

**Studien zur Ontogenese  
der Wachstumshormonrezeptorgenexpression  
beim Schwein (*Sus scrofa domestica*)**

Von dem Fachbereich Biologie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation  
von  
Dipl.-Biol. Manfred Mielenz  
geboren am 13.06.1966 in Hannover

2003

Referentin: Prof. Dr. Dr. N. Parvizi

Korreferent: Prof. Dr. J. Harmeyer

Tag der Promotion: 14.06.2002

## Kurzfassung

### Studien zur Ontogenese der Wachstumshormonrezeptorgenexpression beim Schwein (*Sus scrofa domestica*)

Manfred Mielenz

Der Wachstumshormonrezeptor (GHR) wird während der pränatalen Ontogenese bei unterschiedlichen Spezies, wie Mensch und Rind, frühzeitig exprimiert. Beim Schwein ist hingegen wenig über die pränatalen Ontogenese der GHR-Genexpression bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Wissen um die Ontogenese der pränatalen und postnatalen GHR-Genexpression sowie der GH-Sekretion zu erweitern. Untersuchungen erfolgten an Deutschen Landrasse Schweinen (DL) sowie an Göttinger Miniaturschweinen. Es liegt eine enge Verbindung zwischen der somatotrophen Achse und dem Vitamin-D-endokrinen System vor. Daher wurden vergleichend Schweine mit einem hereditären Defekt der renalen 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -Hydroxylierung betrachtet.

Die relative Quantifizierung der porcinen GHR-mRNA in Leber und Niere erfolgte mit Hilfe der kompetitiven PCR. Eine Normierung fand gegen die Expression der 18 S rRNA statt. Untersuchungen zur GH-Plasmakonzentration wurden am chronisch katheterisierten Fetus und Ferkel durchgeführt.

Pränatal betrug die GHR-Genexpression in der Leber vom 30. Tag post coitum (p.c.) bis zum 70. Tag p.c. weniger als 1 % im Vergleich zum weiblichen 180 Tage alten DL-Schwein. Zum 90. Tag hin konnte ein bedeutender Anstieg der GHR-Genexpression auf 4,3 % beobachtet werden. Die GHR-Genexpression war in der Niere erheblich höher einzuordnen. Sie stieg während der pränatalen Entwicklung an und übertraf das renale Niveau der adulten weiblichen DL-Schweine am 70. und 90. Tag. Vergleichende Untersuchungen zwischen DL-Feten und Feten der DL-Calcitriolmangellinie ergaben insbesondere in der Leber signifikante Unterschiede. In Abhängigkeit vom Muttertier wurden in der Leber der DL-Feten der Calcitriolmangellinie zum Teil gegensätzliche Effekte beobachtet. Während der postnatalen Entwicklung wurde zwischen Göttinger Miniaturschweinen und Miniaturschweinen der Calcitriolmangellinie einer Altersgruppe keine signifikanten Unterschiede der GHR-Genexpression festgestellt. Die GHR-Genexpression in der Leber der Göttinger Miniaturschweine erreichte das adulte GHR-mRNA Niveau bereits mit 8 Wochen. Miniaturschweine der Calcitriolmangellinie wiesen hingegen einen verzögerten Anstieg der GHR-mRNA Konzentration in der Leber auf. Die GHR-Genexpression erfolgte in der Niere beider Linien auf einem Niveau, das dem der adulten Miniaturschweine entsprach. Kein Unterschied der GHR-Genexpression wurde in der Leber von 42 Tage alten DL-Ferkeln und DL-Ferkeln der Calcitriolmangellinie beobachtet.

Zwischen den DL-Feten und den DL-Feten der Calcitriolmangellinie wurden keine Divergenzen bei der GH-Plasmakonzentration verzeichnet. Die GH-Konzentration im Plasma war bei den DL-Ferkeln der Calcitriolmangellinie hingegen signifikant höher als bei den DL-Ferkeln.

Resümierend wird festgestellt, dass die GHR-Genexpression beim Schwein entwicklungs- und gewebespezifisch erfolgt. Ein erblicher Defekt der renalen 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -Hydroxylierung nimmt einen entwicklungsbedingten und gewebespezifischen Einfluss auf die GHR-mRNA Konzentration sowie auf die GH-Sekretion beim Schwein.

## Abstract

### Studies on the ontogeny of the growth hormone-receptor gene expression in pig (*sus scrofa domestica*)

Manfred Mielenz

The growth hormone-receptor (GHR) is expressed very early in prenatal development of different species, like human and cattle. Whereas in pig less is known about the prenatal ontogeny of the GHR-gene expression. The aim of the present study was to expand the knowledge about the prenatal and postnatal ontogenesis of the GHR-gene expression as well as of the GH-secretion. Studies were performed on German Landrace (DL) pigs and Göttingen miniature pigs. There is a close connection between the somatotrophic axis and the vitamin D-endocrine system. Thus pigs with a hereditary defect in renal 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylation were examined in comparison.

The relative quantification of the porcine GHR-mRNA in liver and kidney took place by competitive PCR. Normalization was done against the expression of the 18 S rRNA. Chronically catheterized fetuses and piglets were utilized for studies on the GH-secretion.

The amount of the prenatal GHR-gene expression in the liver from day 30 post coitum (p.c.) up to day 70 p.c. was less than 1 % in comparison to the female 180 day old DL-pig. Up to day 90 we observed a considerable increase of the GHR-gene expression to 4,3 %. The GHR-gene expression in the kidney was classified in a remarkable higher range. There was an increase in prenatal development. The renal level of the GHR-gene expression in the day 70 and the day 90 fetuses reached higher levels than in the adult female pig.

Comparative studies on DL-fetuses and fetuses of the calcitriol deficient line indicated significant differences specially, in the liver. Depending on the mother of the calcitriol deficient line DL-fetus opposite effects in the liver were observed in parts.

During the postnatal development, no significant differences were observed between pigs of the same age group of Göttingen miniature pigs and miniature pigs of the calcitriol deficient line. The growth hormone-receptor gene expression in the liver of the Göttingen miniature pigs reached adult GHR-mRNA levels in the age of 8 weeks. Miniature pigs of the defect line showed a delayed increase of the GHR-mRNA concentration in the liver. In the kidney of the two breeds the GHR-gene expression took place at a level, comparable to the adult miniature pigs.

No differences of GHR-gene expression were detected in the liver of 42-day-old DL-piglets and DL-piglets of the calcitriol deficient line.

There was no variation of the GH-secretion between the DL-fetuses and the DL-fetuses of the calcitriol deficient line. The GH-secretion of the DL-piglets of the calcitriol defect line was significantly higher than that of the DL-piglets.

In summary the GHR-gene expression in pigs takes place in a developmental and tissue specific manner. A hereditary defect in renal 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylation has a developmental and tissue specific influence on the GHR-mRNA concentration as well as on the GH-secretion in pigs.

**Schlagwörter:**

Wachstumshormonrezeptor, Genexpression, Schwein

**Keywords:**

Growth hormone-receptor, gene expression, pig

# Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung.....	1
II.	Literaturübersicht.....	2
1.	Wachstumshormon und somatotrophe Achse .....	2
1.1.	Ontogenese der somatotrophen Achse .....	3
1.1.1.	Pränatale Ontogenese der GH-Sekretion beim Schwein.....	5
1.1.2.	Postnatale Ontogenese der GH-Sekretion beim Schwein .....	5
1.1.3.	Regulation der GH-Sekretion.....	6
2.	Der Wachstumshormonrezeptor .....	7
2.1.	Struktur und Lokalisation des GHR-Genlocus .....	8
2.2.	Varianten der GHR-mRNA.....	9
2.3.	Signaltransduktion und Regulation des GH-Stimulus .....	11
2.3.1.	Transduktion des GH-Signals.....	11
2.3.2.	Down-Regulation des GH-Stimulus und Degradierung des GHR	14
2.4.	Regulation der GHR / GHBP-Expression.....	14
2.4.1.	GH und Ernährungsstatus .....	14
2.4.2.	Geschlechtsspezifische Regulation .....	16
2.4.3.	Corticosteroide .....	17
2.4.4.	Hormone der Schilddrüse .....	18
2.4.5.	Regulation des GHR-Genlocus durch <i>cis</i> -aktive Elemente .....	19
2.5.	Expression des GHR und der GHR / GHBP-mRNA bei verschiedenenSpezies während der Ontogenese .....	20
2.5.1.	Maus.....	20
2.5.2.	Ratte .....	20
2.5.3.	Schaf .....	21
2.5.4.	Rind .....	22
2.5.5.	Mensch.....	23
2.5.6.	Schwein.....	24
2.6.	Der GHR und die renale GH / IGF-Achse .....	25
3.	Interaktion der somatotrophen Achse mit dem Vitamin-D-endokrinen System.....	26
3.1.	Vitamin-D-endokrines System .....	26

3.2.	Effekte von GH und IGF-I auf die Calcitriolsynthese und die Mineralhomöostase .....	28
3.3.	Effekte von Calcitriol auf die GH-Synthese und GH-Sekretion .....	30
3.4.	Calcitrioltransport und -synthese während der fetalen und perinatalen Entwicklung .....	31
III.	Zielsetzung.....	34
IV.	Material und Methoden .....	35
1.	Molekularbiologische Methoden.....	35
1.1.	Aufarbeitung von Gesamt-RNA .....	36
1.1.1.	RNA-Extraktion.....	36
1.1.2.	Qualitätskontrolle und Konzentrationseinstellung der RNA .....	36
1.2.	Reverse Transkription.....	37
1.3.	Polymerase-Kettenreaktion.....	39
1.3.1.	Auswahl der PCR-Primer.....	40
1.3.2.	Durchführung der PCR.....	42
1.3.3.	Verifikation der PCR-Produkte.....	43
1.4.	Methoden zur Quantifizierung von RNA .....	46
1.4.1.	Ribonuclease Protection Assay (RPA) .....	46
1.4.2.	Relativ quantifizierende PCR mit einer progressiven RNA-Verdünnungsreihe als Multiplex-PCR.....	50
1.4.3.	Relative kompetitive PCR mit einem heterologen DNA-Standard .	53
2.	Hormonanalytik .....	58
3.	Untersuchungsgruppen und Eingriffe am Tier.....	59
3.1.	Versuchstiere.....	59
3.2.	Tierhaltung.....	59
3.3.	Blut- und Gewebeproben .....	60
3.3.1.	Chronische Katheterisierung von Sau und Ferkel .....	60
3.3.2.	Chronische Katheterisierung des Fetus.....	60
3.3.3.	Blutentnahme beim Fetus- und Ferkel.....	60
3.3.4.	Blutgasbestimmung .....	61
3.3.5.	Gewebeentnahme .....	61
4.	Experimente .....	61
4.1.	Untersuchungen zur pränatalen Ontogenese der GHR-Genexpression .....	61

