGH-Konstruktes wurde auf Proteinebene bestätigt. Hier zeigte sich in allen untersuchten Organen eine Expression. In einigen Organen konnten zusätzlich zu der 22 kDa Bande noch einige größere Banden detektiert werden. Bei einem Teil dieser Banden könnte es sich um unprozessierte oder fehlerhaft glykosylierte Formen des bGH handeln, die in Organen akkumulieren, welche keine adäquate Sekretion des bGH erlauben.

Zusammenfassend zeigt der Promotor, wie in der Literatur beschrieben, eine ubiquitäre Aktivität. In der folgenden Tabelle sind die Expressionsmuster ausgewählter Tiermodelle dargestellt. Es konnte jeweils in allen untersuchten Geweben, mit Ausnahme der Erythrozyten und der Haare (Okabe *et al.* 1997), eine Expression der jeweiligen Gene unter Kontrolle des c $\beta$ -Promotors nachgewiesen werden.

**Tabelle 22: Ausgewählte Tiermodelle mit dem chicken- $\beta$ -actin Promotor.**

Gen	Expressionsmuster	Referenzen
Preproghrelin	Magen, ZNS, Herz, Niere	(Ariyasu <i>et al.</i> 2005)
Spermine synthase	Herz, Muskel, Leber, Niere, Epidermis, Dermis, Lunge, ZNS, Testis	(Ikeguchi <i>et al.</i> 2004)
Humane Chymase	Herz, Aorta, Muskel, ZNS, Leber	(Koga <i>et al.</i> 2003)
Oxygen-reulated protein (ORP150)	Herz, ZNS, Milz, Skelettmuskel, Pankreas, Lunge, Thymus, Niere	(Kobayashi & Ohta 2003)
Osteopontin	Aorta, Niere, Herz, Leber, Lunge, Muskel	(Isoda <i>et al.</i> 2002)
Pancreatic Polypeptide	Leber, Dünndarm, Muskel, Niere, Milz, ZNS, $\beta$ -Zellen des Pankreas	(Ueno <i>et al.</i> 1999)
LacZ	Suprabasale und basale Zellen der Epidermis, Epitheliale Zellen der Haarfollikel, Dermale Papille, Talgdrüsen	(Sawicki <i>et al.</i> 1998)
Green fluorescent Protein (GFP)	In allen Geweben, außer in Erythrozyten und Haaren	(Okabe <i>et al.</i> 1997)

### 5.1.3.2 bGH-Konzentration im Serum

Bei den untersuchten c $\beta$ a-bGH-transgenen Tieren schwankten die bGH-Konzentrationen im Serum zwischen 1,9  $\mu$ g/ml und 16,7  $\mu$ g/ml. Nach Aufteilung der Tiere in eine Gruppe im Alter von 65 Tagen mit gutem Allgemeinbefinden und in eine zweite Gruppe mit klinischer Symptomatik zeigte sich bei der ersten Gruppe eine wenig variable Serum-bGH-Konzentration ohne einen geschlechtsspezifischen Unterschied. Im Mittel betrug diese 4,5 $\pm$ 0,12  $\mu$ g/ml. Diese Serumkonzentrationswerte sind mit denen einer PEPCCK-bGH-transgenen Mauslinie vergleichbar (Wolf *et al.* 1993).

Die erhöhten präfinales Serumkonzentrationen bis auf 16,7  $\mu$ g/ml der klinisch auffälligen Gruppe sind mit einem prämortalen Anstieg zu erklären. Bei MT-hGH-transgenen Tieren konnte dieses Phänomen auch beobachtet werden (Wolf 1990). Als Gründe für den GH Anstieg kommen sowohl eine vermehrte Synthese als auch eine verminderte Abbaurrate bzw. Ausscheidungsgeschwindigkeit oder aber eine Kombination beider Effekte in Frage.

Bei vier Monate alten PEPCK-bGH-transgenen Mäusen konnte im Vergleich zu einer nicht-transgenen Kontrollmaus eine Erhöhung des Corticosteron-Spiegels im Serum gemessen werden (Hoefflich *et al.* 2002). Glukokortikoide steigern den mRNA-Spiegel des GHs nicht nur durch Steigerung der Transkription (Slater *et al.* 1985) sondern auch durch eine Stabilisierung der mRNA (Paek & Axel 1987). Selden *et al.* zeigten eine durch Glukokortikoide induzierte vermehrte Expression des MT-hGH-Transgens (Selden *et al.* 1989). Aber auch eine Glukokortikoidsteigerung als Ausdruck einer Stresssituation eines chronisch kranken Tieres wäre denkbar, die zu einer Steigerung des GH-Spiegels führt.

Die histopathologischen Leberveränderungen und die Erhöhung der Leberenzyme im Serum der transgenen Mäuse lassen auf eine Leberschädigung schließen. Daraus kann eine verminderte Syntheseleistung dieses Organs resultieren, aber auch eine Reduktion der Proteasenbildung wäre denkbar. Dies kann eine längere Halbwertszeit des bGHs hervorrufen. Eine weitere Erhöhung der Halbwertszeit des GHs von etwa 20 Minuten auf bis zu mehreren Stunden geschieht durch die Verringerung der Clearance in der Niere (Hokken-Koelega *et al.* 1990).

### 5.1.3.3 Klinisch-chemische Parameter

Um die pathomorphologischen Befunde zu untermauern, wurden verschiedene klinisch-chemische Parameter im Serum der c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäuse untersucht. Für diese Untersuchungen wurden die Tiere in zwei Gruppen, wie in Abschnitt 5.1.3.2 dargestellt, unterteilt.

Zur Evaluierung der Nierenfunktion dienen der Kreatinin- und der Harnstoffspiegel im Serum. Kreatinin ist ein Produkt des endogenen Muskelstoffwechsels. Dadurch sind die Serumkreatininkonzentrationen weitgehend nahrungsunabhängig und werden auch nicht vom endogenen Proteinmetabolismus beeinflusst, wie das für den Harnstoffspiegel der Fall ist. Da Kreatinin glomerulär filtriert und nur in geringen Mengen tubulär sezerniert wird, kann mit diesem Parameter die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) beurteilt werden. Die Kreatininwerte der untersuchten Tiere waren bei der klinisch auffälligen Tiergruppe doppelt so hoch wie bei den Kontrolltieren (Tabelle 19) (Kuhlmann *et al.* 1989) und sind Konsequenz der schweren Nephropathie bei älteren GH-transgenen Mäusen.

Harnstoff ist ein Serumparameter, der von mehreren Faktoren abhängig ist. Die Harnstoffkonzentration im Serum ist nicht nur wesentlich von der GFR abhängig, sondern auch von der Produktionsrate und der tubulären Rückresorptionsrate. Harnstoff wird in der Leber aus Ammoniak synthetisiert und entsteht beim Abbau von Proteinen. Dadurch ist der

Serumspiegel wesentlich vom Proteinkatabolismus und von der intestinalen Proteinzufuhr abhängig, sei es in Form von proteinreicher Nahrung oder von intestinalen Blutungen. Ein weiterer Punkt, der bei der Beurteilung der Harnstoffkonzentration beachtet werden muss, ist die hohe Rückresorptionsrate des filtrierten Harnstoffes (etwa die Hälfte) im Nephron. Die Rückresorption ist dabei im distalen Nephron von der Harnflussgeschwindigkeit und der Konzentration von Antidiuretischem Hormon (ADH) in den Sammelrohren abhängig. Die transgenen Mäuse und die Kontrolltiere wurden identisch ernährt, somit kann der Faktor Proteingehalt in der Nahrung vernachlässigt werden. Bei der klinisch auffälligen Gruppe kam es zum Teil zu einem prämortalen Körpergewichtsverlust, so dass bei diesen Tieren von einer Erhöhung des Harnstoffspiegels aufgrund einer katabolen Stoffwechsellage ausgegangen werden kann. Die durchschnittlichen Harnstoffkonzentrationen waren bei der zweiten Gruppe um das Sieben- bis Achtfache im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. In Korrelation mit den erhöhten Serumkreatininwerten und den pathomorphologischen Befunden muss der erhöhte Harnstoffspiegel als Ausdruck einer stark eingeschränkten Nierenfunktion und einer katabolen Stoffwechsellage gewertet werden (Kuhlmann *et al.* 1989).

Die Amylasekonzentration war im Serum der älteren Tiere signifikant erhöht. In Kombination mit den erhöhten Nierenparametern ist sie als Ausdruck einer Niereninsuffizienz zu werten. Eine begleitende Pankreatitis oder Myopathie kann jedoch im Einzelfall nicht ausgeschlossen werden (Kraft & Dürr 1999).

Bei der AST handelt es sich um ein Enzym ohne Organspezifität, das im Zytoplasma und in den Mitochondrien vorkommt. Es ist in größter Menge im Herz-, im Skelettmuskel und in der Leber vorzufinden. Zur Differenzierung der Herkunft, ob aus Muskel- oder Lebergewebe, wird der Kreatininkinasewert (CK) herangezogen. Dieser erhöht sich bei einer Schädigung des Herz- oder Skelettmuskels. Bei den transgenen Mäusen konnte keine Erhöhung des CK-Wertes festgestellt werden. Die AST hingegen war bei den weiblichen Tieren signifikant erhöht, während dies bei den männlichen Tieren nicht der Fall war. Leberspezifischer als die AST ist hingegen die ALT. Diese kommt überwiegend im Zytoplasma von Leberparenchymzellen, aber auch in Herz- und Nierenzellen vor. Bereits geringgradige Schädigungen führen zur Freisetzung des zytoplasmatischen Enzyms und folglich zur Erhöhung des Serumspiegels. Bei den c $\beta$ -bGH-transgenen Tieren konnte eine Erhöhung des ALT-Spiegels sowohl in der Gruppe der 65 Tage alten Tiere als auch bei den älteren Tieren nachgewiesen werden. Somit muss von einer signifikanten Hepatopathie ausgegangen werden.



Die Alkalische Phosphatase (AP) ist ein im Organismus weit verbreitetes Enzym, dessen verschiedene Subtypen unter anderem in der Membran der Gallengangsepithelien und im Knochen lokalisiert sind. Im Rahmen von Cholestasen und eines erhöhten Knochenumbaus kommt es daher zur Erhöhung des Serumspiegels. Interessanterweise war die AP-Aktivität der transgenen Tiere in beiden Gruppen niedriger als bei den Kontrolltieren. Dies wurde auch von Quaife et al. bei GH-transgenen Mäusen beschrieben (Quaife *et al.* 1989). In der Regel hat eine Erniedrigung des AP-Wertes keine pathogenetische Relevanz und ist im Rahmen einer Hepatopathie eher ungewöhnlich. Dieses Phänomen wurde jedoch im Rahmen einer akuten Dekompensation bei Morbus Wilson, einer hereditären Kupferspeicherkrankheit beschrieben.

Die Gesamteiweißkonzentration (TP) wies bei den 65 Tage alten Tieren einen signifikanten Anstieg auf. Bei den älteren Tieren hingegen war das TP trotz einer massiven histologisch diagnostizierten Proteinurie nur moderat erniedrigt. Dieser Befund deutet auf eine vermehrte Syntheseleistung der Leber hin, wie sie schon von verschiedenen GH-transgenen Linien bekannt ist (Brem *et al.* 1989; Wanke 1996). Quaife et al. (1989) diagnostizierten bei MT-bGH-transgenen Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren keine signifikanten Unterschiede im Serum-Gesamtprotein, jedoch muss angesichts der histologischen Befunde der Nieren (glomeruläre Sklerose, diffuse tubuläre Atrophie) auch von einer Proteinurie ausgegangen werden, die von Quaife et al. nicht bei der Bewertung der Gesamteiweißkonzentration berücksichtigt wurde.

Die Cholesterinkonzentration war bei beiden Gruppen nur für die männlichen Tiere signifikant erniedrigt. In Anbetracht der katabolen Stoffwechsellage mit einer präfinalen Gewichtsabnahme ist eine gewisse Malnutrition als Ursache dafür denkbar. Diese ist zudem mit den bei zunehmendem Alter abfallenden Triglyceridspiegeln vereinbar. Eine ähnliche Erniedrigung des Triglyceridspiegels konnte auch bei MT-hGH-transgenen Tieren gezeigt werden (Brem *et al.* 1989).

In der 65 Tage alten Gruppe wiesen sowohl die männlichen als auch die weiblichen Tiere eine Hyperkalzämie auf. Diese ist ein häufiger Befund bei Akromegaliepatienten (Halse & Haugen 1980). Bei Rattenversuchen zeigte sich, dass erhöhte GH-Spiegel mit einer Hyperkalzämie verbunden sind (Sutton & Dirks J. H. 1996).