4.2.	Untersuchungen zur postnatalen Ontogenese der GHR-Genexpression .....	62
4.3.	Untersuchungen zur GH-Plasmakonzentration.....	63
4.3.1.	Vergleich der GH-Plasmakonzentration bei DL- und DL-PVDRI-Feten .....	63
4.3.2.	Vergleich der GH-Plasmakonzentration bei DL- und DL-PVDRI-Ferkeln .....	64
5.	Statistische Auswertung.....	65
5.1.	GHR-Genexpression während der pränatalen Entwicklung.....	65
5.2.	GHR-Genexpression während der postnatalen Entwicklung .....	66
5.3.	GH-Plasmakonzentration.....	66
V.	Ergebnisse .....	67
1.	Methode und qualitativer Nachweis der GHR-mRNA.....	67
1.1.	Verifikation der klonierten PCR-Produkte, Plasmide.....	67
1.2.	Qualitätsbeurteilung der Gesamt-RNA .....	67
1.3.	Lokalisation der GHR-Sonde .....	68
1.4.	Qualitativer Nachweis der GHR-mRNA .....	68
1.5.	Auswahl der geeigneten Methode zur quantitativen Bestimmung der porcinen GHR-mRNA während der Ontogenese.....	70
1.5.1.	Relativ quantifizierende PCR mit einer progressiven RNA-Verdünnungsreihe als Multiplex-PCR .....	70
1.5.2.	Ribonuclease Protection Assay .....	73
1.5.3.	Relative kompetitive PCR mit einem heterologen DNA-Standard .	75
2.	Untersuchungen zur pränatalen Ontogenese der GHR-Genexpression ..	79
3.	Untersuchungen zur postnatalen Ontogenese der GHR-Genexpression.	83
4.	Vergleich der GHR-Genexpression zwischen Miniatur- und DL-Schweinen.....	87
5.	GH-Plasmakonzentration.....	88
5.1.	GH-Plasmakonzentration bei Feten der Linien DL und DL-PVDRI....	88
5.2.	GH-Plasmakonzentration bei Ferkeln der Linien DL und DL-PVDRI .	89
5.3.	Stimulation der GH-Sekretion bei DL-PVDRI Ferkeln mit GRF und SRIF .....	90
6.	Gewichtsentwicklung und RNA-Konzentration.....	91



6.1.	Gewichtsentwicklung und Gesamt-RNA während der pränatalen Ontogenese .....	91
6.2.	Gewichtsentwicklung und Gesamt-RNA während der postnatalen Ontogenese.....	93
6.2.1.	Vergleichende Gewichtsentwicklung von Ferkeln der Linien DL und DL-PVDRI.....	93
6.2.2.	Körpergewicht und Gesamt-RNA bei 42 Tage alten Ferkeln der Linien DL und DL-PVDRI.....	94
6.2.3.	Gewichtsentwicklung und Gesamt-RNA beim Miniaturschwein.....	94
VI.	Diskussion.....	96
1.	Material und Methoden .....	96
1.1.	Reverse Transkription und PCR .....	96
1.2.	Auswahl einer geeigneten internen Kontrolle.....	96
1.3.	Auswahl der geeigneten Methode zur Bestimmung der relativen GHR-Genexpression .....	97
1.3.1.	Ribonuclease Protection Assay (RPA) .....	97
1.3.2.	Relativ quantifizierende PCR mit einer progressiven RNA-Verdünnungsreihe als Multiplex-PCR .....	98
1.3.3.	Relative kompetitive PCR mit einem heterologen DNA-Kompetitor .....	99
1.4.	Anmerkungen zur GHR-mRNA-Quantifizierung.....	100
2.	GHR-Genexpression.....	101
2.1.	Pränatale Ontogenese der GHR-Genexpression.....	102
2.1.1.	Postnatale Ontogenese der GHR-Genexpression.....	105
2.2.	GH-Plasmakonzentration während der pränatalen und postnatalen Ontogenese bei DL- und DL-PVDRI-Schweinen.....	108
3.	Abschließende Betrachtungen .....	110
VII.	Zusammenfassung .....	113
VIII.	Literaturverzeichnis.....	116
IX.	Anhang .....	156

## Abkürzungsverzeichnis

∞	unendlich
°C	Grad Celsius
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
amol	Attomol
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
A.U.	arbitrary units (interne Einheiten)
Bp	Basenpaare
ca.	zirka
CaBP	Calciumbindungsprotein
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpm	counts per minute (Impulse pro Minute)
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
d	Tag(e)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DL	deutsches Landrasse Schwein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5' Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidium-Bromid
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FAK	fokale Adhäsionskinase
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GH	Growth hormone (Wachstumshormon)
GHBP	Wachstumshormonbindungsprotein
GHR	Wachstumshormonrezeptor
GRF	Growth hormone releasing factor
h	Stunde(n)
I.E.	internationale Einheiten
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
IGF-(I; II)	Insulin-like growth factor-(I; II) (Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor-(I; II))
IGFBP (-3)	Insulin-like growth factor binding protein (-3)
IgG	Immunglobulin G
JAK (2)	Janus-Kinase (2)
Kb	Kilobasen
KD	Kilo Dalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
LB-Medium	Luria Bertani-Nährmedium
M	Mol
mA	Milliampère
mg	Milligramm

min	Minute(n)
MINI	Göttinger Miniaturschwein
MINI-PVDRI	Miniaturschwein der Calcitriolmangellinie
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger ribonucleic acid (Botenribonukleinsäure)
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NIH	National institute of health
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NTP	Ribonukleosid- 5' Triphosphat
OD	optische Dichte
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.c.	post coitum
pit-1	Hypophysenspezifischer Transkriptionsfaktor
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pGHR	cDNA-Fragment des porcinen GHR
PTH	Parathyrin (Parathormon)
PTHrP	Parathyroid-Hormon-related-Protein
r	Maßkorrelationskoeffizient
RE	Reaktionselement
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	Ribonuclease protection assay
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
s.c.	subcutan
SOCS/CIS	Suppressor of cytokine signalling
SRIF	Somatotropin release inhibiting factor (Somatostatin)
STAT (5a; 5b)	Signal transducer and activator of transcription (5a; 5b)
T <sub>3</sub>	Triiodthyronin
T <sub>4</sub>	Thyroxin
TAE	Tris-aminomethan-Eisessig-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N,'N'-Tetramethyldiamin
U	Einheit(en)
UTR	untranslated region (nicht translatierter Bereich)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v / v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
W	Watt
w / v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)

## **I. Einleitung**

Eine erfolgreiche Koordination der einzelnen Abläufe während der Entwicklung setzt eine strenge Kontrolle der hormonalen Regulation des fetalen und postnatalen Wachstums voraus. Die Regulation beinhaltet das Zusammenspiel einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren, zu denen auch das Wachstumshormon (GH) gehört. Dem GH wurde in der Vergangenheit nur eine begrenzte Rolle beim somatotrophen Wachstum des Fetus zugewiesen. In der letzten Zeit ergeben sich allerdings immer mehr Hinweise, die auf eine Funktion der somatotrophen Achse bereits während der Fetalentwicklung hindeuten. Auf Grund aktueller Untersuchungen wird eine Aufgabe des fetalen Wachstumshormons, die unabhängig vom eigentlichen Körperwachstum ist, immer wahrscheinlicher. Postnatal ist das Wachstumshormon der dominierende Faktor der somatotrophen Achse.

Die Effekte des GH werden durch einen spezifischen Rezeptor, den Wachstumshormonrezeptor (GHR), vermittelt. Der GHR gehört zur Superfamilie der Cytokin-GH-Prolaktin-Rezeptoren.

Es existiert eine komplexe Verbindung zwischen der somatotrophen Achse und dem Vitamin-D-endokrinen System. Das Vitamin-D-endokrine System hat weitreichende Bedeutungen für den Organismus, die sich insbesondere auf den Mineralstoffwechsel und die Gewebedifferenzierung beziehen. Der aktivste Vitamin-D-Metabolit, das Calcitriol, ist auf Grund der Interaktionen beider Systeme ein potentieller Kandidat für die Modulation der GHR-Genexpression.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das Verständnis um die Regulation der GH-Sekretion und der GHR-Genexpression während der Ontogenese zu verbessern. Von Interesse ist hierbei, ob die genetische Disposition für Calcitriolmangel einen Effekt auf die GH-Plasmakonzentration und die GHR-mRNA-Konzentration hat.

Im Literaturteil der vorliegenden Arbeit wird insbesondere auf die GHR-Genexpression und dessen Regulation eingegangen. Im Weiteren werden Wechselbeziehungen der somatotrophen Achse mit dem Vitamin-D-endokrinen System aufgezeigt. Der Aufbau einer Methode zur Bestimmung der porcinen GHR-mRNA beim Fetus machte einen großen Teil der vorliegenden Arbeit aus. Im Kapitel „Material und Methoden“ wird daher verstärkt die Literatur zur Methode aufgegriffen und intensiver auf die technischen Aspekte eingegangen.

## **II. Literaturübersicht**

### **1. Wachstumshormon und somatotrophe Achse**

Das Polypeptidhormon GH wird in den somatotrophen Zellen des Pars distalis der Adenohypophyse synthetisiert und episodisch endokrin sezerniert. Das GH steuert eine Vielzahl von physiologischen Prozessen der Vertebrata. Zu ihnen gehört das somatische Wachstum, welches die Proliferation und Differenzierung von Geweben beinhaltet. Das GH reguliert den Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel, die Proteinsynthese sowie verschiedene Stoffwechselleistungen der Leber und anderer Organe (zur Übersicht: ISAKSSON et al., 1985; JANSSON et al., 1985). Darüber hinaus gehören zu den Aufgaben des GH auch bedeutende Funktionen bei der Aufrechterhaltung der Homöostase der Körperflüssigkeiten (DENIS et al., 1994; SHEPERD et al., 1997; WEI et al., 1997; zur Übersicht: OGLE et al., 1992).

Seine Effekte bewirkt das GH der klassischen Somatomedin-Hypothese zufolge durch die Induktion der Synthese eines intermediär wirkenden Wachstumsfaktors (zur Übersicht: DAUGHADAY & ROTWEIN, 1989). Dieser erstmals von SALMON & DAUGHADAY (1957) beschriebene Faktor zeichnet sich durch die Fähigkeit zur Stimulation der Sulfateinlagerung im Knorpelgewebe aus. Durch seine Funktion als Mediator des GH wurde er später Somatomedin genannt. Nach der Sequenzierung erfolgte auf Grund der Ähnlichkeit zum Insulin die Umbenennung in insulin-like growth factor-I (IGF-I) (RINDERKNECHT & HUMBEL, 1978 a). Ein weiteres Peptid mit ähnlicher Funktion und Sequenz wurde identifiziert und IGF-II genannt (RINDERKNECHT & HUMBEL, 1978 b). IGF-I und IGF-II sind integrale Komponenten multipler Systeme bei der Kontrolle des Wachstums und des Stoffwechsels (zur Übersicht: JONES & CLEMMONS, 1995; LE ROITH et al., 2001).

Ursprünglich wurde angenommen, dass die Somatomedine allein von der Leber als Antwort auf einen GH-Stimulus sezerniert werden, da die GH-Sekretion postnatal stark mit der IGF-I-Sekretion korreliert. Inzwischen ist bekannt, dass das IGF-I von einer Vielzahl von Geweben synthetisiert wird (D'ERCOLE et al., 1984) und neben der endokrinen auch parakrine bzw. autokrine Wirkung besitzt. In einigen dieser Gewebe steht die Regulation teilweise unter der Kontrolle des

GH und wird im Weiteren durch gewebespezifische Wachstumsfaktoren reguliert (CHIN et al., 1992 b; GIUDICE, 1992; LEUNG et al., 1996; zur Übersicht: YAKAR et al., 2000).

Genauso wie für das IGF-I ergeben sich für das GH Hinweise, die ein Abrücken von der klassischen Somatomedin-Hypothese nahe legen. Als Beispiel ist hier der direkte Effekt des GH auf die Stimulation des longitudinalen Knochenwachstums zu nennen (ISAKSSON et al., 1982). Insbesondere während der pränatalen Entwicklung, aber auch postnatal kann die Synthese von GH oder der GH-mRNA durch unterschiedliche Gewebe beobachtet werden. In ihrer Gesamtheit deuten diese Arbeiten auf eine Funktion des GH als parakrin bzw. autokrin regulierter lokaler Wachstumsfaktor hin (NGUYEN et al., 1996; LIU et al., 1997; LANTINGA-VAN LEEUWEN et al., 1999; YANG et al., 1999; HARVEY et al., 2000, 2001; KÖLLE et al., 2001; zur Übersicht: HARVEY & HULL 1997; HARVEY et al., 1998; MOL et al., 1999; HULL & HARVEY 2000).

### **1.1. Ontogenese der somatotrophen Achse**

Es wird postuliert, dass das embryonale sowie das frühe postnatale Wachstum der Vertebrata weitgehend unabhängig vom GH erfolgt und vorrangig durch IGF-I mediiert wird. Die Wirkungen der IGF's während der pränatalen Entwicklung sind parakriner- und autokriner Natur und werden differenziell reguliert (zur Übersicht: DAUGHADAY & ROTWEIN, 1989; JONES & CLEMMONS, 1995; LE ROITH et al., 2001).

Die Expression von IGF-I und IGF-II kann in fast allen fetalen Geweben beobachtet werden. Zellen mesenchymalen Ursprungs sind die vorrangigen Orte der Genexpression (HAN et al., 1987, 1988). Die Effekte der IGF's, die im Blut an spezielle Bindungsproteine gekoppelt sind, werden durch entsprechende Rezeptoren vermittelt. Der IGF-I-Rezeptor vermittelt beim Fetus sowohl IGF-I als auch IGF-II Effekte und ist für das Wachstum während der pränatalen Entwicklung relevant. Der Insulinrezeptor reagiert hingegen stärker auf IGF-II als auf Insulinstimuli und vermittelt vorrangig metabolische Signale (WEBER et al., 1992; zur Übersicht: JONES & CLEMMONS, 1995; LE ROITH et al., 1995; RAJARAM et al., 1997; HWA et al., 1999; ROTHER & ACCILI, 2000; ALLAN et al., 2001).

BAUER & PARVIZI (1996) beobachteten nach der Blutentnahme beim chronisch katheterisierten porcinen Fetus IGF-I-Plasmakonzentrationen, die über denen des Muttertiers lagen und vermutlich schon vor der Geburt durch GH reguliert wurden. Im Gegensatz dazu berichteten LEE et al. (1993) von niedrigen IGF-I-Werten während der pränatalen Entwicklung des Schweins, gefolgt von einem postnatalen Anstieg. Es ist jedoch zu beachten, dass LEE et al. (1993) eine sogenannte „Akute“ Studie durchgeführt hatten, d.h. die Feten waren narkotisiert. Unter Narkose haben die Feten niedrigere IGF-I-Werte (BAUER & PARVIZI, unpubliziert)

Die Hypothese des GH-unabhängigen fetalen und frühen postnatalen Wachstums basiert auf der Beobachtung, dass dekapitierte Feten eine nahezu normale Entwicklung aufweisen (zur Übersicht: GLUCKMAN et al., 1981). Es konnten allerdings Unterschiede bei der Skelettentwicklung des hypophysectomierten Schaffetus (MESIANO et al., 1987) sowie der Kapillaren im Bereich der Muskulatur als auch des Fettgewebes des dekapitierten bzw. hypophysectomierten porcinen Fetus (HAUSMAN et al., 1981; HAUSMAN, 1989; HAUSMAN et al., 1993) beobachtet werden. *In vitro* bewirkt GH bei kultivierten fetalen Hepatozyten des Menschen und fetalen Inselzellen der Ratte die verstärkte Abgabe von IGF-I ins Medium. Gleichzeitig wird die DNA-Replikation gesteigert (STRAIN et al., 1987; SWENNE et al., 1987).

Betrachtet man die Effekte einer pulsatilen GH-Infusion auf das Wachstum des chronisch katheterisierten Schaffetus mit intakter Hypophyse, so ist GH nicht in der Lage einen signifikanten Effekt auszuüben (BAUER et al., 2000), obwohl die somatotrophe Achse beim Schaf bereits in utero auf Ernährungseinflüsse und bestimmte hormonelle Stimuli reagieren kann (BAUER et al., 1995, 1999). Die somatotrophe Achse des neonatalen Schweins ist entgegen ursprünglicher Annahmen nachweislich funktionell. Sie reagiert allerdings ebenfalls eher auf den Ernährungsstatus, als auf die Stimulation durch das GH (WESTER et al., 1998 a). Bis zum 37. Tag der postnatalen Entwicklung werden mit der Applikation von GH beim Ferkel nur moderate Effekte auf die IGF-I-Plasmakonzentration erzielt, die mit dem Alter progressiv zunehmen (HARRELL et al., 1999). WESTER et al. (1998 b) vermuten, dass dieses in einer geringen Sensitivität der neonatalen Leber gegenüber dem GH begründet liegt, da die Konzentration des hochaffinen GHR beim neonatalen Schwein nach BREIER et al. (1989) nur

gering ist. Unter der Verwendung von höheren Dosen des exogen zugeführtem GH kann auch beim neonatalen Ferkel die somatotrophe Achse stimuliert werden. Es können positive Effekte auf die Konzentration an IGF-I-, IGF-Bindungsprotein-3, GHR-mRNA und Glucose im Plasma erzielt werden (WESTER et al., 1998 b; LEWIS et al., 2000).

### **1.1.1. Pränatale Ontogenese der GH-Sekretion beim Schwein**

Die Betrachtung der GH-Plasmaspiegel während der Entwicklung bei einer Anzahl von Spezies der Klasse Mammalia macht offensichtlich, dass die GH-Plasmakonzentration des Fetus im Vergleich zum postnatalen bzw. adulten Tier beträchtlich höher ist (KAPLAN et al., 1972; BASSETT & GLUCKMAN, 1986; BAUER & PARVIZI, 1996).

Das GH wird im porcinen Plasma bereits am 40. Tag post coitum (p.c.) nachgewiesen. Die hypophysäre GH-mRNA wird allerdings erst ab Tag 50 p.c. eindeutig mittels *in situ* Hybridisierung detektiert (MA et al., 1996; KLINDT & STONE, 1984). Die Regulation der GH-mRNA erfolgt beim Schwein bereits während der pränatalen Entwicklung alters- und geschlechtsspezifisch (GRANZ et al., 1997). Die GH-Plasmakonzentration steigt beim Schwein bis zum Tag 80 p.c. bzw. 90 p.c. stark an (KLINDT & STONE, 1984; LEE et al., 1993). Die GH-Sekretion, die bereits beim Fetus pulsatil ist, fällt den Beobachtungen von BAUER & PARVIZI (1996) zufolge schon während der letzten Tage der Trächtigkeit ab.

### **1.1.2. Postnatale Ontogenese der GH-Sekretion beim Schwein**

Im Vergleich zur pränatalen Periode ist postnatal eine deutliche Absenkung der GH-Konzentration im Plasma zu verzeichnen (RETTMER, 1995). Der Abfall der GH-Plasmakonzentration setzt sich bis zwei Wochen nach der Geburt fort. Das Absetzen der Saugferkel resultiert in einem signifikanten Anstieg der GH-Serumkonzentration (CARROLL et al., 1998). Zwischen der 3. und 5. Woche post partum (p.p.) wird nach BUONOMO & KLINDT (1993) ein GH-Anstieg im Serum beobachtet. Dieser Anstieg wurde auch von MATTERI & CARROLL (1997), allerdings in unbedeutender Ausprägung, am Tag 28 p.p. registriert. Anschließend fällt die geschlechtsdimorph regulierte GH-Plasmakonzentration schnell ab, um dann kontinuierlich bis zur 13. Lebenswoche weiter zu sinken.



### 1.1.3. Regulation der GH-Sekretion

Die im Hypothalamus synthetisierten Peptidhormone GH-Releasinghormon (GRF) und Somatostatin (SRIF) sind die Hauptmodulatoren der hypophysären GH-Sekretion. GRF stimuliert und SRIF inhibiert die Sekretion des GH. Ihre Ausschüttung steht unter der zentralnervösen Kontrolle einer Vielzahl von excitatorischen und inhibitorischen Neuroregulatoren. Zu ihnen gehören Neuropeptide, Catecholamine, Steroidhormone und deren Metaboliten. Periphere feedback-Schleifen regulieren zum einen die Ausschüttung des GRF und des SRIF im Hypothalamus und im Weiteren die Sekretion des GH aus den somatotrophen Zellen der Adenohypophyse. Syntheseprodukte der anterioren Hypophyse, wie z.B. Galanin, sind in die parakrine bzw. autokrine Regulation der GH-Sekretion unterschiedlicher Spezies involviert, obwohl beim Schwein kein Effekt von Galanin auf die GH-Sekretion beobachtet werden konnte (KLINDT & STONE, 1984; TANNENBAUM et al., 1990; ELSAESSER, 2001; zur Übersicht: GIUSTINA & VELDHUIS, 1998; MÜLLER et al., 1999; SCHWARTZ, 2000).