Der Natriumspiegel war bei beiden Gruppen unauffällig; der Chloridspiegel hingegen war erniedrigt. Eine Entgleisung des Chloridspiegels kann im Zusammenhang mit den Nierenveränderungen als Folge einer gestörten renalen Ausscheidung zu sehen sein (Berry *et al.* 1996).

#### 5.1.3.4 Lebenserwartung

Die Lebensdauer der c $\beta$ a-bGH-transgenen Tiere war drastisch reduziert. Während die Kontrolltiere, FVB Wildtypmäuse, alle älter als ein Jahr wurden, lebten am 107. Lebenstag nur noch 50 % der transgenen Population. Die älteste transgene Maus wurde 187 Tage alt. Als Ursache für die geringe Lebenserwartung können die massiven Veränderungen der Niere angesehen werden. Eine ähnlich geringe Lebenserwartung wiesen mMT-hGH-transgene Tiere auf. Hier erreichten weniger als 30 % der Tiere ein Lebensalter von über 6 Monaten (Wolf 1990). MT-bGH-transgene Tiere zeigten eine nicht ganz so drastische Verkürzung der Lebensspanne. Im Alter von 6 Monaten waren noch 70 % der Mäusepopulation am Leben (Quaife *et al.* 1989). Auch bei diesen GH-transgenen Mäusen wird das Nierenversagen als primäre Todesursache gesehen.

#### 5.1.3.5 Körpergewichtsentwicklung

Das Wachstum der c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäuse und der Kontrolltiere wurde zwischen dem fünften und dem 65. Lebenstag untersucht. Die Tiere wurden bis zum 65. Lebenstag gewogen, da frühere Untersuchungen an GH-transgenen Tieren zeigten, dass das Wachstum bis zu diesem Zeitpunkt am Stärksten ausgeprägt ist.

Die c $\beta$ a-bGH-transgenen Tiere zeigten im Vergleich zu ihren nicht-transgenen Kontrolltieren ab dem 18. Lebenstag einen signifikanten Gewichtsunterschied. Eine beschleunigte Gewichtszunahme ab der dritten Woche wurde schon bei anderen GH-transgenen Tieren beobachtet (Brem *et al.* 1989; Palmiter *et al.* 1983; Wanke *et al.* 1991b; Wolf *et al.* 1991d). Interessanterweise führt die Expression von GH zu einem früheren Zeitpunkt, wie z.B. unter der Kontrolle des PEPCK Promotors (Expression sofort nach der Geburt (McGrane *et al.* 1990)) oder die des MT-Promotors (Beginn der Expression fetal (Bartke *et al.* 1994)) nicht zu einem früheren Beginn der Wachstumsbeschleunigung. Auch diese GH-transgenen Mäuse wiesen erst ab der dritten Woche ein gesteigertes Wachstum im Vergleich zu ihren nicht-transgenen Kontrolltieren auf. Der Phänotyp der homozygoten GHR/BP knockout-Maus tritt auch erst in der dritten Woche in Erscheinung (Zhou *et al.* 1997).

Die Wachstumskurven der transgenen Tiere ließen keinen Geschlechtsdimorphismus erkennen. Das mittlere Gewicht wies zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern auf. Dieses Phänomen konnte auch bei MT-hGH-transgenen Mäusen mit extrem hohen Serum-GH-Spiegeln beobachtet werden (Wolf *et al.* 1991d). Die Aufhebung des Geschlechtsdimorphismus könnte mit dem kontinuierlich hohen GH-Serumspiegel in Zusammenhang stehen. Norstedt *et al.* zeigten an mMT-hGH- und an

mMT-rGH-transgenen Mäusen mit dauerhaft hohen GH-Spiegeln im Serum sowie an Swiss Webster Kontrolltieren, denen hGH mit einer Menge von 2 µg/h subcutan infundiert wurde, dass die hepatische Produktion eines in physiologischer Weise im Harn von männlichen Mäusen in mehrfach höherer Konzentration als bei weiblichen Mäusen vorkommenden major urinary protein (MUP) bei den Swiss Webster Männchen bzw. bei den männlichen hGH- und rGH-transgenen Mäusen unter den der bei weiblichen Tieren gemessenen Wert sank. Eine parallele Entwicklung war für den Gehalt MUP-spezifischer mRNA in der Leber zu beobachten. Umgekehrt hatte die Dauerinfusion (Simulierung eines weiblichen GH-Profiles) von GH einen 10-fach größeren induktiven Effekt auf die Bildung von hepatischen GH- und Prolaktinrezeptoren als intermittierende Injektionen (Simulierung eines männlichen GH-Profiles). Die Autoren schlossen daraus, dass der Modus der GH-Sekretion eine wesentliche Rolle für die geschlechtsspezifische Ausprägung von Leberfunktionen spielt (Norstedt & Palmiter 1984).

### **5.1.3.6 Organometrie**

Nachdem das Gesamtkörpergewicht der cβa-bGH-transgenen Tiere ab dem 18. Lebenstag signifikant höher lag als bei den Kontrolltieren, stellte sich die Frage, ob einzelne Organe von dieser Gewichtszunahme überproportional betroffen sein könnten. Hierzu wurden die Organengewichte am 65. Lebenstag erhoben. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tiere bei gutem Allgemeinbefinden. Bei parenchymatösen Organen, wie Niere oder Leber, kann es zu einer deutlichen Massenreduktion bei Gewichtsverlust kommen. Der Vergleich dieser gewonnenen Ergebnisse mit Daten von anderen GH-transgenen Mausmodellen aus der Literatur ist nur eingeschränkt möglich, da diese Modelle bzw. die Umstände der Datenerhebung in wichtigen Parametern variieren können wie zum Beispiel:

- in der Verwendung verschiedener Promotoren, unter deren Kontrolle das Gen steht,
- in der biologisch speziesspezifischen Wirkung des ausgewählten Wachstumshormons,
- im Alter der Tiere am Tag der Sektion,
- im zeitlichen Abstand zwischen Tötung und Untersuchung mit vorübergehender Konservierung des Tierkörpers,
- im genetischen Background, auf dem die Mäuse gezüchtet wurden.

Das mittlere absolute Gewicht der Organe war bei den cβa-bGH-transgenen Mäusen bis auf wenige Ausnahmen (NN m, ZNS w, Auge w und intraabdominales Fettgewebe w) signifikant

erhöht. Zwischen den Geschlechtern konnte nur bei einzelnen Organen (Leber, Niere, Gl. submandibularis, NN, Harnblase und intraabdominales Fettgewebe) ein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

In ähnlicher Weise ließ sich bei den bisher publizierten GH-transgenen Mäusen eine Erhöhung der absoluten Organgewichte feststellen (Brem *et al.* 1989; Hoeflich *et al.* 2001; Quaife *et al.* 1989). Die dabei gelegentlich auftretenden geschlechtsspezifischen Gewichtsunterschiede in einzelnen Organen waren nicht in allen Linien nachvollziehbar.

Interessanterweise zeigten sich bei den c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäusen trotz Aufhebung des Geschlechtsdimorphismus in Bezug auf das Gesamtkörpergewicht, geschlechtsabhängige Unterschiede im Leber- und Nierengewicht. Ein erhaltener Geschlechtsdimorphismus für die Gewichte dieser Organe wurde ebenfalls bei MT-bGH-transgenen (Quaife *et al.* 1989) und MT-hGH-transgenen Mäusen (Brem *et al.* 1989) beobachtet.

Eine Ausnahme vom allgemeinen Trend einer absoluten Gewichtszunahme der Organe stellte das Gehirn dar. Sein Gewicht war neben den c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäusen auch bei MT-rGH-transgenen Mäusen (Shea *et al.* 1987) und PEPCK-bGH-transgenen Mäusen (Hoeflich *et al.* 2001) nicht signifikant erhöht.

Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigte sich eine signifikante Erhöhung der relativen Gewichte der Leber, der Milz und des Herzens beider Geschlechter. Bei der Harnblase war das Gewicht nur für die männlichen Tiere und das des intraabdominalen Fettgewebes nur für die weiblichen Tiere signifikant erhöht. Einige Organe (Gehirn, Auge, Karkasse, Ovar und Hoden) wiesen ein erniedrigtes relatives Organgewicht auf. Eine ähnliche Verringerung konnte für Lunge und Magen der weiblichen Tieren ermittelt werden. Der Vergleich der männlichen und weiblichen Tiere der transgenen Gruppe zeigt eine Aufhebung des Geschlechtsdimorphismus bei folgenden Organen: Pankreas, Herz, Lunge, Magen, Gehirn und Auge. Bisher konnte bei allen untersuchten GH-transgenen Mäusen, unabhängig vom Promotor und Wahl des Wachstumshormons, eine signifikante Erhöhung des relativen Lebergewichtes (Brem *et al.* 1989; Hoeflich *et al.* 2001; Shea *et al.* 1987; Wanke *et al.* 1991b) festgestellt werden. Die Erhöhung des relativen Milzgewichtes hingegen konnte bei PEPCK-bGH-transgenen (Hoeflich *et al.* 2001) und bei MT-rGH-transgenen (Shea *et al.* 1987) beobachtet werden, während die MT-hGH-transgenen Tiere keine Erhöhung des relativen Milzgewichtes zeigten. Das relative Nierengewicht war, wie bei den meisten vorhandenen GH-transgenen Mausmodellen, nicht erhöht (mit Ausnahme der MT-hGH-transgenen Mäuse (Brem *et al.* 1989)). Das ZNS ist postnatal am Tag 16 bei Nagetieren voll entwickelt (KOBAYASHI 1963). Andere Organe, wie zum Beispiel die

Leber, brauchen bei der Maus bis zur Ausdifferenzierung wesentlich länger. Das gesteigerte Wachstum bei den GH-transgenen Tieren setzt aber erst in der dritten Lebenswoche ein, zu diesem Zeitpunkt hat das ZNS sein Wachstum bereits abgeschlossen.

### **5.1.3.7 Pathomorphologische Veränderungen**

#### **5.1.3.7.1 Pathomorphologische Veränderungen der Niere**

Die Ergebnisse der pathologisch-anatomischen Untersuchung der c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäuse runden das Bild der expressionsbedingten Veränderungen bei diesen Tieren ab. Sie erklären eine Reihe von klinischen Befunden, mithin die klinisch-chemischen Befunde und schließlich auch die reduzierte Lebensspanne der transgenen Tiere. Das zentrale Interesse der pathomorphologischen Untersuchungen war auf Niere und Leber gerichtet, da diese Organe für weitere Proteomics- und Transkriptomics-Analysen zur Verfügung stehen werden. Es wurden drei verschiedene Altersgruppen untersucht, um einen Verlauf der renalen Alterationen darstellen zu können.

#### **5.1.3.7.2 Diskussion der Frühstadien der renalen Alterationen**

Die bei den fünf Wochen alten Tieren erhobenen Befunde zeigen eine Bestätigung früherer Untersuchungen von Wanke et al. an MT-bGH-, MT-hGH- und PEPCK-bGH-transgenen Mäusen, dass eine Glomerulopathie am Beginn der glomerulosklerotischen Entwicklungen steht (Wanke 1996). Untersuchungen an MT-bGH-transgenen Mäusen von anderen Arbeitsgruppen (Doi *et al.* 1990; Doi *et al.* 1988; Quaife *et al.* 1989) sowie PEPCK-bGH-transgenen Mäusen (Striker *et al.* 1995) stimmen ebenfalls darin überein.

Der in der *in situ* Hybridisierung erhobene Befund, dass es zu keiner intraglomerulären Transgenexpression kommt, bestätigte die Vermutungen, dass die glomerulären Alterationen als Ausdruck eines systemischen GH-Effektes zu werten sind (Wanke 1996). Ebenso stehen diese Ergebnisse im Einklang mit Beobachtungen von Doi et al. (Doi *et al.* 1988) an GH- und GHRH-transgenen Tieren. Die Tatsache, dass die GHRH-transgenen Mäuse die gleichen renalen Läsionen wie die GH-transgenen Tiere aufwiesen, ließ Doi et al. zu dem Schluss kommen, die Läsionen seien auf endokrine und nicht auf para- und autokrine Effekte zurückzuführen.

Bei den renalen Frühveränderungen stellten fokal-segmentale glomerulosklerotische Alterationen bei diffuser glomerulärer Hypertrophie die vordergründigen histopathologischen Befunde dar. Diese Befunde stehen im Einklang mit Befunden bei unterschiedlichen

GH-transgenen Mäusen (Doi *et al.* 1990; Doi *et al.* 1988; Wanke *et al.* 1990; Wanke *et al.* 1992). Der auf wenige Glomerula begrenzte sklerotische Prozess entwickelt sich somit auf Basis einer glomerulären Hypertrophie (Wanke 1996). Die glomeruläre Hypertrophie wird von vielen Autoren als pathogenetisches Schlüsselereignis der Glomerulosklerose gewertet (Fogo 1994; Klahr *et al.* 1988).