Als ein Beispiel für die Komplexität der Regulation der GH-Sekretion ist die Einflussnahme durch die excitatorisch wirksame Aminosäure N-methyl-D,L-Aspartat (NMA) zu nennen. Der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor-Agonist NMA stimuliert sowohl die SRIF- als auch die GRF-Ausschüttung. Beim männlichen Rhesus-Makaken unterscheiden sich die Auswirkungen einer NMDA-Rezeptorstimulation auf die GH-Sekretion zwischen unterschiedlichen postnatalen Altersgruppen und adulten Tieren (RIZIVI & ALTAF, 2000).

Die Regulation der GH-Sekretion durch Opioide ist als ein weiteres Beispiel anzuführen. Die basale GH-Sekretion wird bei der Frau durch die Langzeitblockade von Opioidrezeptoren nicht beeinflusst. Ein negativer Effekt auf die GH-Peakwerte kann jedoch beobachtet werden. Dabei sind direkte Effekte der Opioide an der Hypophyse nicht auszuschließen (VILLA et al., 1997).

Opioide inhibieren die GH-Sekretion primiparer Sauen über GHR-abhängige und GHR-unabhängige Mechanismen (ARMSTRONG et al., 1990). Effekte von Opioiden auf die GH-Sekretion des Fetus können hingegen nicht beobachtet werden (RETTMER, 1995).

Auch die Modulation der GH-Sekretion durch die Schilddrüsenhormone stellt ein vielschichtiges Beispiel dar. Die Schilddrüsenhormone modulieren die GH-Sekretion einerseits zentralnervös im Hypothalamus und andererseits an der

Hypophyse. Triiodthyronin ( $T_3$ ) stimuliert in  $GH_4C_1$ -Zellen die Genexpression der Deiodinase Typ1. Durch die Deiodinase wird verstärkt Thyroxin ( $T_4$ ) in  $T_3$ , das aktive Schilddrüsenhormon, umgewandelt und lokal verfügbar gemacht. Zugleich steigt die Konzentration der GH-mRNA in den Zellen an. Der Effekt auf die GH-mRNA ist im Gegensatz zu der Wirkung auf die Deiodinase-mRNA durch Cycloheximid hemmbar, was für die Involvierung weiterer Proteine bei Modulation der GH-mRNA-Synthese durch  $T_3$  spricht (MAIA et al., 1995). Die Stimulation von  $GH_4C_1$ -Zellen mit  $T_3$  führt bei einer gesteigerten GH-mRNA-Konzentration gleichzeitig zu einer reduzierten Genexpression und Proteinkonzentration des hypophysenspezifischen Transkriptionsfaktors pit-1, der unabdinglich für die GH-Synthese in der Adenohypophyse ist (SANCHEZ-PACHECO et al., 1995).

Betrachtet man die pränatale und neonatale Regulation der GH-Sekretion beim Schwein, so ist davon auszugehen, dass unausgereifte Regulationsmechanismen für die hohen GH-Plasmaspiegel des Fetus verantwortlich sind. Diese scheinen auch in der neonatalen Phase noch immatur zu sein (RETTMER & PARVIZI, 1994; TORRONTERAS et al., 1997). Der vorgeburtliche Abfall der GH-Sekretion beim Schwein ist vermutlich bedingt durch einen reifenden SRIF-Tonus. Denkbar ist ebenfalls ein negatives feedback durch IGF-I (BAUER & PARVIZI, 1996).

## 2. Der Wachstumshormonrezeptor

Die somatischen und metabolischen Effekte des GH werden durch den GHR vermittelt.

Der GHR, der zur Superfamilie der Cytokin-GH-Prolaktin Rezeptoren gehört (BAZAN, 1990), wurde erstmals aus humanem Gewebe von LEUNG et al. (1987) kloniert. Untersuchungen zur Sequenzhomologie zwischen den Spezies ergaben 83% Homologie zwischen der porcinen und der menschlichen GHR-cDNA sowie 89% Übereinstimmung zwischen der porcinen GHR-cDNA und der des Kaninchens (CIOFFI et al., 1990). Der GHR wird beim adulten Tier in größerer Konzentration in der Leber exprimiert. In geringerem Umfang beobachtet man seine Expression an anderen Geweben bzw. Zelltypen (BINGHAM et al., 1994). Neben dem membranständigen GHR existiert im Serum ein GH-Bindungsprotein

(GHBP), welches die Effekte des GH kompetitiv moduliert und gleichzeitig die Halbwertszeit des GH erhöht (BAUMANN, 1995). Die Generierung des GHBP erfolgt bei den Muridae durch alternatives Spleißen des primären GHR-mRNA-Transkripts. Bei den übrigen bisher untersuchten Mammalia wird das GHBP in der Regel posttranslational nach proteolytischem Abspalten der extrazellulären Domäne des GHR gebildet. Es sind allerdings auch in dieser Gruppe Möglichkeiten des alternativen Spleißens zur Generierung des GHBP bekannt. Beim Huhn sind zwei Bindungsproteine nachgewiesen worden, die durch alternatives Spleißen generiert werden. Die Bildung von GHBP durch proteolytisches Abspalten der extrazellulären Domäne des Rezeptors ist ebenfalls bekannt (VLEURICK et al., 1999). Bei allen bisher untersuchten Vogelarten findet zusätzlich die Genese von GHBP durch den Gebrauch einer alternativen Polyadenylierungsstelle statt (OLDHAM et al., 1993; zur Übersicht: EDENS & TALAMANTES, 1998).

## 2.1. Struktur und Lokalisation des GHR-Genlocus

Das GHR-Gen des Menschen (LEUNG et al., 1987; ZOU et al., 1997 a) und das der Maus (EDENS et al., 1994; MENON et al., 1995; ZHOU et al., 1994) sind kloniert und charakterisiert. Der für das Protein codierende DNA-Bereich des Menschen, mit den Exons 2 - 10, umfasst mindestens 87 Kb auf Chromosom 5 (GODOWSKI et al., 1989). Beim Schwein konnte der den GHR repräsentierende DNA-Abschnitt auf Chromosom 16 lokalisiert werden (CHOWHARY et al., 1994).

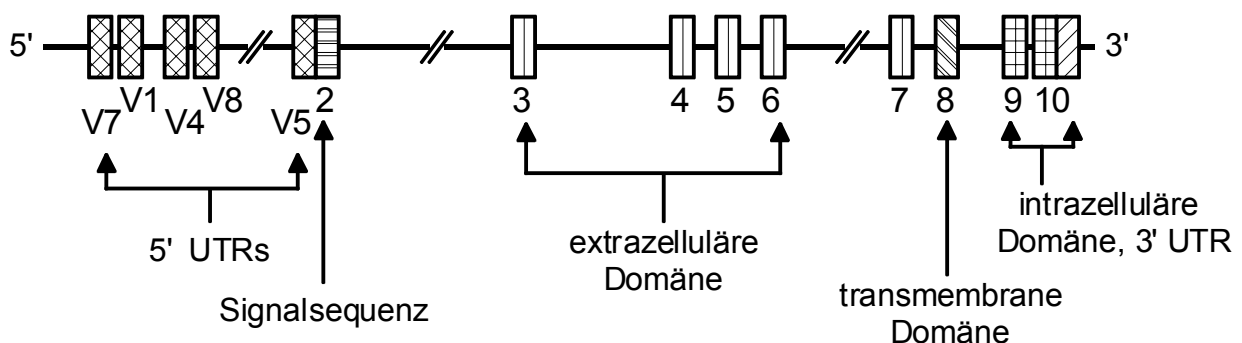


Abb. 1: Struktur des humanen GHR-Gens (modifiziert nach EDENS & TALAMANTES, 1998; RIVERS & Norman, 2000)

Exons, die zu Varianten in der 5'-nicht translatierten Region (UTR) der mRNA führen, sind teilweise identifiziert (zur Übersicht: EDENS & TALAMANTES, 1998). Die Existenz von Varianten des Exons 1 weist auf die Kontrolle der GHR-

mRNA durch mehrere Promotoren hin. Die Heterogenität ist ein Indiz für die komplexe Kontrolle des Genlocus (GODOWSKI et al., 1989; zur Übersicht: SCHWARTZBAUER & MENON, 1998).

## 2.2. Varianten der GHR-mRNA

Die Länge des Haupttranskripts der GHR-mRNA beträgt beim Schwein 4,5 Kilobasen (Kb) (BINGHAM et al., 1994) und variiert bei anderen untersuchten Spezies zwischen 4,0 Kb und 5,0 Kb (zur Übersicht: EDENS & TALAMANTES, 1998).

Die GHR-mRNA-Varianten beziehen sich im Allgemeinen auf die 5' -UTR's des GHR-Gens. Die Heterogenität der GHR / GHBP-mRNA, speziell in den nicht translatierten 5' -Bereichen, wird bei einer Vielzahl von Spezies beobachtet. In der Leber der untersuchten Arten findet sich ein spezifisches Transkript (Tabelle 1).

Nachweislich entstammen alternative 5' -UTR's der mRNA unterschiedlichen Exons mit speziellen Transkriptionsstartstellen, Promotoren und Enhancern. Die Initiation der Transkription von alternativen Promotoren stellt eine Strategie zur entwicklungs- und gewebespezifischen Regulation der Genexpression dar (JIANG et al., 1999).

Nach Auffassung von JIANG et al. (1999) sind die mit P1, P2 sowie P3 bezeichneten Promotoren im GHR-Gen nicht nur beim Rind zu finden, sondern auch für weitere Spezies anzunehmen. Ein zweiter Promotor wurde ebenfalls beim Schaf identifiziert (ADAMS, 1995). Auf Grund der bekannten UTR-Varianten ist davon auszugehen, dass in Zukunft weitere Promotoren isoliert werden. Im Weiteren ist die Initiation der Transkription ausgehend von kryptischen Transkriptionsstartstellen und Donorstellen für alternatives Spleißen, speziell bei seltenen Varianten der UTR's, denkbar. Im Gegensatz zu den leberspezifischen Transkripten des P1 Promotors finden sich die am P2 Promotor initiierten Transkripte ubiquitär in einer Vielzahl von Geweben, einschließlich der Leber. Die bovine 1C Variante, initiiert vom Promotor P3, scheint in nicht-hepatischen Geweben von größerer Bedeutung zu sein. In der Leber adulter Tiere hat dieses Transkript einen Anteil von 11% (JIANG et al., 1999; MOFFAT et al., 2000).

Das Fehlen der in der Leber des Rinds normalerweise dominierenden Variante 1A bewirkt eine Reduktion der Gesamtkonzentration an hepatischer GHR-mRNA.

Die leberspezifische Form 1A ist essentiell für eine normale IGF-I-Synthese beim Rind. Der Mangel stellt die Ursache von Minderwuchs bei *Bovis indicus* dar (DAUGHADAY, 2000). Der Abfall der bovinen GHR-Variante 1A zum Zeitpunkt des Partus korreliert mit der geringen Konzentration an IGF-I-mRNA und IGF-I im Plasma (KOBAYASHI et al., 1999). Das leberspezifische L1-Transkript der Maus wird nur während der Trächtigkeit beobachtet (SOUTHARD et al., 1995).

Tabelle 1: Charakterisierte GHR-mRNA-Varianten der 5' -UTRs unterschiedlicher Spezies

Spezies	Anzahl und Nomenklatur der bekannten UTR's der GHR-mRNA (leberspezifischen Variante)	Referenz (leberspezifische Variante: *)
Mensch	V1 - V8 (V1)	LEUNG et al., 1987; *GODOWSKI et al., 1989; *PEKHLETSKY et al., 1992; URBANEK et al., 1992; *ZOU et al., 1997 a
Pavian	V1, V3 - V4 (V1)	*ZOGOPOULOS et al., 1999
Rhesus-Makake	V1 (V1)	MARTINI et al., 1997
Ratte	V1 - V5 (GHR <sub>1</sub> /V2)	*BAUMBACH et al., 1989; *DOMENÉ et al., 1995
Maus	L1 - L5 (L1)	MENON et al., 1995, 2001; *SOUTHARD et al., 1995; MOFFAT et al., 2000
Rind	1A - 1I (1A)	HAUSER et al., 1990; *HEAP et al., 1995, 1996; JIANG et al., 1999; JIANG & LUCY, 2001
Schwein	1A - 1B (1A)	CIOFFI et al., 1990; *LIU et al., 2000
Schaf	1A - 1B (1A)	ADAMS et al., 1990; ADAMS, 1995, *O'MAHONEY et al., 1994
Kaninchen	V1 - V3	LEUNG et al., 1987
Huhn	V1 - V2	BURNSIDE et al., 1991; OLDHAM et al., 1993; AGARWAL et al., 1994

Alternative Spleißvarianten der proteincodierenden Rezeptor-mRNA werden überwiegend bei den Muridae beobachtet, kommen jedoch auch bei anderen Spezies vor. Eine GHR-Isoform des Menschen weist kein Exon 3 auf (URBANEK et al., 1992). Die Expression der humanen Isoformen erfolgt individuell und nicht gewebespezifisch (STALLINGS-MANN et al., 1996; WICKELGREN et al., 1995). Eine entwicklungsbedingte und geschlechtsspezifische Regulation der Varianten ist genauso anzunehmen, wie ein funktioneller Unterschied (KRATZSCH et al.,

2001; ZOGOPOULOS et al., 1996 a). Beim Rhesus-Makaken konnten zwei Isoformen des GHR, die vermutlich durch alternatives Spleißen entstanden sind, identifiziert werden. Mit einer Sonde, spezifisch für die extrazelluläre Domäne des Rezeptors, konnte ebenfalls ein kleines Transkript nachgewiesen werden, das in der Lage ist GHBP zu generieren (MARTINI et al., 1997). Auch eine beim Menschen bekannte Spleißvariante der GHR-mRNA bewirkt die Bildung von GHBP. Diese Variante besitzt eine Deletion mit einem resultierenden Stopcodon im Exon 9 des GHR-Gens (DASTOT et al., 1996; ROSS et al., 1997).

## **2.3. Signaltransduktion und Regulation des GH-Stimulus**

### **2.3.1. Transduktion des GH-Signals**

Die pleiotropen Effekte des GH werden nach der Bindung des GH an den membranständigen GHR bewirkt. Das GH stimuliert nach seiner Bindung die Phosphorylierung einer Vielzahl von Polypeptiden, zu denen auch der GHR gehört (CAMPBELL et al., 1993; WANG et al., 1993). Das GH besitzt zwei strukturell unterschiedliche Bindungsstellen für die extrazelluläre Domäne des GHR (DE VOS et al., 1992; WELLS et al., 1993). Für die Aktivierung der intrazellulären Effekte ist die sequentielle Dimerisierung des GHR, die mit der Bildung eines GH·(GHR)<sub>2</sub>-Komplexes einhergeht, notwendig (CUNNINGHAM et al., 1991; WELLS, 1996). Die Signaltransduktion kann mit dem GHR-Antagonisten G120K-PEG, der in der Lage ist die Dimerisierung des Rezeptors zu verhindern, unterbunden werden (FLYVBJERG et al., 1999). Der instabile dimere Zustand wird vermutlich nur kurzzeitig für die Signalinitiierung benötigt (GERTLER et al., 1996). Der intrazelluläre Teil des Rezeptors beherbergt funktionell abgrenzbare Domänen (BILLESTRUP et al., 1994; WANG et al., 1995), die bei den Cytokinrezeptoren ohne katalytische Aktivität sind (STAHL et al., 1995). Nach der GH-Bindung erfolgt die Assoziation des GHR mit zwei Molekülen der Janus-Kinase 2 (JAK2), welche aktiviert und transphosphoryliert werden (ARGETSINGER et al., 1993; ARGETSINGER & CARTER-SU, 1996; CARTER-SU et al., 1994). Die phosphorylierten JAK2 Moleküle phosphorylieren nun ihrerseits neben Proteinen multipler Signaltransduktionswege entsprechende Tyrosinreste des intrazellulären Rezeptorabschnitts. Beim Rhesus-Makaken ist der GHR nachweislich konstitutiv mit der JAK2 assoziiert. Die Stimulation mit GH

bewirkt einen Anstieg der Tyrosinphosphorylierung der JAK2 und des GHR. Ein weiteres Hinzuziehen von JAK2 Molekülen findet nicht statt (MARTINI et al., 1997). Die Phosphotyrosinreste des Rezeptors dienen außer der Assoziation mit den JAK2-Molekülen als spezifische Anlagerungspunkte für Proteine unterschiedlicher Signaltransduktionswege. Zu ihnen gehören Proteine mit einer SH2-Domäne, wie die „signal transducers and activators of transcription“ (STATs) (STAHL et al., 1995). Hervorzuheben ist hier insbesondere das STAT5b. Es ist im Gegensatz zum STAT5a mitverantwortlich für die physiologischen Effekte der pulsatilen GH-Sekretion auf die Expression spezifisch männlicher Gene in der Leber der Ratte. Dabei ist STAT5b von großer Bedeutung für den geschlechtsbedingten Dimorphismus des Wachstums (WAXMAN et al., 1995; UDY et al., 1997; DAVEY et al., 1999 a; CHOI & WAXMAN, 2000). Zugleich ist aus Untersuchungen an STAT5b defizienten Mäusen bekannt, dass nur der hypophysectomierte Wildtyp auf die Stimulation mit GH mit einer signifikant erhöhten IGF-I-Genexpression in der Leber reagiert. Untersuchungen an nicht hypophysectomierten Tieren weisen gleichzeitig darauf hin, dass der STAT5b Signaltransduktionsweg nicht der einzige Weg zur Stimulation der IGF-I-Expression ist. Unbekannt ist ebenfalls, ob der STAT5b Signaltransduktionsweg einen direkten oder indirekten Einfluss auf die IGF-I-Genexpression ausübt (DAVEY et al., 2001).

Von ZHU et al. (1998) wurde die p125 Fokale Adhäsions-Kinase (FAK) als weitere intermediäre Komponente der von der JAK2 ausgehenden Signaltransduktionsketten nach GH-Stimulation identifiziert. FAK eröffnet die Möglichkeit der STAT-unabhängigen Signalweiterleitung und stellt eine Verbindung zu den Signaltransduktionswegen her, die durch die extrazelluläre Matrix (ECM) vermittelt werden. FAK spielt eine bedeutende Rolle bei den Integrin-medierten Prozessen während der Entwicklung (RIDYARD & SANDERS, 1999). Diese Prozesse sind beispielsweise ausschlaggebend für die erfolgreiche Nephrogenese (SORENSEN & SHEIBANI, 1999).