Die lichtmikroskopisch festgestellten Veränderungen an den hypertrophierten Glomerula umfassten eine segmentale bis globale Mesangiumexpansion mit mesangialer Matrixvermehrung, ein heterogenes Kapillarprofilmuster sowie diverse podozytäre Alterationen. Die fokale bis segmentale Verödung der Glomerula war nahezu ausschließlich durch die Mesangiumexpansion bedingt. Die Bildung von mesangialer Grundsubstanz erfolgt durch die Mesangiumzellen (Venkatachalam & Kriz W. 1992). Als Ursachen für eine Zunahme der extrazellulären glomerulären Matrix kommen grundsätzlich sowohl eine gesteigerte Synthese als auch ein verminderter Abbau oder eine Kombination beider Störungen in Frage (1976). Die Ergebnisse bei MT-bGH-transgenen Mäusen, auf transkriptioneller Ebene an Nierenhomogenaten sowie an isolierten Glomerula durchgeführten Untersuchungen, sprechen dafür, dass eine gesteigerte Produktion für die Vermehrung von Komponenten der extrazellulären glomerulären Matrix von wesentlicher Bedeutung ist (Doi *et al.* 1991; Peten *et al.* 1994).

Von mehreren Untersuchern wird einer Akkumulation von makromolekularen Proteinen im Mesangium eine entscheidende Bedeutung für die Entwicklung und Progression der Glomerulosklerose zugesprochen (Abramowsky *et al.* 1984; Grond *et al.* 1986; Remuzzi & Bertani 1990). Als ursächliche Faktoren werden eine intrakapilläre Hypertension, eine Dysfunktion beziehungsweise Strukturveränderung des Mesangiums sowie Permeabilitätsstörungen der glomerulären Filtrationsbarriere diskutiert (Wanke 1996). Die numerische Volumendichte der Podozyten im Glomerulum war bei MT-bGH-transgenen Tieren gegenüber den Kontrollen hochgradig reduziert (Wanke 1996). Der Autor erklärt dies durch eine Vergrößerung des Glomerulums ohne eine begleitende Vermehrung der Podozyten. Bei diesen Tieren konnte auch ein Schwellenwert der Podozytendichte ermittelt werden, bei dessen Unterschreitung es zu einer deutlich gesteigerten Proteinausschüttung gekommen war. Die herdförmige hyalintropfige Proteinspeicherung in den proximalen Tubuli und die hyalinen Zylinder resultieren aus einer gestörten Permeabilität der glomerulären Filtrationsbarriere.

### 5.1.3.7.3 Diskussion über die Progression der renalen Alterationen

Die Progression der renalen Alterationen zeigte sich histologisch vor allem in der Zunahme der glomerulären Alterationen, Anzeichen einer gesteigerten Proteinurie und den zunehmenden tubulo-interstitiellen Veränderungen.

Die bei den c $\beta$ a-bGH-transgenen Tieren vorliegenden glomerulären Veränderungen waren häufig durch eine variable Kombination von mesangialer Sklerose, segmentaler Hyalinose, Kapillarschlingenkollaps und extrakapillären Läsionen gekennzeichnet. Ferner waren Kapillarschlingen durch Synechien mit der Bowmanschen Kapsel verbunden. Herdförmige Podozytenablösungen von der Basalmembran gelten als ursächlich für das Auftreten von Adhäsionen zwischen dem Schlingenkonvolut und der Bowmanschen Kapsel, wobei eine initiale Anheftung durch parietale Epithelzellen erfolgt, die auf die defekten Kapillarschlingensegmente übertreten (Kriz *et al.* 1994; Nagata & Kriz 1992). In Assoziation mit zirkumskripten Adhäsionen waren immer wieder exsudative Läsionen der Bowmanschen Kapsel zu beobachten, die unter Beteiligung von Monozyten und fibroblastenähnlichen Zellen sekundär fibrosierten. Eine entsprechende Genese für fibrozelluläre Halbmonde wird von (Silva *et al.* 1984) beschrieben.

Bei den transgenen Tieren regelmässig feststellbaren tubulären Alterationen umfassten neben intraluminalen Ansammlungen und Anzeichen einer epithelialen Resorption von Proteinen einerseits degenerative und atrophische Prozesse und andererseits regenerative und hyperplastische Veränderungen des Epithels. Einige der tubulären Alterationen können als Folge einer erhöhten glomerulären Proteinausscheidung beziehungsweise der glomerulosklerotischen Prozesse gewertet werden (Wanke 1996). Tubulusatrophien treten oftmals mit globalen glomerulosklerotischen Prozessen auf. Dies ist durch den Mangel der Versorgung des anschließenden Tubulussegmentes zu erklären. Die peritubulären Kapillaren gehen aus den Glomerulumkapillaren hervor, so dass eine Degeneration des glomerulären Kapillarkonvolutes sekundär auch zu einer Minderversorgung tubulärer Strukturen führt. Die Dilatation der Tubuli mit nachfolgender Zystenbildung umfasste zunächst die proximalen Tubuli und später die distalen Segmente. Tubusdilatation und Zystenbildung gehen stets mit einer Epithelzellproliferation einher, die eine zentrale Stellung in der Zystogenese einnimmt. Experimentell ist dokumentiert, dass eine glomeruläre Proteinurie einen proliferationsfördernden und zystogenen Effekt auf die Tubuli hat (Gröne 1989).

Die interstitiellen Alterationen umfassten fokale Fibrosen und plasmazelluläre, lymphohistozytäre Infiltrationen sowie einzelne hämosiderinbeladene Makrophagen, die in

der Regel mit atrophischen Tubuli assoziiert waren. Mitverantwortlich könnte hier der vermehrte Übertritt von Proteinen in das Interstitium sein, der über das extraglomeruläre Mesangium (Schreiner 1990), über extrakapilläre glomeruläre Läsionen (Rumpelt 1989) sowie in Verbindung mit Tubulusschäden und Aufbruch tubulärer Basalmembran (Remuzzi & Bertani 1990) erfolgen kann.

#### **5.1.3.7.4 Diskussion der Terminalstadien der renalen Alterationen**

Die Finalstadien der renalen Alterationen waren histologisch charakterisiert durch eine diffuse und vorwiegend globale Glomerulumverödung, massive Atrophie von Nephronen, Anzeichen einer hochgradigen Proteinurie, diffuse tubulozystische Veränderungen, eine interstitielle Fibrosierung und Entzündungszellinfiltrationen.

Neben den Mischformen der glomerulären Verödung zeigten sich daneben auch uniforme Varianten der glomerulären Alterationen. Diese wurden in Anlehnung an Thoenes & Rumpelt (1977) sowie Waldherr & Derks (1989) in einen Matrixtyp, einen Hyalinostyp und einen Kollapstyp differenziert. Während in den Frühstadien der renalen Veränderungen der Matrixtyp dominierte, konnte dieser im Terminalstadium der renalen Alterationen nur selten diagnostiziert werden. Viele der alterierten Glomerula zeigten eine globale Hyalinose, die als Ausdruck einer hypertensions- und hyperperfusionsbedingten Schädigung des Glomerulums gewertet werden kann. Für eine Entwicklung der Läsionen gilt eine intraglomeruläre Hypertension als wesentlicher Faktor (Bohle *et al.* 1988; Olson *et al.* 1985).

Die tubulären Alterationen können als Resultat zweier pathologischer Mechanismen gewertet werden, zum einen einer Atrophie, zum anderen einer zystischen Hyperplasie des Epithels. Diese Art von histologischen Veränderungen einschließlich der polypoiden Epithelzellproliferate gleichen den bei der Ratte im Zusammenhang mit einer toxisch bedingten Aufhebung der glomerulären Permeabilität und der daraus resultierenden Proteinurie (Grone *et al.* 1989). Ferner bestehen Parallelen zur erworbenen zystischen Nephropathie des Menschen, die insbesondere bei Langzeitdialysepatienten in terminal geschädigten Nieren eine gefürchtete Komplikation darstellt (Grantham & Levine 1985), die im Gegensatz zu den angeborenen zystischen Nierenerkrankungen eine Präkanzerose darstellt.



### 5.1.3.8 Pathomorphologische Veränderungen der Leber

Leberveränderungen wurden in verschiedenen GH-transgenen Linien beschrieben (Hardy *et al.* 1997; Orian *et al.* 1989; Orian *et al.* 1990; Wanke *et al.* 1991b; Wolf *et al.* 1991a). Regelmäßig wurde bei GH-transgenen Mäusen eine initial zentrolobulär betonte, später diffuse Hypertrophie und Polymorphie der Hepatozyten und ihrer Kerne nachgewiesen. Auch bei den c $\beta$ a-bGH-transgenen Tieren konnte in den drei Altersgruppen eine panlobuläre Hypertrophie der Hepatozyten nachgewiesen werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass bei einer Analyse einer jüngeren Altersgruppe ein initial zentrolobulär betontes Hypertrophiemuster anzutreffen wäre.

Bei älteren GH-transgenen Tieren wird mit zunehmendem Alter das Auftreten von neoplastischen Veränderungen in der Leber berichtet (Orian *et al.* 1989; Orian *et al.* 1990; Snibson 2002; Wanke *et al.* 1991b). Bei den c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäusen der unterschiedlichen Altersgruppen wurden keine neoplastischen Veränderungen festgestellt. Bei einer Maus konnte im Alter von 26 Wochen ein Klarzellfokus identifiziert werden. Bei einem Klarzellfokus handelt es sich um eine präneoplastische Veränderung (Bannasch P. *et al.* 1985). Da die c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäuse nur eine sehr geringe Lebenserwartung aufwiesen, erscheint es wahrscheinlich, dass die Tiere das Auftreten hepatozellulärer Neoplasien nicht mehr erleben.

Hinsichtlich der Pathomechanismen der hepatozellulären Alterationen existieren unterschiedliche Meinungen. Eine zentrolobuläre hepatozelluläre Hypertrophie wurde auch für mMT-bGH- (Quaife *et al.* 1989; Wanke *et al.* 1990), mMT-oGH (Orian *et al.* 1990), PEPCK-bGH (Wanke *et al.* 1991b) und hypersomatotrope mMT-hGRF-transgene Mäuse (Quaife *et al.* 1989) beschrieben. Da bei den mMT-hGRF-transgenen Mäusen die endogene GH-Sekretion in der Hypophyse stimuliert wird und keine hepatische GH-Sekretion erfolgt, scheinen endokrine GH-Wirkungen für die Ausbildung der Leberveränderungen hinreichend zu sein. Die erhöhten systemischen GH-Spiegel scheinen daher dafür verantwortlich zu sein, sei es durch direkte Stimulation der Hepatozyten oder durch sekundäre Mediatoren („blood born factor“), der nicht mit dem IGF-I identisch sein soll und durch die intrahepatische Blutzirkulation vor allem um die Zentralvenen erhöht ist (Quaife *et al.* 1989).

In Anbetracht der Läppchenstruktur, der Zirkulationsverhältnisse der Leberläppchen und der Kinetik der hepatozellulären Veränderungen (initial betont zentrolobulär, später diffus) schlossen Wanke *et al.* 1992 auf eine indirekte, durch einen über einen GH-Stimulus gebildeten sekundären Faktor vermittelte GH-Wirkung mit einem parakrinen Wirkmechanismus.

## 5.2 Diskussion der $\alpha_1$ AT-bGH-transgenen Tiere

Die in dieser Arbeit beschriebenen Mausmodelle wurden im wesentlichen erstellt, um die auftretende Nephropathie auf Proteom- und Transkriptomenebene zu charakterisieren. Um dabei die durch die Progression der Nephropathie erfolgten Veränderungen von denen durch lokale Produktion von bGH, d.h. parakrine und autokrine Effekte, hervorgerufenen Veränderungen zu unterscheiden, wurde versucht ein Tiermodell zu entwickeln, das keine Expression in der Niere zeigt. Als Promotor wurde hierfür der  $\alpha_1$ -Antitrypsin gewählt.