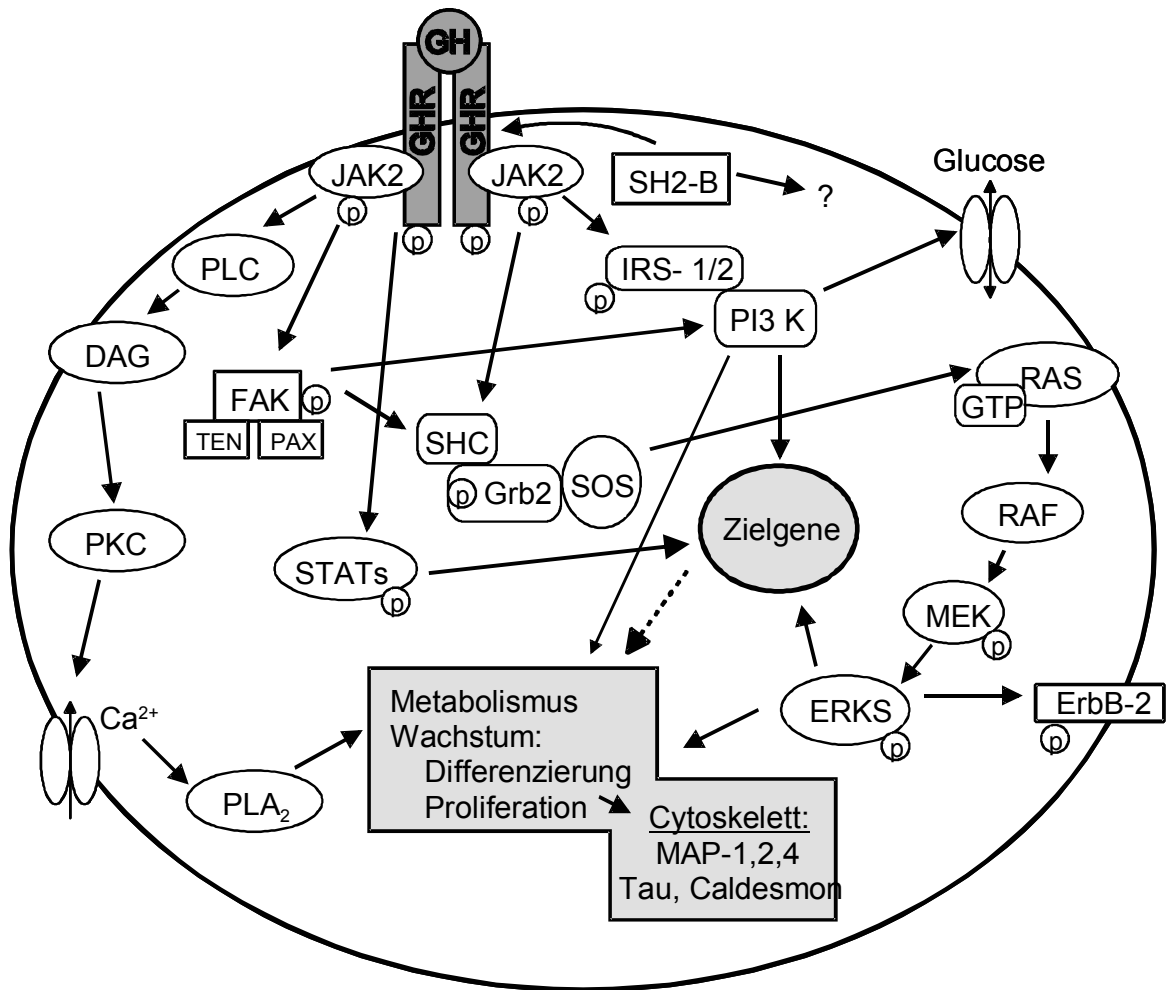


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der vom GHR ausgehenden Signaltransduktionswege (modifiziert nach ZHU et al., 1998; WATERS et al., 1999; CARTER-SU et al., 2000; FRANK et al., 2000; LE ROITH et al., 2001); DAG: Diacylglycerin; ErbB-2: Epidermal-Growth factor Rezeptor-related Oncoprotein; ERKS: extrazellulär signalregulierte Kinasen; FAK: Fokale Adhäsions-Kinase; IRS 1/2: Insulin Rezeptor Substrat 1/2; JAK2: Janus-Kinase 2; MEK: Mitogen aktivierte extrazelluläre Protein-Kinasen Kinasen; PAX: Paxillin; PI3 K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; PLA<sub>2</sub>: Phospholipase A<sub>2</sub>; PLC: Phospholipase C; PKC: Protein-Kinase C; SHC / Grb2: Sr-Homologe mit SH2-Domäne; SOS: son of sevenless (Guanin Nucleotid Austauschfaktor); STATs: signal transducers and activators of transcription; TEN: Tensin; ?: Ziele nicht identifiziert



### **2.3.2. Down-Regulation des GH-Stimulus und Degradierung des GHR**

Die Aktivierung des GHR initiiert Proteine, die das GH-Signal direkt terminieren. In Abhängigkeit vom physiologischen Status wird zugleich die Expression des GHR herunterreguliert.

Als ein Beispiel sei der stimulierte STAT5b-pathway zu nennen, der die Expression von Mitgliedern der SOCS / CIS-Proteinfamilie in der Leber induziert, welche ein negatives feedback bewirken (DAVEY et al., 1999 b; RAM & WAXMAN, 1999).

Der membranständige GHR wird nach der GH-Bindung und Dimerisierung durch Endozytose internalisiert und einem degradierenden System zugeführt. Für die Endozytose wird ein intaktes Ubiquitin-konjugierendes System benötigt (STROUS et al., 1996).

Bei einer GHR-Variante mit alternativem Exon 9 beobachtet man eine gestörte down-Regulation und Endozytose (AMIT et al., 1997).

## **2.4. Regulation der GHR / GHBP-Expression**

Die Kontrolle der GHR-Expression erfolgt durch die Transkription. Die Regulation durch posttranskriptionale, translationale sowie posttranslationale Mechanismen in Abhängigkeit von der Spezies ist anzunehmen, da die Masse der GHR-mRNA nicht unabdinglich mit der Konzentration des Rezeptorproteins korreliert. Auf Grund des entwicklungsbedingten Profils der GHR-mRNA-Konzentration und der GHR-Proteinexpression scheinen während der Ontogenese vorrangig transkriptionale gegenüber translationalen Vorgängen für die GHR-Expression relevant zu sein. Um eine entwicklungs- und gewebespezifische Regulation der Genexpression zu ermöglichen wird der rezeptorcodierende Genabschnitt durch different regulierte Promotoren kontrolliert (MARTINI et al., 1995; MAO et al., 1998; JIANG & LUCY, 2001; zur Übersicht: SCHWARTZBAUER & MENON, 1998; EDENS & TALAMANTES, 1998).

### **2.4.1. GH und Ernährungsstatus**

Die Applikation von GH bewirkt einen Anstieg der GH-Bindung sowie der GHR / GHBP-mRNA-Konzentration (CHUNG & ETHELTON, 1986; SAUERWEIN et al., 1991; MULLIS et al., 1999). Zu unterscheiden sind Effekte nach wiederholten Applikationen und einzelnen Gaben von GH. Letztere führen bei der

Ratte zu einem Abfall der GHR- und GHBP-Konzentration (MAITER et al., 1988). Die beobachteten Effekte stehen in Beziehung zur Pulsatilität der GH-Sekretion (BICK et al., 1989 a,b).

Nach der wiederholten Applikation von GH kommt es zu erhöhten Konzentrationen der GHR-mRNA sowie zu einer Zunahme der GH-Bindungskapazität in der Leber und des GHBP im Plasma des Schweins. Die Veränderungen interagieren positiv mit einer proteinreichen Diät (AMBLER et al., 1992; BRAMELD et al., 1996).

Die Expression der GHR-mRNA im Muskel ist im Gegensatz zur Expression in der Leber invers korreliert mit dem Ernährungsstatus und der Wachstumsrate des Schweins (WELLER et al., 1994). Große, früh abgesetzte Ferkel, weisen jedoch im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit kleineren Tieren eine höhere Konzentration an GHR-mRNA im Skelettmuskel auf. Ein Gewichtseffekt auf die GHR-Genexpression im Skelettmuskel lag bei normal gesäugten Tieren nicht vor (MATTERI et al., 2000).

Nahrungsentzug beim Schaf bewirkt keinen Effekt auf die GHR-Genexpression in der Leber des Fetus. Im Anschluss an die Normalisierung der Fütterung ist im Vergleich zu konstant normal gefütterten Tieren in der Leber der Feten eine erhöhte Konzentration an GHR-mRNA zu beobachten. Im Skelettmuskel werden hingegen bei diesen Tieren keine Effekte auf die GHR-Genexpression registriert (BRAMELD et al., 2000).

Beim jungen Ochsen ist die Zunahme der spezifischen Bindung bei hoher Energiezufuhr assoziiert mit der Induktion des hoch-affinen Rezeptors und der Zunahme seiner Bindungsaffinität (BREIER et al., 1988). Im Gegensatz dazu kann nach Futterentzug eine reduzierte GHR-Bindung und GHR-Genexpression beobachtet werden, die beim Schwein nicht mit der des GHBP im Plasma korreliert (DAUNCEY et al., 1994; COMBES et al., 1997 a,b). Eine GHR-unabhängige Regulation des GHBP wird ebenfalls von SAUERWEIN et al. (1992) für das Schwein vorgeschlagen und scheint auch beim Kaninchen vorzuliegen (YU et al., 1996). Für die Ratte ist im Gegensatz dazu eine enge Korrelation zwischen dem GHR und dem GHBP anzunehmen (BICK et al., 1990; MASSA et al., 1990). Bei Typ-I Diabetikern können Veränderungen der IGF-I-Serumspiegel beobachtet werden (MAES et al., 1986). Insulin ist notwendig für die Aufrechterhaltung der Reaktionsfähigkeit der Leber auf einen GH-Stimulus. Die

anabolischen Effekte des GH sind abhängig vom Insulin. Streptocotocin induzierter Diabetes führt bei der Ratte zu einer reduzierten GH-Bindung und einer geringeren Konzentration an GHR-mRNA sowohl in der Leber als auch in der Niere (CHEN et al., 1997). In der Rattenleberzelllinie H4 bewirkt allerdings die kontinuierliche Stimulation mit Insulin eine GH-Resistenz (JI et al., 1999). Insulin und IGF-I sind in der Lage die GH-Bindung an Osteoblasten zu reduzieren. Die Effekte sind unabhängig von Transkriptions- und Translationsereignissen und werden auf die Inhibition der Rezeptortranslokation zur Zelloberfläche zurückgeführt (LEUNG et al., 1996, 1997).

#### **2.4.2. Geschlechtsspezifische Regulation**

Die Leber der weiblichen Ratte zeigt im Vergleich zur männlichen Ratte eine erhöhte GH-Bindung. Weibliche Tiere weisen ebenfalls mehr GHBP im Plasma bzw. Serum auf. Die Bindungskapazität wird bei der männlichen Ratte durch Östradiol gesteigert. (MASSA et al., 1990; CARMIGNAC et al., 1993).

Untersuchungen hinsichtlich der unterschiedlichen UTR-Varianten der GHR-mRNA ergaben, dass der Geschlechtsdimorphismus in der Rattenleber auf die mRNA-Variante GHR1 (V2) zurückzuführen ist. Die Expression dieser Variante reagiert sensibel auf GH und ist während der Trächtigkeit signifikant erhöht. Die GHR1-Variante wird durch Östradiol induziert. Die GH-Effekte werden moduliert durch das geschlechtsbedingte Muster der GH-Sekretion. Die Kastration der männlichen Ratte bewirkt infolge der Verweiblichung des GH-Profiles eine verstärkte Expression der GHR1-Variante (BAUMBACH & BINGHAM, 1995; GABRIELSSON et al., 1995). Im Nucleus arcuatus des Rattengehirns, der nicht die leberspezifische Variante GHR1 exprimiert, ist nach Östradiolbehandlung im Gegensatz zur Leber ein Abfall der GHR-Genexpression zu verzeichnen (BENNETT et al., 1996).