### 5.2.1 In vitro-Austestung des $\alpha_1$ -Antitrypsin-Promotors

Humanes  $\alpha_1$ -Antitrypsin ( $\alpha_1$ -AT) ist ein Proteaseinhibitor im Plasma. Es inhibiert verschiedene Serinproteasen und zählt daher zur Klasse der Serinproteaseinhibitoren. Die Hauptaufgabe des Proteins ist es, den unteren Respirationstrakt vor Schädigungen durch die aus neutrophilen Granulozyten freigesetzte Elastase zu bewahren (Crystal 1990; Olsen *et al.* 1975).  $\alpha_1$ -AT wird hauptsächlich in der Leber (Fagerhol & Cox 1981) und zu einem kleinen Anteil in den Makrophagen produziert. Die Transkription des  $\alpha_1$ -AT steht in der Leber und in den Makrophagen unter der Kontrolle zweier unterschiedlicher zelltypspezifischer Promotoren. Die leberspezifische Promotorregion erlaubt die spezifische Expression eines Reportergens in den Hepatozyten (Perlino *et al.* 1987). Zunächst wurde in vitro verifiziert, dass der  $\alpha_1$ -AT (De Simone *et al.* 1987) Promotor das Transgen in der hepatozellulären Zelllinie, nicht jedoch in der Nierenzelllinie 293 aktivieren kann. Das Konstrukt wurde daher zur Mikroinjektion verwendet.

### 5.2.2 Ergebnisse der Mikroinjektion

Trotz Injektion von 1119 Vorkernen konnte keine stabile transgene Mauslinie etabliert werden. Von den fünf transgenen Tieren aus der Mikroinjektion überlebte ein männliches Tier, das jedoch seinen Phänotyp nicht an die weitere Generation vererbte.

Nachdem bereits Vorversuche mit einer Expression von bGH unter der Kontrolle des Albuminpromotors gescheitert waren, ist es nicht auszuschließen, dass die pränatale Expression von bGH in der Leber auf einem FVB-Inzuchtbackground zu einem Fruchttod führt. Im Jahre 1987 konnten von Pinkert *et al.* eine leberspezifische alb-hGH-transgene Mauslinie erstellt werden (Pinkert *et al.* 1987), jedoch fehlten bei dieser Veröffentlichung die Angaben über den genetischen Background der Mauslinie (siehe Tabelle 4). Auszuchtlinien weisen im Vergleich zu Inzuchtlinien eine höhere Lebensspanne, eine höhere Krankheitsresistenz, eine höhere Reproduktionsrate und eine niedrigere neonatale

Sterblichkeitsrate auf (Hedrich 2004). Züchtungsversuche in unserem eigenen Institut konnten zeigen, dass es bei Einkreuzung eines Auszuchtstammes in eine Inzuchtlinie zu einer signifikanten Steigerung der Überlebensrate der genetisch veränderten Tiere kommt. Ein prozentualer Auszuchtstammanteil an der Mauslinie von Pinkert et al. könnte ein Grund für die erfolgreiche Erstellung der Tiere sein. Um eine pränatale Expression zu umgehen, könnte ein induzierbares Konstrukt eine Lösung des Problems darstellen.

### **5.2.3 Identifizierung und Charakterisierung der Transgenintegration des $h\alpha_1$ AT-bGH Konstruktes**

Zur Charakterisierung des Transgenintegrationsmusters der  $h\alpha_1$ AT-bGH-transgenen Mauslinie wurden Southern Blot-Analysen durchgeführt. Die genomische DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease *Bgl*III verdaut, die im Promotor des Konstruktes schneidet. Die Bande auf Höhe von 2,7 kb entspricht der Konstruktlänge bei einer Tandemintegration in einem head-to-tail Muster (Abbildung 15). Das Fehlen weiterer Flankingbands kann darauf zurückzuführen sein, dass die nächste *Bgl*III-Schnittstelle erst nach mehreren Kilobasen auf der genomischen DNA auftritt. Ein Fragment von dieser Größe kann nicht effektiv auf die Membran übertragen werden.

Die statistische Überprüfung der Vererbung des Transgens nach Dixon und Mood zeigte, dass das Foundertier sein Transgen nicht nach Mendel an seine Nachkommen vererbt hat (Tabelle 17).

In der F1 Generation trat bei diesem Foundertier ein Verlust des Phänotypes der „Riesenmaus“ auf. Der Phänotyp trat auch in den folgenden zwei Generationen nicht wieder in Erscheinung. Als mögliche Ursache für einen solchen Verlust der Transgenexpression kommen epigenetische Modifikationen wie zum Beispiel DNA Methylierung in Frage (Surani et al. 1988).

### **5.2.4 Charakterisierung der Transgenexpression des $h\alpha_1$ AT-bGH-transgenen Foundertieres**

Auf RNA Ebene wurde die Transgenexpression mittels RT-PCR nachgewiesen. Die RT-PCR wurde mit einem intronüberspannenden Primerpaar durchgeführt. Durch die intronüberspannenden Primer kann das Produkt aufgrund der Produktlänge als cDNA von einer eventuell vorliegenden Kontamination mit genomischer DNA unterschieden werden, da im Falle genomischer DNA das dazwischenliegende Intron mitamplifiziert wird. Die Expression des  $c\beta$ a-bGH-Konstruktes konnte in der Leber und im Magen detektiert werden.

Zusammenfassend zeigt die RT-PCR Analyse des  $h\alpha_1AT$ -bGH Foundertieres das erwartete Expressionsmuster von bGH unter der Kontrolle des  $h\alpha_1AT$ -bGH (Perlino *et al.* 1987).

## 6 Zusammenfassung

Nierenerkrankungen stellen aufgrund ihres häufig chronischen Verlaufs einen langen Leidensweg für den Patienten und einen nicht zu vernachlässigenden Kostenpunkt für das Gesundheitswesen dar. Die Erforschung der Faktoren, die in der Progression von Nierenerkrankungen eine Rolle spielen, ist daher nicht nur von wissenschaftlichem, sondern auch von volkswirtschaftlichem Interesse. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erstellung eines Tiermodells, in dem die Veränderungen im Zuge der progressiven Glomerulosklerose auf Proteom- und Transkriptomsebene optimal charakterisiert werden können. Dafür wurde die Überexpression von bovinem Wachstumshormon, die reproduzierbar zu einer gut charakterisierten Kaskade von Nierenveränderung führt, in transgenen Mäusen gewählt. Zur Elimination der eventuell störenden genetischen Variabilität wurde das Modell auf dem Inzuchtstamm FVB erstellt, der keine spontanen Nephropathien aufweist. Als Promoter wurde der ubiquitär aktive c $\beta$ -Promoter gewählt, wodurch zirkulierende GH-Konzentrationen in der Größenordnung von 2-4  $\mu$ g/ml erreicht wurden. Um die Eignung der neuen transgenen Mauslinie für weitere Analysen zu evaluieren, wurden die auftretenden klinischen, klinisch-chemischen, makroskopisch-pathologischen und histologischen Veränderungen eingehend charakterisiert. Die GH-Überexpression führte zu einem deutlich rascheren Gewichtsanstieg unter Aufhebung des Geschlechtsdimorphismus und zu einer stark verringerten Lebenserwartung. Histologisch zeigten sich in der Niere das erwartete Spektrum renaler Alterationen, das weitgehend den in anderen GH-transgenen Mauslinien beobachteten Alterationen gleicht. Anhand der histologischen Befunde und der klinisch-chemischen Anzeichen einer Nierenfunktionseinschränkung, kann die progressive Nephrosklerose am ehesten als Todesursache angesehen werden.

Zusammenfassend wurde mit der c $\beta$ -bGH-transgenen Mauslinie zum ersten Mal ein Modell für chronisch progredientes Nierenversagen auf dem Inzuchtstamm FVB etabliert. Aufgrund der genetischen Uniformität und der in dieser Arbeit beschriebenen klinischen und histologischen Veränderungen erscheint dieses neue Modell hervorragend geeignet, um Pathomechanismen des chronischen Nierenversagens mit holistischen Untersuchungsansätzen (Transcriptomics, Proteomics) auf molekularer Ebene zu charakterisieren.

## 7 Summary

### **Establishment and Characterisation of a Growth Hormone Transgenic Mouse Model on the Inbred Background FVB/N**

Due to their often chronic course, renal diseases represent a major burden not only to the patient as an individual but also to the health care provider. Discovering the mechanisms, that govern the progression of kidney diseases is therefore not only of high scientific but also of economical interest.

The present dissertation describes the establishment of an animal systems which allows for the molecular characterization of these mechanism in an optimized setting. To this end we generated a transgenic mouse model which overexpresses bovine growth hormone (bGH). In other animal models this has been shown to reproducibly lead to a well-characterized sequence of renal alterations. To eliminate influences of genetic variability the transgenic mouse was created in the inbred strain FVB, which does not develop spontaneous renal alterations. The ubiquitously active chicken  $\beta$ -actin promoter was chosen to drive transgene expression and led to circulating bGH concentrations between 2-4  $\mu\text{g/ml}$ . Clinical, clinico-chemical, macroscopic pathological and histological changes were subsequently studied in detail in order to evaluate the suitability of this model for further analyses.

Overexpression of bGH led to a significantly faster weight gain, with abolishment of sexual dimorphism in body weight, and to a markedly reduced life expectancy. Histological analysis showed the expected range of renal alterations resembling those that have been observed in other GH transgenic animals. In conjunction with the results of serum chemical analysis, progressive nephrosclerosis seems to be the most likely cause of death.

In conclusion, a murine model system of chronic progressive renal insufficiency has been generated for the first time in the inbred mouse strain FVB. Given the genetic homogeneity and the well characterized clinical and histological alterations, this new model seems to be highly suitable for the study of pathomechanisms of chronic renal insufficiency using holistic approaches on a molecular level such as proteomics and transcriptomics.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
ADH	anti diuretisches Hormon
ALS	Acid-labile subunit
ALT	Alanin-Amino-Transferase
AP	Alkalische Phosphatase
AP-2	activator protein 2
AST	Aspartat-Amino-Transferase
bGH	bovines Wachstumshormon
BP	Bindungsprotein
Ca	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy DNA
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
CK	Kreatininkinasewert
CMV-IE	immediate-early enhancer des Cytomegalivirus
cpm	counts per minute
Crea	Kreatinin
CREB	cAMP responsive element binding protein
CRP	C-reaktives Protein
CS	Choriosomatammotropin
cβa	chicken-β-actin
DBA	dilute, brown and non agouti
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (acid)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
F	Inzuchtkoeffizient
fc	final concentration
FFA	Freie Fettsäuren
G	Glucocorticoid response element
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

GBM	glomeruläre Basalmembran
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GH	Wachstumshormon
GHBP	growth hormon binding protein
GHF-1	growth hormone factor
GHR	growth hormone receptor
GRF	growth hormone-releasing factor, Somatoliberin
h	Stunde
H&E	Hämalaun-Eosin
HepG2	humane Leberzellkarzionszelllinie
HFL	Hinterfußlänge
hGH	humanes GH
HO	Microsomal Hänoxigenase
HS	Harnsäure
HSPG	Heparan sulfat proteoglycan
HST	Harnstoff
h $\alpha_1$ -AT	humanes $\alpha_1$ -Antitrypsin
IGF-I	insulin like growth factor I
intraabd. Fettgewebe	intraabdominales Fettgewebe
IRS	insulin receptor substrat
JAK2	Januskinase 2
kb	Kilobasen
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
m	männlich
M.	Musculus
MAP	mitogen-activated protein
mg	Milligramm
min	Minute
mMT	Maus Metallothionein I
mRNA	messenger RNA
MT	Metallothionein I



MUP	major urinary protein
NF-1	nuclear factor 1
nm	Nanometer
NRL	Nasen-Rumpf-Länge
OD	optische Dichte
oGH	ovines GH
p.a.	pro analysis
pA	Polyadenylierungssignal
PAGE	polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMS-PAS	Perjodsäure-Methenaminsilber, Schiff'sches Reagenz und Hämalaun Färbung
PAS	Perjodsäure-Schiff
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion
PBS	phosphat buffered saline
PEPCK	Phosphoenopyruvate Carboxykinase
PI3K	Phosphoinositol-3- Kinase
Pit1	Pituitary specific transkription factor 1
PPAR $\alpha$	Peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$
PPAR $\alpha$	Peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$
Prä-GH	Prä-Wachstumshormon
PRL	Prolactin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rGH	rat growth hormone
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcriptase PCR
sec	Sekunde
SIRP	signal regulated protein
SOCS	supressor of cytokine signaling
Sp1	trans-acting transcription factor 1
SPF	spezifisch pathogen frei
SPI	Serin Protease Inhibitor
SREBP	Sterol regulatory element binding protein
SS	Somatostatin

STAT	signal transducers and activators of transcription
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris EDTA
tg	transgen
TP	Gesamteiweißkonzentration
TRE	Thyroid response element
TSA	Tyramide signal amplification
TUNEL	TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling
USF	upstream stimulating factor
V	Volt
w	weiblich
wt	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Transkriptionsregulation des GH Gens.....	6
Abbildung 2: Aktivierung des GHR Signalweges. ....	9
Abbildung 3: HEK 293 Zelllinie.....	27
Abbildung 4: HepG2 Zelllinie.....	28
Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Southern Blot Transfers.....	48
Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Northern Blot Transfers.....	54
Abbildung 7: Schematischer Aufbau des Western Blot Transfers.....	60
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Perfusionsfixation.....	66
Abbildung 9: Schematische Darstellung des c $\beta$ a-bGH Injektionskonstruktes.....	71
Abbildung 10: Schematische Darstellung des h $\alpha$ <sub>1</sub> AT-bGH Injektionskonstruktes. ....	72
Abbildung 11: Austestung des h $\alpha$ <sub>1</sub> AT-bGH und des c $\beta$ a-bGH Konstruktes durch transiente Transfektion in die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293.....	73
Abbildung 12: Austestung des h $\alpha$ <sub>1</sub> AT-bGH und des c $\beta$ a-bGH Konstruktes durch transiente Transfektion in der humanen hepatozellulären Karzinomzelllinie HepG2.....	74
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Sonde für die Southern Blot Analyse.....	75
Abbildung 14: Southern Blot der c $\beta$ a-bGH-transgener Mäuse.....	76
Abbildung 15: Southern Blot der h $\alpha$ <sub>1</sub> AT-bGH-transgener Mäuse.....	77
Abbildung 16: PCR Analyse zur Identifizierung GH-transgener Mäuse.....	77
Abbildung 17: RT PCR-Analyse der c $\beta$ a-bGH Mäuse in verschiedenen Organen. ....	80
Abbildung 18: RT PCR-Analyse der AAT-bGH Maus aus Organen. ....	81
Abbildung 19: Northern Blot-Analyse der bGH-mRNA Expression ausgewählter Organe. ...	82
Abbildung 20: <i>In situ</i> Hybridisierung ohne TSA spezifisch für bGH-mRNA.....	83
Abbildung 21: <i>In situ</i> Hybridisierung mit TSA für bGH-mRNA. ....	84
Abbildung 22: Bestimmung von bGH im Serum verschiedener Generationen (N0-N5). ....	85
Abbildung 23: Western Immunoblotanalyse an Organen einer c $\beta$ a-bGH-transgenen Maus... 85	85
Abbildung 24: bGH in transfizierten Zellen. ....	86
Abbildung 25: bGH-Konzentration im Serum c $\beta$ a-bGH-transgener Mäuse.....	87
Abbildung 26: Lebenserwartung von c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäusen.....	93
Abbildung 27: Gewichtsentwicklung der c $\beta$ a-bGH Mäuse. ....	94
Abbildung 28: Absolute und relative Organgewichte von c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäusen im Verhältnis zu ihren nicht-transgenen Geschwistertieren.....	97
Abbildung 29: Lichtmikroskopische Ausschnitte der Nierenrinde.....	101

Abbildung 30: Glomeruläre Alterationen. ....	103
Abbildung 31: Histologische Anzeichen bei gesteigerter Proteinurie. ....	104
Abbildung 32: Makroskopische Ansicht zweier Nieren. ....	106
Abbildung 33: Übersichtspräparate der Niere.....	106
Abbildung 34: Glomeruläre und interstitielle Läsionen.....	108
Abbildung 35: Leberveränderungen c $\beta$ a-bGH-transgener Mäuse. ....	109

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Physiologische Effekte des Wachstumshormons (Le Roith <i>et al.</i> 2001).....	7
Tabelle 2: GH-transgene Mausmodelle mit Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Promotor..	14
Tabelle 3: GH-transgene Mausmodelle mit Metallothionein I Promotor. ....	15
Tabelle 4: GH-transgene Mausmodelle mit weiteren Promotoren.....	16
Tabelle 5: Übersicht über Organveränderungen bei GH-transgenen Tieren.....	19
Tabelle 6: Verwendete Antikörper.....	28
Tabelle 7: PCR Programm zum bGH und GAPDH Nachweis. ....	46
Tabelle 8: Agarosegelkonzentration für ausgewählte DNA-Fragmentgrößen.....	46
Tabelle 9: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels für jeweils vier Minigele. ....	59
Tabelle 10: Entparaffinieren und Rehydrieren von Paraffinschnitten.....	67
Tabelle 11: H&E Färbung an Paraffinschnitten.....	68
Tabelle 12: PAS Färbung an Paraffinschnitte.....	68
Tabelle 13: H&E Färbung an Kunststoffschnitten.....	69
Tabelle 14: PAS Färbung an Kunststoffschnitten.....	69
Tabelle 15: PAMS-PAS Färbung an Kunststoffschnitten.....	70
Tabelle 16: Vererbung des c $\beta$ a-bGH-Transgens.....	78
Tabelle 17: Vererbung des h $\alpha$ <sub>1</sub> AT-bGH-Transgens.....	79
Tabelle 18: Klinisch chemische Befunde im Serum von c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäusen, Alter 65d.....	89
Tabelle 19: Klinisch chemische Befunde im Serum von c $\beta$ a-bGH-transgenen Mäusen, Alter > 65 d.....	91
Tabelle 20: Absolute Organgewichte am 65. Lebenstag.....	96
Tabelle 21: Relative Organgewichte am 65. Lebenstag.....	99
Tabelle 22: Ausgewählte Tiermodelle mit dem chicken- $\beta$ -actin Promotor. ....	114

## 11 Literaturverzeichnis

Abramowsky CR, Aikawa M, Swinehart GL & Snajdar RM 1984 Spontaneous nephrotic syndrome in a genetic rat model. *Am J Pathol* **117** 400-8.

Aguilar RC, Fernandez HN, Dellacha JM, Calandra RS, Bartke A, Ghosh PK & Turyn D 1992 Somatotropic and lactotropic receptors in transgenic mice expressing human or bovine growth hormone genes. *Transgenic Res* **1** 221-7.

Anderson NG 1992 Growth hormone activates mitogen-activated protein kinase and S6 kinase and promotes intracellular tyrosine phosphorylation in 3T3-F442A preadipocytes. *Biochem J* **284** 649-52.

Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN & Carter-Su C 1993 Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* **74** 237-44.

Ariyasu H, Takaya K, Iwakura H, Hosoda H, Akamizu T, Arai Y, Kangawa K & Nakao K 2005 Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology* **146** 355-64.

Baker AR, Hollingshead PG, Pitts-Meek S, Hansen S, Taylor R & Stewart TA 1992 Osteoblast-specific expression of growth hormone stimulates bone growth in transgenic mice. *Mol Cell Biol* **12** 5541-7.

Balbis A, Bartke A & Turyn D 1996 Overexpression of bovine growth hormone in transgenic mice is associated with changes in hepatic insulin receptors and in their kinase activity. *Life Sci* **59** 1363-71.

Bannasch P., Zerban H. & Hacker H.J. 1985 Foci of altered hepatocytes, rat. In *Monographs on Pathology of Laboratory Animals*, pp 10-30. Eds TC Jones, Mohr U. & Hunt R.D. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.

Barinaga M, Yamamoto G, Rivier C, Vale W, Evans R & Rosenfeld MG 1983 Transcriptional regulation of growth hormone gene expression by growth hormone-releasing factor. *Nature* **306** 84-5.

Bartke A, Cecim M, Tang K, Steger RW, Chandrashekar V & Turyn D 1994 Neuroendocrine and reproductive consequences of overexpression of growth hormone in transgenic mice. *Proc Soc Exp Biol Med* **206** 345-59.

Baumann G, Amburn K & Shaw MA 1988 The circulating growth hormone (GH)-binding protein complex: a major constituent of plasma GH in man. *Endocrinology* **122** 976-84.

Bazan JF 1990 Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87** 6934-8.

BENNETT LL, WEINBERGER H, ESCAMILLA R, MARGEN S, LI CH & EVANS HM 1950 Failure of hypophyseal growth hormone to produce nitrogen storage in a girl with hypophyseal dwarfism. *J Clin Endocrinol Metab* **10** 492-5.

Bilezikjian LM & Vale WW 1983 Stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate production by growth hormone-releasing factor and its inhibition by somatostatin in anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* **113** 1726-31.

Bloch B, Gaillard RC, Brazeau P, Lin HD & Ling N 1984 Topographical and ontogenetic study of the neurons producing growth hormone-releasing factor in human hypothalamus. *Regul Pept* **8** 21-31.

Blundell TL & Humbel RE 1980 Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature* **287** 781-7.

Bohle A, Biwer E & Christensen JA 1988 Hyperperfusion injury of the human kidney in different glomerular diseases. *Am J Nephrol* **8** 179-86.

Bohlen P, Brazeau P, Bloch B, Ling N, Gaillard R & Guillemin R 1983 Human hypothalamic growth hormone releasing factor (GRF): evidence for two forms identical to tumor derived GRF-44-NH<sub>2</sub> and GRF-40. *Biochem Biophys Res Commun* **114** 930-6.

Bohlooly-Y M, Carlson L, Olsson B, Gustafsson H, Andersson IJ, Tornell J & Bergstrom G 2001a Vascular function and blood pressure in GH transgenic mice. *Endocrinology* **142** 3317-23.

Bohlooly-Y M, Olsson B, Gritli-Linde A, Brusehed O, Isaksson OG, Ohlsson C, Soderpalm B & Tornell J 2001b Enhanced spontaneous locomotor activity in bovine GH transgenic mice involves peripheral mechanisms. *Endocrinology* **142** 4560-7.

- Bollano E, Omerovic E, Bohlooly-y M, Kujacic V, Madhu B, Tornell J, Isaksson O, Soussi B, Schulze W, Fu ML, Matejka G, Waagstein F & Isgaard J 2000 Impairment of cardiac function and bioenergetics in adult transgenic mice overexpressing the bovine growth hormone gene. *Endocrinology* **141** 2229-35.
- Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J & Guillemin R 1973 Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* **179** 77-9.
- Brem G, Wanke R, Wolf E, Buchmuller T, Muller M, Brenig B & Hermanns W 1989 Multiple consequences of human growth hormone expression in transgenic mice. *Mol Biol Med* **6** 531-47.
- Brinster RL, Chen HY, Trumbauer M, Senechal AW, Warren R & Palmiter RD 1981 Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell* **27** 223-31.
- Campbell GS, Pang L, Miyasaka T, Saltiel AR & Carter-Su C 1992 Stimulation by growth hormone of MAP kinase activity in 3T3-F442A fibroblasts. *J Biol Chem* **267** 6074-80.
- Carro E, Senaris R, Considine RV, Casanueva FF & Dieguez C 1997 Regulation of in vivo growth hormone secretion by leptin. *Endocrinology* **138** 2203-6.
- Carter-Su C, Rui L & Stofega MR 2000 SH2-B and SIRP: JAK2 binding proteins that modulate the actions of growth hormone. *Recent Prog Horm Res* **55** 293-311.
- Castrillo JL, Theill LE & Karin M 1991 Function of the homeodomain protein GHF1 in pituitary cell proliferation. *Science* **253** 197-9.
- Cecim M, Fadden C, Kerr J, Steger RW & Bartke A 1995a Infertility in transgenic mice overexpressing the bovine growth hormone gene: disruption of the neuroendocrine control of prolactin secretion during pregnancy. *Biol Reprod* **52** 1187-92.
- Cecim M, Kerr J & Bartke A 1995b Effects of bovine growth hormone (bGH) transgene expression or bGH treatment on reproductive functions in female mice. *Biol Reprod* **52** 1144-8.



- Cecim M, Kerr J & Bartke A 1995c Infertility in transgenic mice overexpressing the bovine growth hormone gene: luteal failure secondary to prolactin deficiency. *Biol Reprod* **52** 1162-6.
- Cerdan MG, Young JI, Zino E, Falzone TL, Otero V, Torres HN & Rubinstein M 1998 Accurate spatial and temporal transgene expression driven by a 3.8-kilobase promoter of the bovine beta-casein gene in the lactating mouse mammary gland. *Mol Reprod Dev* **49** 236-45.
- Chen NY, Chen WY & Kopchick JJ 1997 Liver and kidney growth hormone (GH) receptors are regulated differently in diabetic GH and GH antagonist transgenic mice. *Endocrinology* **138** 1988-94.
- Chen WY, Wight DC, Wagner TE & Kopchick JJ 1990 Expression of a mutated bovine growth hormone gene suppresses growth of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87** 5061-5.
- Cheriathundam E, Doi SQ, Knapp JR, Jasser MZ, Kopchick JJ & Alvares AP 1998 Consequences of overexpression of growth hormone in transgenic mice on liver cytochrome P450 enzymes. *Biochem Pharmacol* **55** 1481-7.
- Chow JC, Murray JD, Pomp D, Baldwin RL, Calvert CC & Oberbauer AM 1994 Regulation of insulin-like growth factor-I and binding protein-3 expression in oMta-oGH transgenic mice. *Transgenic Res* **3** 127-33.
- Colligan PB, Brown-Borg HM, Duan J, Ren BH & Ren J 2002 Cardiac contractile function is enhanced in isolated ventricular myocytes from growth hormone transgenic mice. *J Endocrinol* **173** 257-64.
- Conti FG, Powell R, Pozzi L, Zezze G, Faraggiana T, Gannon F & Fabbrini A 1995 A novel line of transgenic mice (RSV/LTR-bGH) expressing growth hormone in cardiac and striated muscle. *Growth Regul* **5** 101-8.
- Cooke NE, Coit D, Weiner RI, Baxter JD & Martial JA 1980 Structure of cloned DNA complementary to rat prolactin messenger RNA. *J Biol Chem* **255** 6502-10.
- Courtois SJ, Lafontaine DA, Lemaigre FP, Durviaux SM & Rousseau GG 1990 Nuclear factor-I and activator protein-2 bind in a mutually exclusive way to overlapping promoter sequences and trans-activate the human growth hormone gene. *Nucleic Acids Res* **18** 57-64.