Eine gewebespezifische Regulation der Genexpression des GHR ist während der puberalen Wachstumsphase auch beim Kaninchen nach einer Östradiol- bzw. Testosteronbehandlung gegeben (YU et al., 1996). Beim jungen Ochsen kann infolge der kontinuierlichen Zufuhr von Östradiol die Zunahme der Rezeptorkapazität beobachtet werden (BREIER et al., 1988).

Während der Trächtigkeit findet bei der Maus eine Zunahme der GHR- und GHBP-mRNA-Konzentration sowie der GH-Bindungskapazität in der Leber und im Serum statt. Die Zunahme der Genexpression ist gewebespezifisch und auf

die Leber beschränkt. In der Milchdrüse kann ein Abfall beider Transkripte registriert werden. (CRAMER et al., 1992; ILKBAHAR et al., 1995). Es ist denkbar, dass sich die Zunahme der GHR / GHBP-mRNA-Konzentration auf das L1-Transkript bezieht, da dieses nur während der Trächtigkeit exprimiert wird. Außerhalb dieser Zeit dominiert das L2-Transkript in der Leber der Maus (SOUTHARD et al., 1995).

### **2.4.3. Corticosteroide**

In der Leber der Ratte wird die Expression des GHR und des GHBP durch Corticosteroide inhibiert und teilweise durch Östradiol invers moduliert. Alle untersuchten Varianten des Rezeptors, einschließlich GHR1, sind involviert. So ist bekannt, dass höhere Dosen an Nebennierensteroiden und Östradiol zu verringertem Wachstum und reduzierter Nahrungsaufnahme bei der Ratte führen. Eine veränderte Nahrungsaufnahme konnte daher als indirekter Grund der geänderten GHR-Expression nicht ausgeschlossen werden (GABRIELSSON et al., 1995). Im Hypothalamus der Ratte wirkt Dexamethason bei signifikanter Gewichtsreduktion inhibitorisch auf die GHR-Genexpression durch die Neurone des Nucleus periventricularis und Nucleus arcuatus (SENARÍS et al., 1996). Untersuchungen von BENNETT et al. (1996) führten bei einer geringeren Dosierung (10 µg / Tag vs. 40 µg / Tag) und vergleichbaren Behandlungszeiträumen nicht zu signifikanten Dexamethasoneffekten im Nucleus arcuatus. HEINRICHS et al. (1994) beobachteten beim Kaninchen unter Verwendung einer wachstumsmindernden Dexamethasondosis eine ansteigende GHR-Genexpression und GH-Bindung im Serum, wobei geringere Dosen zu stärkeren Effekten führten. Von einer gewebespezifischen Regulation ist auszugehen, da der Anstieg in der Leber sowie im Knorpelgewebe der untersuchten Epiphysenfugen, nicht jedoch in der Niere, beobachtet wurde. In der primären Schweinehepatocytenkultur kann nach Zugabe von Dexamethason ein Anstieg der GHR-Genexpression verzeichnet werden, der durch die gleichzeitige Inkubation mit GH forciert wird. Effekte auf die IGF-I-mRNA-Konzentration sind ebenfalls zu beobachten (BRAMELD et al., 1995 a). Eine positive Korrelation zwischen dem vorgeburtlichen Anstieg der Cortisolplasmakonzentration beim ovinen Fetus und der GHR-Genexpression in der Leber des Fetus ist zu beobachten. Parallel mit dem Cortisolanstieg steigt die Expression der GHR-1A

Variante und anderer, nicht weiter identifizierter GHR-mRNA Spezies, an (LI et al., 1996, 1999).

#### **2.4.4. Hormone der Schilddrüse**

Der GHR steht in reziproker Beziehung zum Schilddrüsenhormon-Status. Direkt nach der Geburt weisen hypothyreotide Ratten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine erhöhte GHR / GHBP-Genexpression auf (STEPHAN et al., 1993). HOCHBERG et al. (1990) stellten fest, dass die Kapazität der GH-Bindung an Lebermenbranen der weiblichen Ratte durch die Schilddrüsenhormone positiv reguliert wird. CHERNAUSEK et al. (1982) beobachteten in der Leber von männlichen Ratten eine gesteigerte GH-Bindung nach Thyreoidektomie. Vermutlich lässt sich die beobachtete Diskrepanz, wie von HOCHBERG et al. (1990) vorgeschlagen, auf die Geschlechtsdifferenzen des den beiden Studien zu Grunde liegenden Tiermaterials oder aber auf die Art der Präparation des Zellmaterials zurückführen. Eine geschlechtsspezifische Regulation der GHR-Genexpression in der Leber der Ratte durch  $T_4$  ist von ROMERO et al. (1996) beschrieben worden. Thyreoidektomie resultiert demnach in einem Anstieg der GHR / GHBP-mRNA-Konzentration beim weiblichen- und in einem Abfall beim männlichen Tier. Wird  $T_4$  substituiert, kann im Vergleich zur intakten Kontrolle beim weiblichen Tier ein vergleichbarer Wert und bei der männlichen Ratte ein signifikanter Anstieg der GHR / GHBP-mRNA-Konzentration beobachtet werden.  $T_3$  und  $T_4$  sind in der Lage die GHR-Genexpression kultivierter Hepatozyten des Schweins zu stimulieren. Die durch GH stimulierte Genexpression des IGF-I wird durch die Schilddrüsenhormone verstärkt (BRAMELD et al., 1995 a). Erhöhte Konzentrationen von IGF-I im Serum und der IGF-I-mRNA in der Leber werden auch beim Huhn nach der Applikation von  $T_4$ , infolge einer verstärkten GHR-Genexpression, gemessen (TSUKADA et al., 1998). In der humanen Lebertumorzelllinie HuH 7 wird die Konzentration der GHR / GHBP-mRNA durch  $T_3$  dosisabhängig erhöht. Nach MULLIS et al. (1999) ist der vom  $T_3$  bewirkte Effekt indirekt. Die Synthese weiterer Proteine ist notwendig, was durch die Inhibition des  $T_3$ -Effekts durch Cycloheximid nachgewiesen wurde. Untersuchungen an hypothyreoiden Schweinen weisen auf eine entwicklungsabhängige Modulation der GHR-Genexpression durch den Schilddrüsenhormon-Status hin. Die Regulation kann gewebespezifisch den

Abfall, als auch den Anstieg der GHR-mRNA-Konzentration beinhalten (DUCHAMP et al., 1996).

#### **2.4.5. Regulation des GHR-Genlocus durch *cis*-aktive Elemente**

Die Steroidrezeptoren als auch die Schilddrüsenhormonrezeptoren gehören zur nukleären Rezeptorsuperfamilie (zur Übersicht: GLASS, 1994). Der Nachweis von spezifischen Consensus-Sequenzen für entsprechende Rezeptoren in der GHR-Promotorregion könnte zu einer umfassenderen Aufklärung der komplexen Rolle der Steroide bei der Modulation der GH-Effekte beitragen. Zusätzliche posttranskriptionale Ereignisse sind nicht auszuschließen (BENNETT et al., 1996; ROMERO et al., 1996; YU et al., 1996). Den vorangehenden Überlegungen steht allerdings zumindest im Fall der  $T_3 / T_4$  -Effekte auf die GHR-Genexpression entgegen, dass diese auf Grund der notwendigen Proteinneusynthese vermutlich indirekt sind. Im Weiteren sind im Vergleich zum GH-Promotor in der GHR-Promotorregion bisher keine entsprechenden Reaktionselemente (RE) für  $T_3 / T_4$  identifiziert worden (MULLIS et al., 1999). Von Effekten der Retinolsäure, welche die GHR-Genexpression wie das  $T_3$  über einen nukleären Rezeptor moduliert, wurde allerdings auch berichtet. Retinolsäure stimuliert die GHR-Genexpression in embryonalen Stammzellen des präimplantierten Mausembryos (OHLSSON et al., 1993). Andererseits inhibiert es die Induktion der GHR-mRNA von Präadipocyten der Linie 3T3-L1 (ZOU et al., 1997 b).

Bekannt sind einige *cis*-aktive Motive, zu denen das Glucocorticoid-RE sowie die CCAAT-Box, als Erkennungsmotiv für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, gehören (zur Übersicht: SCHWARTZBAUER & MEMON 1998).

Proteine der SP-Familie spielen eine Rolle bei der Entwicklung des ontogenetischen Profils der GHR-Expression in der Leber. Die Proteine der SP-Familie, die an GC-reiche Sequenzen ohne TATA-Box binden, haben Teil an der Transkription über den P2-Promotor des GHR-Gens und somit auch an der Expression der L2-Variante der GHR-mRNA der Maus. Sp1 antagonisiert die Fähigkeit von Sp3 den L2-Promotor zu transaktivieren und ist selbst nur ein schwacher Aktivator der GHR-Genexpression. Sp3 steigt in der Leber der Maus nach der Geburt stark an. Sp1 hingegen fördert den Übergang von der fetalen hin zur postnatalen GHR-Genexpression. Die Konzentration an Sp1 ist in der fetalen- im Vergleich zur adulten Leber angehoben (ADAMS, 1999; YU et al., 1999). Von

einem Effekt des SP1 auf die Expression des bovinen 1B GHR-Transkripts ist auszugehen (JIANG et al., 2000).

Der Transkriptionsfaktor MSY-1, der ca. 3,5 Kb stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle des GHR-Gens bindet, wirkt inhibitorisch auf die GHR-Genexpression. MSY-1 hat Teil an der trächtigkeitsspezifischen GHR-Expression in der Mäuseleber. Die Konzentration von MSY-1 fällt während der Trächtigkeit in den Leberzellnuclei ab (SCHWARTZBAUER et al., 1998).

## **2.5. Expression des GHR und der GHR / GHBP-mRNA bei verschiedenen Spezies während der Ontogenese**

Der GHR bzw. die GHR / GHBP-mRNA werden in einer Vielzahl von Geweben exprimiert (MERCADO et al., 1994; ZOGOPOULOS et al., 1996 a). Über die Mechanismen, welche die Ontogenese der GHR-Genexpression regulieren, ist wenig bekannt. (JIANG et al., 1999). Im Folgenden werden die bisherigen Erkenntnisse zur Ontogenese des GHR und der GHR / GHBP-mRNA in diversen Geweben und Organen bei verschiedenen Spezies aufgeführt.