Crystal RG 1990 Alpha 1-antitrypsin deficiency, emphysema, and liver disease. Genetic basis and strategies for therapy. *J Clin Invest* **85** 1343-52.

Cunningham BC, Ultsch M, De Vos AM, Mulkerrin MG, Clauser KR & Wells JA 1991 Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science* **254** 821-5.

Dastot F, Duquesnoy P, Sobrier ML, Goossens M & Amselem S 1998 Evolutionary divergence of the truncated growth hormone receptor isoform in its ability to generate a soluble growth hormone binding protein. *Mol Cell Endocrinol* **137** 79-84.

De Simone V, Ciliberto G, Hardon E, Paonessa G, Palla F, Lundberg L & Cortese R 1987 Cis- and trans-acting elements responsible for the cell-specific expression of the human alpha 1-antitrypsin gene. *EMBO J* **6** 2759-66.

Devinoy E, Thepot D, Stinnakre MG, Fontaine ML, Grabowski H, Puissant C, Pavirani A & Houdebine LM 1994 High level production of human growth hormone in the milk of transgenic mice: the upstream region of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression to the mammary gland. *Transgenic Res* **3** 79-89.

Doi T, Striker LJ, Gibson CC, Agodoa LY, Brinster RL & Striker GE 1990 Glomerular lesions in mice transgenic for growth hormone and insulinlike growth factor-I. I. Relationship between increased glomerular size and mesangial sclerosis. *Am J Pathol* **137** 541-52.

Doi T, Striker LJ, Kimata K, Peten EP, Yamada Y & Striker GE 1991 Glomerulosclerosis in mice transgenic for growth hormone. Increased mesangial extracellular matrix is correlated with kidney mRNA levels. *J Exp Med* **173** 1287-90.

Doi T, Striker LJ, Quaife C, Conti FG, Palmiter R, Behringer R, Brinster R & Striker GE 1988 Progressive glomerulosclerosis develops in transgenic mice chronically expressing growth hormone and growth hormone releasing factor but not in those expressing insulinlike growth factor-1. *Am J Pathol* **131** 398-403.

Dominici FP, Balbis A, Bartke A & Turyn D 1998 Role of hyperinsulinemia on hepatic insulin receptor concentration and autophosphorylation in the presence of high growth hormone levels in transgenic mice overexpressing growth hormone gene. *J Endocrinol* **159** 15-25.

Dupont J & Holzenberger M 2003 Biology of insulin-like growth factors in development. *Birth Defects Res C Embryo Today* **69** 257-71.

Eckstein F, Lochmuller EM, Koller B, Wehr U, Weusten A, Rambeck W, Hoeflich A & Wolf E 2002 Body composition, bone mass and microstructural analysis in GH-transgenic mice reveals that skeletal changes are specific to bone compartment and gender. *Growth Horm IGF Res* **12** 116-25.

Eden S 1979 Age- and sex-related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* **105** 555-60.

Erhard MH, Kellner J, Schmidhuber S, Schams D & Losch U 1994 Identification of antigenic differences of recombinant and pituitary bovine growth hormone using monoclonal antibodies. *J Immunoassay* **15** 1-19.

Fagerhol MK & Cox DW 1981 The Pi polymorphism: genetic, biochemical, and clinical aspects of human alpha 1-antitrypsin. *Adv Hum Genet* **11** 1-62, 371-2.

Finidori J 2000 Regulators of growth hormone signaling. *Vitam Horm* **59** 71-97.

Fogo A 1994 Internephron heterogeneity of growth factors and sclerosis. *Kidney Int Suppl* **45** S24-6.

Foretz M, Pacot C, Dugail I, Lemarchand P, Guichard C, Le Liepvre X, Berthelie-Lubrano C, Spiegelman B, Kim JB, Ferre P & Foufelle F 1999 ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol Cell Biol* **19** 3760-8.

Frank SJ 2001 Growth hormone signalling and its regulation: preventing too much of a good thing. *Growth Horm IGF Res* **11** 201-12.

Frank SJ, Gilliland G, Kraft AS & Arnold CS 1994 Interaction of the growth hormone receptor cytoplasmic domain with the JAK2 tyrosine kinase. *Endocrinology* **135** 2228-39.

Frank SJ, Yi W, Zhao Y, Goldsmith JF, Gilliland G, Jiang J, Sakai I & Kraft AS 1995 Regions of the JAK2 tyrosine kinase required for coupling to the growth hormone receptor. *J Biol Chem* **270** 14776-85.

Fu ML, Tornell J, Schulze W, Hoebeke J, Isaksson OG, Sandstedt J & Hjalmarson A 2000 Myocardial hypertrophy in transgenic mice overexpressing the bovine growth hormone (bGH) gene. *J Intern Med* **247** 546-52.

Gordon JW & Ruddle FH 1981a Mammalian gonadal determination and gametogenesis. *Science* **211** 1265-71.

Gordon JW & Ruddle FH 1981b Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* **214** 1244-6.

Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA & Ruddle FH 1980 Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77** 7380-4.

Graham FL, Smiley J, Russell WC & Nairn R 1977 Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36** 59-74.

Grantham JJ & Levine E 1985 Acquired cystic disease: replacing one kidney disease with another. *Kidney Int* **28** 99-105.

Grond J, Beukers JY, Schilthuis MS, Weening JJ & Elema JD 1986 Analysis of renal structural and functional features in two rat strains with a different susceptibility to glomerular sclerosis. *Lab Invest* **54** 77-83.

Grone HJ, Walli A, Grone E, Niedmann P, Thiery J, Seidel D & Helmchen U 1989 Induction of glomerulosclerosis by dietary lipids. A functional and morphologic study in the rat. *Lab Invest* **60** 433-46.

Guillemin R, Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Ling N & Wehrenberg WB 1982 Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science* **218** 585-7.

Gum JR Jr, Erickson RH, Hicks JW, Rius JL & Kim YS 2000 Analysis of dipeptidyl peptidase IV gene regulation in transgenic mice: DNA elements sufficient for promoter activity in the kidney, but not the intestine, reside on the proximal portion of the gene 5'-flanking region. *FEBS Lett* **482** 49-53.

Hall MA, Bartke A & Martinko JM 2002 Humoral immune response in mice over-expressing or deficient in growth hormone. *Exp Biol Med (Maywood)* **227** 535-44.

- Halse J & Haugen HN 1980 Calcium and phosphate metabolism in acromegaly. *Acta Endocrinol (Copenh)* **94** 459-67.
- Hammer RE, Brinster RL & Palmiter RD 1985 Use of gene transfer to increase animal growth. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **50** 379-87.
- Hammer RE, Palmiter RD & Brinster RL 1984 Partial correction of murine hereditary growth disorder by germ-line incorporation of a new gene. *Nature* **311** 65-7.
- Hansson HA, Billig H & Isgaard J 1989 Insulin-like growth factor I in the developing and mature rat testis: immunohistochemical aspects. *Biol Reprod* **40** 1321-8.
- Hardy CL, Bhathal PS, Snibson KJ & Adams TE 1997 Comparison of intrahepatic lymphocytes from normal and growth hormone transgenic mice with chronic hepatitis and liver cancer. *Immunology* **90** 412-20.
- Herrington J & Carter-Su C 2001 Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab* **12** 252-7.
- Herrington J, Smit LS, Schwartz J & Carter-Su C 2000 The role of STAT proteins in growth hormone signaling. *Oncogene* **19** 2585-97.
- Hoeflich A, Nedbal S, Blum WF, Erhard M, Lahm H, Brem G, Kolb HJ, Wanke R & Wolf E 2001 Growth inhibition in giant growth hormone transgenic mice by overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2. *Endocrinology* **142** 1889-98.
- Hoeflich A, Weber MM, Fisch T, Nedbal S, Fottner C, Elmlinger MW, Wanke R & Wolf E 2002 Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) separates hypertrophic and hyperplastic effects of growth hormone (GH)/IGF-I excess on adrenocortical cells in vivo. *FASEB J* **16** 1721-31.
- Hokken-Koelega AC, Hackeng WH, Stijnen T, Wit JM, de Muinck Keizer-Schrama SM & Drop SL 1990 Twenty-four-hour plasma growth hormone (GH) profiles, urinary GH excretion, and plasma insulin-like growth factor-I and -II levels in prepubertal children with chronic renal insufficiency and severe growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* **71** 688-95.
- Horton CE Jr, Davisson MT, Jacobs JB, Bernstein GT, Retik AB & Mandell J 1988 Congenital progressive hydronephrosis in mice: a new recessive mutation. *J Urol* **140** 1310-5.

- Ihle JN 2001 The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol* **13** 211-7.
- Iida K, Del Rincon JP, Kim DS, Itoh E, Nass R, Coschigano KT, Kopchick JJ & Thorner MO 2004 Tissue-specific regulation of growth hormone (GH) receptor and insulin-like growth factor-I gene expression in the pituitary and liver of GH-deficient (lit/lit) mice and transgenic mice that overexpress bovine GH (bGH) or a bGH antagonist. *Endocrinology* **145** 1564-70.
- Ikeguchi Y, Wang X, McCloskey DE, Coleman CS, Nelson P, Hu G, Shantz LM & Pegg AE 2004 Characterization of transgenic mice with widespread overexpression of spermine synthase. *Biochem J* **381** 701-7.
- Imaki T, Shibasaki T, Shizume K, Masuda A, Hotta M, Kiyosawa Y, Jibiki K, Demura H, Tsushima T & Ling N 1985 The effect of free fatty acids on growth hormone (GH)-releasing hormone-mediated GH secretion in man. *J Clin Endocrinol Metab* **60** 290-3.
- Isaksson OG, Lindahl A, Nilsson A & Isgaard J 1988 Action of growth hormone: current views. *Acta Paediatr Scand Suppl* **343** 12-8.
- Isoda K, Nishikawa K, Kamezawa Y, Yoshida M, Kusuhara M, Moroi M, Tada N & Ohsuzu F 2002 Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation. *Circ Res* **91** 77-82.
- Jetton TL, Liang Y, Pettepher CC, Zimmerman EC, Cox FG, Horvath K, Matschinsky FM & Magnuson MA 1994 Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and identification of glucokinase in rare neuroendocrine cells in the brain and gut. *J Biol Chem* **269** 3641-54.
- Jones JI & Clemmons DR 1995 Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* **16** 3-34.
- Kaps M, Moura AS, Safranski TJ & Lamberson WR 1999 Components of growth in mice hemizygous for a MT/bGH transgene. *J Anim Sci* **77** 1148-54.
- Klahr S, Schreiner G & Ichikawa I 1988 The progression of renal disease. *N Engl J Med* **318** 1657-66.
- Knopf JL, Gallagher JF & Held WA 1983 Differential, multihormonal regulation of the mouse major urinary protein gene family in the liver. *Mol Cell Biol* **3** 2232-40.

Knowles BB, Howe CC & Aden DP 1980 Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **209** 497-9.

KOBAYASHI T 1963 Brain-to-body ratios and time of maturation of the mouse brain. *Am J Physiol* **204** 343-6.

Kobayashi T & Ohta Y 2003 Enforced expression of oxygen-regulated protein, ORP150, induces vacuolar degeneration in mouse myocardium. *Transgenic Res* **12** 13-22.

Koga T, Urata H, Inoue Y, Hoshino T, Okamoto T, Matsunaga A, Suzuki M, Miyazaki J, Ideishi M, Arakawa K & Saku K 2003 Human chymase expression in a mice induces mild hypertension with left ventricular hypertrophy. *Hypertens Res* **26** 759-68.

Kopchick JJ & Andry JM 2000 Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Mol Genet Metab* **71** 293-314.

Kriz W, Elger M, Nagata M, Kretzler M, Uiker S, Koeppen-Hageman I, Tenschert S & Lemley KV 1994 The role of podocytes in the development of glomerular sclerosis. *Kidney Int Suppl* **45** S64-72.

Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL & Butler A 2001 The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* **22** 53-74.

Lefevre C, Imagawa M, Dana S, Grindlay J, Bodner M & Karin M 1987 Tissue-specific expression of the human growth hormone gene is conferred in part by the binding of a specific trans-acting factor. *EMBO J* **6** 971-81.

Lemaigre FP, Lafontaine DA, Courtois SJ, Durviaux SM & Rousseau GG 1990 Sp1 can displace GHF-1 from its distal binding site and stimulate transcription from the growth hormone gene promoter. *Mol Cell Biol* **10** 1811-4.

Lin TP 1966 Microinjection of mouse eggs. *Science* **151** 333-7.

Ling N, Esch F, Bohlen P, Brazeau P, Wehrenberg WB & Guillemin R 1984 Isolation, primary structure, and synthesis of human hypothalamic somatocinin: growth hormone-releasing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81** 4302-6.

Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ & Baltimore D 2002 Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* **295** 868-72.

- Lussier BT, Wood DA, French MB, Moor BC & Kraicer J 1991 Free intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) and growth hormone release from purified rat somatotrophs. II. Somatostatin lowers. *Endocrinology* **128** 583-91.
- Maes M, De Hertogh R, Watrin-Granger P & Ketelslegers JM 1983 Ontogeny of liver somatotrophic and lactogenic binding sites in male and female rats. *Endocrinology* **113** 1325-32.
- Maniatis T, Jeffrey A & Kleid DG 1975 Nucleotide sequence of the rightward operator of phage lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72** 1184-8.
- Martial JA, Hallewell RA, Baxter JD & Goodman HM 1979 Human growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria. *Science* **205** 602-7.
- Martinez V, Balbin M, Ordonez FA, Rodriguez J, Garcia E, Medina A & Santos F 1999 Hepatic expression of growth hormone receptor/binding protein and insulin-like growth factor I genes in uremic rats. Influence of nutritional deficit. *Growth Horm IGF Res* **9** 61-8.
- McCormick A, Brady H, Theill LE & Karin M 1990 Regulation of the pituitary-specific homeobox gene GHF1 by cell-autonomous and environmental cues. *Nature* **345** 829-32.
- McGrane MM, de Vente J, Yun J, Bloom J, Park E, Wynshaw-Boris A, Wagner T, Rottman FM & Hanson RW 1988 Tissue-specific expression and dietary regulation of a chimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase/bovine growth hormone gene in transgenic mice. *J Biol Chem* **263** 11443-51.
- McGrane MM, Yun JS, Moorman AF, Lamers WH, Hendrick GK, Arafah BM, Park EA, Wagner TE & Hanson RW 1990 Metabolic effects of developmental, tissue-, and cell-specific expression of a chimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)/bovine growth hormone gene in transgenic mice. *J Biol Chem* **265** 22371-9.
- Meinhardt U, Eble A, Besson A, Strasburger CJ, Sraer JD & Mullis PE 2003 Regulation of growth-hormone-receptor gene expression by growth hormone and pegvisomant in human mesangial cells. *Kidney Int* **64** 421-30.
- Miller WL & Eberhardt NL 1983 Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocr Rev* **4** 97-130.



Miller WL, Martial JA & Baxter JD 1980 Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA. *J Biol Chem* **255** 7521-4.

Milton S, Cecim M, Li YS, Yun JS, Wagner TE & Bartke A 1992 Transgenic female mice with high human growth hormone levels are fertile and capable of normal lactation without having been pregnant. *Endocrinology* **131** 536-8.

Miyazaki J, Takaki S, Araki K, Tashiro F, Tominaga A, Takatsu K & Yamamura K 1989 Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene* **79** 269-77.

Mode A, Gustafsson JA, Jansson JO, Eden S & Isaksson O 1982 Association between plasma level of growth hormone and sex differentiation of hepatic steroid metabolism in the rat. *Endocrinology* **111** 1692-7.

Moore DD, Marks AR, Buckley DI, Kapler G, Payvar F & Goodman HM 1985 The first intron of the human growth hormone gene contains a binding site for glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82** 699-702.

Muggeo M, Tiengo A, Fedele D & Crepaldi G 1975 The influence of plasma triglycerides on human growth hormone response to arginine and insulin: a study in hyperlipemics and normal subjects. *Horm Metab Res* **7** 367-74.

Naar EM, Bartke A, Majumdar SS, Buonomo FC, Yun JS & Wagner TE 1991 Fertility of transgenic female mice expressing bovine growth hormone or human growth hormone variant genes. *Biol Reprod* **45** 178-87.

Nagata M & Kriz W 1992 Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. II. Mechanical stress on podocytes as a pathway to sclerosis. *Kidney Int* **42** 148-60.

Niall HD, Hogan ML, Sauer R, Rosenblum IY & Greenwood FC 1971 Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68** 866-70.

Nilsson A, Isgaard J, Lindahl A, Dahlstrom A, Skottner A & Isaksson OG 1986 Regulation by growth hormone of number of chondrocytes containing IGF-I in rat growth plate. *Science* **233** 571-4.

- Niwa H, Yamamura K & Miyazaki J 1991 Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108** 193-9.
- Norstedt G 1982 A comparison between the effects of growth hormone on prolactin receptors and estrogen receptors in rat liver. *Endocrinology* **110** 2107-12.
- Norstedt G & Palmiter R 1984 Secretory rhythm of growth hormone regulates sexual differentiation of mouse liver. *Cell* **36** 805-12.
- Ogueta S, Olazabal I, Santos I, Delgado-Baeza E & Garcia-Ruiz JP 2000 Transgenic mice expressing bovine GH develop arthritic disorder and self-antibodies. *J Endocrinol* **165** 321-8.
- Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T & Nishimune Y 1997 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* **407** 313-9.
- Olsen GN, Harris JO, Castle JR, Waldman RH & Karmgard HJ 1975 Alpha-1-antitrypsin content in the serum, alveolar macrophages, and alveolar lavage fluid of smoking and nonsmoking normal subjects. *J Clin Invest* **55** 427-30.
- Olson JL, de Urdaneta AG & Heptinstall RH 1985 Glomerular hyalinosis and its relation to hyperfiltration. *Lab Invest* **52** 387-98.
- Olsson B, Bohlooly-Y M, Brusehed O, Isaksson OG, Ahren B, Olofsson SO, Oscarsson J & Tornell J 2003 Bovine growth hormone-transgenic mice have major alterations in hepatic expression of metabolic genes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285** E504-11.
- Orian JM, Lee CS, Weiss LM & Brandon MR 1989 The expression of a metallothionein-ovine growth hormone fusion gene in transgenic mice does not impair fertility but results in pathological lesions in the liver. *Endocrinology* **124** 455-63.
- Orian JM, O'Mahoney JV & Brandon MR 1988 Cloning and sequencing of the ovine growth hormone gene. *Nucleic Acids Res* **16** 9046.
- Orian JM, Snibson K, Stevenson JL, Brandon MR & Herington AC 1991 Elevation of growth hormone (GH) and prolactin receptors in transgenic mice expressing ovine GH. *Endocrinology* **128** 1238-46.

- Orian JM, Tamakoshi K, Mackay IR & Brandon MR 1990 New murine model for hepatocellular carcinoma: transgenic mice expressing metallothionein-ovine growth hormone fusion gene. *J Natl Cancer Inst* **82** 393-8.
- Ornitz DM, Palmiter RD, Hammer RE, Brinster RL, Swift GH & MacDonald RJ 1985 Specific expression of an elastase-human growth hormone fusion gene in pancreatic acinar cells of transgenic mice. *Nature* **313** 600-2.
- Paek I & Axel R 1987 Glucocorticoids enhance stability of human growth hormone mRNA. *Mol Cell Biol* **7** 1496-507.
- Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC & Evans RM 1982 Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* **300** 611-5.
- Palmiter RD, Norstedt G, Gelinis RE, Hammer RE & Brinster RL 1983 Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science* **222** 809-14.
- Patel YM, Yun JS, Liu J, McGrane MM & Hanson RW 1994 An analysis of regulatory elements in the phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene which are responsible for its tissue-specific expression and metabolic control in transgenic mice. *J Biol Chem* **269** 5619-28.
- Perlino E, Cortese R & Ciliberto G 1987 The human alpha 1-antitrypsin gene is transcribed from two different promoters in macrophages and hepatocytes. *EMBO J* **6** 2767-71.
- Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y & Yanagimachi R 1999 Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* **284** 1180-3.
- Peten EP, Yang CW, Striker GE & Striker LJ 1994 Gene activation in glomerulosclerosis: a role for growth promoting hormones. *Kidney Int Suppl* **45** S48-50.
- Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y & Verma IM 2002 Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** 2140-5.
- Phelps CJ & Bartke A 1997 Stimulatory effect of human, but not bovine, growth hormone expression on numbers of tuberoinfundibular dopaminergic neurons in transgenic mice. *Endocrinology* **138** 2849-55.

- Pinkert CA, Ornitz DM, Brinster RL & Palmiter RD 1987 An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice. *Genes Dev* **1** 268-76.
- Prins GS, Cecim M, Birch L, Wagner TE & Bartke A 1992 Growth response and androgen receptor expression in seminal vesicles from aging transgenic mice expressing human or bovine growth hormone genes. *Endocrinology* **131** 2016-23.
- Quaife CJ, Mathews LS, Pinkert CA, Hammer RE, Brinster RL & Palmiter RD 1989 Histopathology associated with elevated levels of growth hormone and insulin-like growth factor I in transgenic mice. *Endocrinology* **124** 40-8.
- Remuzzi G & Bertani T 1990 Is glomerulosclerosis a consequence of altered glomerular permeability to macromolecules? *Kidney Int* **38** 384-94.
- Romen W 1976 *Zur Pathogenese der Glomerulosklerose: Ultrastrukturelle und autoradiographische Untersuchungen an der Rattenniere*. Fischer, Stuttgart, New York.
- Rumpelt HJ 1989 [Clinical pathology of the glomerulus--from phenomenon to entity. The extracapillary lesion]. *Verh Dtsch Ges Pathol* **73** 83-93.
- Sandstedt J, Ohlsson C, Norjavaara E, Nilsson J & Tornell J 1994 Disproportional bone growth and reduced weight gain in gonadectomized male bovine growth hormone transgenic and normal mice. *Endocrinology* **135** 2574-80.
- Sandstedt J, Tornell J, Norjavaara E, Isaksson OG & Ohlsson C 1996 Elevated levels of growth hormone increase bone mineral content in normal young mice, but not in ovariectomized mice. *Endocrinology* **137** 3368-74.
- Sawicki JA, Morris RJ, Monks B, Sakai K & Miyazaki J 1998 A composite CMV-IE enhancer/beta-actin promoter is ubiquitously expressed in mouse cutaneous epithelium. *Exp Cell Res* **244** 367-9.
- Schreiner GF 1990 Pathways leading from glomerular injury to glomerulosclerosis. *Contrib Nephrol* **86** 1-14; discussion 15-8.
- Selden RF, Wagner TE, Blethen S, Yun JS, Rowe ME & Goodman HM 1988 Expression of the human growth hormone variant gene in cultured fibroblasts and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85** 8241-5.

Selden RF, Yun JS, Moore DD, Rowe ME, Malia MA, Wagner TE & Goodman HM 1989 Glucocorticoid regulation of human growth hormone expression in transgenic mice and transiently transfected cells. *J Endocrinol* **122** 49-60.

Serra D, Fillat C, Matas R, Bosch F & Hegardt FG 1996 Tissue-specific expression and dietary regulation of chimeric mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase/human growth hormone gene in transgenic mice. *J Biol Chem* **271** 7529-34.

Shanahan CM, Rigby NW, Murray JD, Marshall JT, Townrow CA, Nancarrow CD & Ward KA 1989 Regulation of expression of a sheep metallothionein 1a-sheep growth hormone fusion gene in transgenic mice. *Mol Cell Biol* **9** 5473-9.

Shea BT, Hammer RE & Brinster RL 1987 Growth allometry of the organs in giant transgenic mice. *Endocrinology* **121** 1924-30.

Shen LP, Pictet RL & Rutter WJ 1982 Human somatostatin I: sequence of the cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79** 4575-9.

Shuto Y, Nakano T, Sanno N, Domoto H, Sugihara H & Wakabayashi I 1999 Reduced growth hormone receptor messenger ribonucleic acid in an aged man with chronic malnutrition and growth hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab* **84** 2320-3.

Silva FG, Hoyer JR & Pirani CL 1984 Sequential studies of glomerular crescent formation in rats with antiglomerular basement membrane-induced glomerulonephritis and the role of coagulation factors. *Lab Invest* **51** 404-15.

Sjogren K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V, LeRoith D, Tornell J, Isaksson OG, Jansson JO & Ohlsson C 1999 Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** 7088-92.

Slater EP, Rabenau O, Karin M, Baxter JD & Beato M 1985 Glucocorticoid receptor binding and activation of a heterologous promoter by dexamethasone by the first intron of the human growth hormone gene. *Mol Cell Biol* **5** 2984-92.

Snibson KJ 2002 Hepatocellular kinetics and the expression of growth hormone (GH) in the livers and liver tumours of GH-transgenic mice. *Tissue Cell* **34** 88-97.

- Soderpalm B, Ericson M, Bohlooly M, Engel JA & Tornell J 1999 Bovine growth hormone transgenic mice display alterations in locomotor activity and brain monoamine neurochemistry. *Endocrinology* **140** 5619-25.
- Soriano P, Cone RD, Mulligan RC & Jaenisch R 1986 Tissue-specific and ectopic expression of genes introduced into transgenic mice by retroviruses. *Science* **234** 1409-13.
- Sotelo AI, Bartke A & Turyn D 1993 Effects of bovine growth hormone (GH) expression in transgenic mice on serum and pituitary immunoreactive mouse GH levels and pituitary GH-releasing factor binding sites. *Acta Endocrinol (Copenh)* **129** 446-52.
- Sotelo AI, Dominici FP, Engbers C, Bartke A, Talamantes F & Turyn D 1995 Growth hormone-binding protein in normal mice and in transgenic mice expressing bovine growth hormone gene. *Am J Physiol* **268** E745-51.
- Stefaneanu L, Kovacs K, Bartke A, Mayerhofer A & Wagner TE 1993 Pituitary morphology of transgenic mice expressing bovine growth hormone. *Lab Invest* **68** 584-91.
- Steger RW, Bartke A, Parkening TA, Collins T, Buonomo FC, Tang KC, Wagner TE & Yun JS 1991 Effects of heterologous growth hormones on hypothalamic and pituitary function in transgenic mice. *Neuroendocrinology* **53** 365-72.
- Stewart TA, Clift S, Pitts-Meek S, Martin L, Terrell TG, Liggitt D & Oakley H 1992 An evaluation of the functions of the 22-kilodalton (kDa), the 20-kDa, and the N-terminal polypeptide forms of human growth hormone using transgenic mice. *Endocrinology* **130** 405-14.
- Stofega MR, Argetsinger LS, Wang H, Ullrich A & Carter-Su C 2000 Negative regulation of growth hormone receptor/JAK2 signaling by signal regulatory protein alpha. *J Biol Chem* **275** 28222-9.
- Striker GE, He CJ, Liu ZH, Yang DC, Zalups RK, Esposito C & Striker LJ 1995 Pathogenesis of nonimmune glomerulosclerosis: studies in animals and potential applications to humans. *Lab Invest* **73** 596-605.
- Surani MA, Reik W & Allen ND 1988 Transgenes as molecular probes for genomic imprinting. *Trends Genet* **4** 59-62.

Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K & Nakao K 2000 Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **85** 4908-11.

Taketo M, Schroeder AC, Mobraaten LE, Gunning KB, Hanten G, Fox RR, Roderick TH, Stewart CL, Lilly F, Hansen CT & et al 1991 FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** 2065-9.

Tannenbaum GS, Gurd W & Lapointe M 1998 Leptin is a potent stimulator of spontaneous pulsatile growth hormone (GH) secretion and the GH response to GH-releasing hormone. *Endocrinology* **139** 3871-5.

Tannenbaum GS & Martin JB 1976 Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* **98** 562-70.

Thoenes W & Rumpelt HJ 1977 The obsolescent renal glomerulus--collapse, sclerosis, hyalinosis, fibrosis. A light- and electron microscopical study on human biopsies. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* **377** 1-15.

Thorey IS, Hinz B, Hoeflich A, Kaesler S, Bugnon P, Elmlinger M, Wanke R, Wolf E & Werner S 2004 Transgenic mice reveal novel activities of growth hormone in wound repair, angiogenesis, and myofibroblast differentiation. *J Biol Chem* **279** 26674-84.

Turyn D & Bartke A 1993 Pharmacokinetics of radioiodinated human and ovine growth hormones in transgenic mice expressing bovine growth hormone. *Transgenic Res* **2** 219-26.

Udy GB, Towers RP, Snell RG, Wilkins RJ, Park SH, Ram PA, Waxman DJ & Davey HW 1997 Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** 7239-44.

Ueno N, Inui A, Iwamoto M, Kaga T, Asakawa A, Okita M, Fujimiya M, Nakajima Y, Ohmoto Y, Ohnaka M, Nakaya Y, Miyazaki JI & Kasuga M 1999 Decreased food intake and body weight in pancreatic polypeptide-overexpressing mice. *Gastroenterology* **117** 1427-32.

Valera A, Rodriguez-Gil JE, Yun JS, McGrane MM, Hanson RW & Bosch F 1993 Glucose metabolism in transgenic mice containing a chimeric P-enolpyruvate carboxykinase/bovine growth hormone gene. *FASEB J* **7** 791-800.

- VanderKuur JA, Wang X, Zhang L, Campbell GS, Allevato G, Billestrup N, Norstedt G & Carter-Su C 1994 Domains of the growth hormone receptor required for association and activation of JAK2 tyrosine kinase. *J Biol Chem* **269** 21709-17.
- Venkatachalam MA & Kriz W. 1992 Pathology of the kidney. In *Anatomy*, edn 4th, pp 1-92. Little, Brown, Boston, Toronto, London .
- Wagner TE, Hoppe PC, Jollick JD, Scholl DR, Hodinka RL & Gault JB 1981 Microinjection of a rabbit beta-globin gene into zygotes and its subsequent expression in adult mice and their offspring. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78** 6376-80.
- Waldherr R & Derks H 1989 [Clinical pathology of the glomerulus--from phenomenon to entity. Focal sclerosis]. *Verh Dtsch Ges Pathol* **73** 71-82.
- Wanke R, Hermanns W, Folger S, Wolf E & Brem G 1991b Accelerated growth and visceral lesions in transgenic mice expressing foreign genes of the growth hormone family: an overview. *Pediatr Nephrol* **5** 513-21.
- Wanke R, Milz S, Rieger N, Ogiolda L, Renner-Muller I, Brem G, Hermanns W & Wolf E 1999 Overgrowth of skin in growth hormone transgenic mice depends on the presence of male gonads. *J Invest Dermatol* **113** 967-71.
- Wanke R, Wolf E, Brem G & Hermanns W 2001 [Role of podocyte damage in the pathogenesis of glomerulosclerosis and tubulointerstitial lesions: findings in the growth hormone transgenic mouse model of progressive nephropathy]. *Verh Dtsch Ges Pathol* **85** 250-6.
- Wanke R, Wolf E, Hermanns W, Folger S, Buchmuller T & Brem G 1992 The GH-transgenic mouse as an experimental model for growth research: clinical and pathological studies. *Horm Res* **37 Suppl 3** 74-87.
- Wolf E, Kahnt E, Ehrlein J, Hermanns W, Brem G & Wanke R 1993 Effects of long-term elevated serum levels of growth hormone on life expectancy of mice: lessons from transgenic animal models. *Mech Ageing Dev* **68** 71-87.
- Wolf E, Rapp K & Brem G 1991a Expression of metallothionein-human growth hormone fusion genes in transgenic mice results in disproportionate skeletal gigantism. *Growth Dev Aging* **55** 117-27.



Wolf E, Rapp K, Wanke R, Hermanns W, Pirchner F, von Butler-Wemken I & Brem G 1991b Growth characteristics of metallothionein-human growth hormone transgenic mice as compared to mice selected for high eight-week body weight and unselected controls. II. Skeleton. *Growth Dev Aging* **55** 237-48.

Wolf E, Wanke R., Hermanns W. & Brem G. 1991c Fortschritte in der Tierzucht. In: Die Wachstumshormon-transgenen Maus- Möglichkeiten und Grenzen eines Überexpressionsmodells, pp 463-511. Stuttgart: Ulmer Verlag.

Wolf E, Wanke R, Hermanns W, Brem G, Pirchner F & von Butler-Wemken I 1991d Growth characteristics of metallothionein-human growth hormone transgenic mice as compared to mice selected for high eight-week body weight and unselected controls. I. Body weight gain and external body dimensions. *Growth Dev Aging* **55** 225-35.

Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA & Bloom SR 2000 The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* **141** 4325-8.

Zatz R & Fujihara CK 1994 Glomerular hypertrophy and progressive glomerulopathy. Is there a definite pathogenetic correlation? *Kidney Int Suppl* **45** S27-9; discussion S30-1.

Zhang W, Brooks RL, Silversides DW, West BL, Leidig F, Baxter JD & Eberhardt NL 1992 Negative thyroid hormone control of human growth hormone gene expression is mediated by 3'-untranslated/3'-flanking DNA. *J Biol Chem* **267** 15056-63.

Zhang Y, Jiang J, Kopchick JJ & Frank SJ 1999 Disulfide linkage of growth hormone (GH) receptors (GHR) reflects GH-induced GHR dimerization. Association of JAK2 with the GHR is enhanced by receptor dimerization. *J Biol Chem* **274** 33072-84.

Zhou Y, Xu BC, Maheshwari HG, He L, Reed M, Lozykowski M, Okada S, Cataldo L, Coschigamo K, Wagner TE, Baumann G & Kopchick JJ 1997 A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** 13215-20.

Zhu T, Goh EL, Graichen R, Ling L & Lobie PE 2001 Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell Signal* **13** 599-616

## Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Wolf für die Überlassung des Themas und sein Vertrauen bei der Durchführung meiner Arbeit. Besonders bedanken möchte ich mich für die Unterstützung, die er mir stets zuteil werden ließ sowie für die vielen hilfreichen Hinweise, den Anregungen bei der Durchführung und der kritischen Durchsicht dieser Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. R. Wanke für die freundliche und engagierte Betreuung des pathologischen Teils meiner Arbeit, die anregenden Diskussionen und die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Dr. Marlon R. Schneider, Dr. Ottheinz Krebs und Dr. Marc Boelhauve danke ich ganz herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung dieses Projektes. In vielen Stunden ihrer freien Zeit standen sie mir mit Rat und Tat zur Seite.

Frau Dr. N. Herbach bin ich zu besonderem Dank verpflichtet, da Sie mir bei allen pathologischen Fragestellungen während meiner Arbeit stets eine sehr große Hilfe war.

Allen meinen Kollegen und Mitarbeitern sei an dieser Stelle mein herzlichster Dank ausgedrückt. Nur mit Eurer Hilfe konnte ich den vielen Anforderungen, die dieses Projekt mit sich gebracht hat, gerecht werden. Allen voran danke ich Tamara Holy für die unzähligen Mikroinjektionen, Frau H. Alt, Frau P. Demleitner und Herrn S. Schiller für die großen und kleinen Hilfen im Labor. Frau L. Pichl möchte ich für die Anfertigung der histologischen Schnitte danken.

Nicht zu vergessen sind die Mitarbeiter des Tierstalls am Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Dr. I. Renner-Müller, A. Martin, T. Mittmann und P. Renner, die sich sehr liebevoll um die Hauptdarsteller dieser Arbeit gekümmert haben, meine Mäuse.

Prof. Dr. M. Erhards danke ich herzlich für die Überlassung des bGH-Antikörpers und für die bGH-Konzentrationsbestimmung im Serum der Versuchstiere.

Danken möchte ich auch der German Mouse Clinic, insbesondere Frau Dr. Martina Klempt für die Durchführung der klinisch chemischen Untersuchungen.

Ferner danke ich Herrn J. Stanglmeier für die statistische Interpolierung der Gewichtsdaten.

Herrn Dr. D. Rauleder danke ich für die Unterstützung und Hilfe bei allen Arbeiten, die ich am Institut für Tierpathologie durchgeführt habe.

Ein herzliches Dankeschön gilt allen Doktoranden aus dem Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, die mich in der Zeit meiner Dissertation durch Höhen und Tiefen begleitet haben.

Am Ende meiner Danksagung dürfen die wichtigsten Menschen in meinem Leben außerhalb der Labortüren auf keinen Fall fehlen.

Aus diesem Grunde danke ich meiner Freundin Gramma für die moralische und seelische Unterstützung. Ευχαριστώ Γραμματία. Liebe Leonie, an dieser Stelle möchte ich dem schnellsten lebenden Nachschlagewerk der neuen deutschen Rechtschreibung ein großes DANKE aussprechen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Bruder Jürgen, der immer ein offenes Ohr und eine schnelle Lösung für meine kleinen und größeren Computerprobleme hatte.

Die letzten Worte möchte ich an die wichtigsten Menschen in meinem Leben richten, denen ich diese Arbeit widme, meinen Eltern