### **2.5.1. Maus**

Während der Embryonalentwicklung können die GHR-mRNA und das resultierende Protein bereits vor der Implantation des Mausembryos beobachtet werden. Der in der Blastocyste immunhistochemisch detektierbare Rezeptor ist auf Grund des nachgewiesenen GH-abhängigen Glucosetransports als funktionell aktiv anzusehen (OHLSSON et al., 1993; TERADA et al., 1996; PANTALEON et al., 1997; WATERS, 1999). Im Verlauf der pränatalen- zur postnatalen Entwicklung hin nimmt ausgehend von Tag 14 der Trächtigkeit die Konzentration der GHR / GHBP-mRNA in der Leber des Fetus kontinuierlich zu (ILKBAHAR et al., 1995).

### **2.5.2. Ratte**

Die GHR / GHBP-mRNA der Ratte wird in unterschiedlichen fetalen Geweben exprimiert. Eine GHR-Immunoreaktivität kann ab Tag 12 der Fetalentwicklung beobachtet werden und nimmt, wie auch die Expression der GHR / GHBP-mRNA in der Leber, bis Tag 18 p.c. stetig zu. Der immunhistochemische Nachweis des GHR korreliert stark mit der von HILL et al. (1989) beim humanen Fetus beobachteten IGF-I-Immunoreaktivität (GARCÍA-ARAGÓN et al., 1992). Bekannt

sind während der Entwicklung allerdings auch Gewebe in denen die GHR / GHBP-mRNA, nicht jedoch die IGF-I-mRNA beobachtet werden kann. Als Beispiel ist hier das metanephrogene Blastem nach 18,5 Tagen der Fetalentwicklung zu nennen (EDMONDSON et al., 1995). Ab dem 19. Entwicklungstag ist eine große Übereinstimmung in der Niere, der Leber und dem Ileum mit den Syntheseorten der IGF-I-mRNA gegeben. Die GHR- und die GHBP-mRNA werden in diesen Geweben abweichend voneinander reguliert (WALKER et al., 1992). Am Tag 19 der pränatalen Entwicklung ist der Rezeptor als funktionell aktiv anzusehen. Dieses zeigen GH-Effekte auf die Tyrosinphosphorylierung und auf die IGFBP-2 Expression in einer Kultur von fetalem Lungengewebe (BATCHELOR et al., 1998). Die Ergebnisse werden durch den Nachweis der intakten GH-Signaltransduktion in Hepatocyten dieser Altersgruppe bestätigt (PHORNPHUTKUL et al., 2000).

Betrachtet man die postnatale Expression der GHR-mRNA in der Leber, so ist festzustellen, dass bis zum Alter von 6 Wochen ein deutlicher Anstieg der GHR-mRNA-Konzentration zu verzeichnen ist. Die Expression erfolgt koordiniert mit der IGF-I-mRNA-Expression. Die Regulation ist in der Leber der juvenilen Ratte GH-unabhängig. Andere Gewebe zeigen abweichende Expressionsprofile während der postnatalen Entwicklung. In der Niere sind nach einem Anstieg der Genexpression bis zur 5. Woche nur geringe Veränderungen zu beobachten (MATHEWS et al., 1989; DOMENÉ et al., 1993; SHOBA et al., 1999).

### **2.5.3. Schaf**

Die GHR-mRNA kann in der fetalen Schafleber erstmals am 35. Tag der pränatalen Entwicklung nachgewiesen werden (LACROIX et al., 1999). Die erfolgreiche GH-Bindung an fetale Lebermembranpräparationen am Tag 51 der Entwicklung deutet auf das GHR-Protein hin, obwohl die Bindungsstellen des Fetus eher laktogene als somatogene Charakteristika aufweisen. Die Konzentration der GHR-mRNA ist während dieser Entwicklungsphase in der Leber deutlich höher als in der Muskulatur des Fetus. Im Vergleich zur maternalen Leber hat das Signal in der fetalen Leber einen Anteil von 13 %. Während der späteren Fetalentwicklung findet man im Muskelgewebe eine im Vergleich zur Leber stärkere GHR-Genexpression. Die Niere ist während der gesamten fetalen Entwicklung das Organ mit der höchsten Signaldichte an GHR-



mRNA (GLUCKMAN et al., 1983, KLEMPT et al., 1993). In der fetalen Leber können in der Mitte der Trächtigkeit Varianten der GHR-mRNA registriert werden, die von dem beim perinatalen oder adulten Schaf von O'MAHONEY et al. (1994) beschriebenen 1A-Transkript abweichen (PRATT & ANTHONY, 1995). Das leberspezifische ovine mRNA-Transkript 1A kann erstmals am 138. Tag der pränatalen Entwicklung beobachtet werden. Andere, nicht weiter identifizierte Transkripte, sind zu diesem Zeitpunkt in deutlich höheren Konzentrationen vorhanden (LI et al., 1999).

#### **2.5.4. Rind**

Die GHR-mRNA wird beim *in vitro* fertilisierten bovinen Embryo bereits am Tag 2 der Entwicklung beobachtet. Der immunhistochemische Nachweis ist ab Tag 3 der *in vitro* Embryogenese möglich. Zwischen Tag 2 und Tag 6 steigt die GHR-Genexpression stark an, um dann wieder abzufallen. Von der Funktion des Rezeptorproteins ist ab Tag 6 der Entwicklung auszugehen. GH im Kulturmedium bewirkt ab diesem Alter Effekte auf die Feinmorphologie des Embryos, die sich auf den Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel beziehen (KÖLLE et al., 2001).

Die Niere ist das erste Organsystem, das während der Fetalentwicklung die GHR-mRNA und das korrespondierende GHR-Protein exprimiert. Beim 5 Wochen alten Embryo liegt im Tubulusepithel des Mesonephros eine übereinstimmende Lokalisation beider Signale vor. Ab Tag 40 werden die GHR-mRNA und das GHR-Protein im Nervensystem und im Muskelgewebe exprimiert. Ein Signal wird in der Leber nicht vor der 6. Woche beobachtet (KÖLLE et al., 1998). Auf Grund der Lokalisation des GHR und seiner mRNA ist anzunehmen, dass der GHR auch Anteil an der pränatalen Entwicklung der Milchdrüse hat (KNABEL et al., 1998). An fetalen Thymozyten kann man die spezifische GH-Bindung ab Tag 60 bis Tag 120 der Trächtigkeit beobachten. Thymozyten späterer Altersgruppen zeigen eine geringere GH-Bindung. Der GHR fetaler Thymozyten (ca. 120 p.c.) ist funktionsfähig, da die Stimulation mit GH die Expression unterschiedlicher Cytokin-mRNA's steigert (CHEN et al., 1998). Betrachtet man die individuellen Varianten der GHR-mRNA ist festzustellen, dass in der pränatalen Rinderleber die Varianten 1B und 1C identifiziert werden können. Die Variante 1C hat einen Anteil von 30 % in der fetalen Leber. Signale der 1C-mRNA werden auch in der Niere und im Muskelgewebe des Fetus beobachtet. In der Niere hat das Transkript 1C einen Anteil von mehr als 40 %.

Postnatal ändert sich das Expressionsniveau nicht relevant. Das in der Leber des adulten Tiers überwiegende Transkript 1A wird pränatal nicht exprimiert. (JIANG et al., 1999; LUCY et al., 1998).

#### **2.5.5. Mensch**

Der GHR kann bereits nach 8,5 bis 9 Wochen der humanen Fetalentwicklung immunhistochemisch in der Leber und der Niere nachgewiesen werden. Der positive Nachweis in der fetalen Leber bezieht sich auf bestimmte Subpopulationen der Parenchymzellen sowie die Gallengänge. Die hämatopoetischen Zellen weisen wenig oder kein Signal auf. Ab der Mitte der Schwangerschaft kann die spezifische GH-Bindung an Leberzellmembranen beobachtet werden. Von der 13. Entwicklungswoche an sind in der Niere fast alle Epithelzellen der cortikalen und medulläre Tubulusanteile in die Expression des GHR, bei einem stärkeren Signal in der Medulla, involviert. Während der weiteren pränatalen und postnatalen Entwicklung sind Mesenchymzellen als auch weiterhin proximale und distale Tubulusepithelzellen des Cortex sowie die Sammelrohre und die Henlesche Schleife der Medulla immunoreaktiv. Eine transiente Expression des GHR kann auch in einer Anzahl von visceralen Epithelzellen der fetalen Glomeruli registriert werden. Weitere Zelltypen unterschiedlicher Gewebe, wie die Chondrocyten der Wachstumsplatte und die Fibroblasten der Haut, weisen ebenfalls Signale auf. Kultivierte fetale Chondrocyten ebenso wie Fibroblasten binden spezifisch GH. Keine Detektion des GHR gelingt im ersten Trimester der Schwangerschaft in der Lunge, dem Skelett- und Herzmuskel sowie in weiteren Geweben (HILL et al., 1988, 1992, HILL, 1992; WERTHER et al., 1993; SIMARD et al., 1996), obwohl der Nachweis der GHR-mRNA in der Lunge und im Muskelgewebe des Fetus gegeben ist (ZOGOPOULOS et al., 1996 a).

Betrachtet man die Expression unterschiedlicher Varianten der humanen GHR-mRNA, so ist festzustellen, dass im Vergleich zum V1-Transkript das V3-Transkript ubiquitär in der Leber und anderen fetalen und postnatalen Geweben zu finden ist. Die Expression der V1-Variante ist nur in der postnatalen Leber zu beobachten und wird demnach entwicklungs- und gewebespezifisch reguliert (ZOGOPOULOS et al., 1996 b).

### 2.5.6. Schwein

Der Nachweis der GHR-mRNA ist in der Leber des Schweinefetus erstmals um Tag 90 der Trächtigkeit auf geringstem Niveau mit einem Northern blot möglich. Die Expression ist pränatal in der Niere und im Muskelgewebe deutlich stärker ausgeprägt als in der Leber. Bindungsstudien erlauben den Nachweis des GHR in der Leber ab Tag 113 p.c.. Im Skelettmuskel, wie auch im Plasma, ist eine GH-Bindung bereits ab dem 75. Tag p.c. zu beobachten. Postnatal kommt es nach dem Absetzen der Ferkel zu einem Abfall der GHR-mRNA in der Niere und im Pankreas. Einer mehr gleichbleibenden Expression im Skelettmuskel steht in der Leber ein postnataler Anstieg der GHR-Genexpression gegenüber. Das Absetzen der Ferkel hat keinen Einfluss auf das Expressionsprofil der GHR-mRNA in der Leber, dem Skelettmuskel und dem Fettgewebe. Der Anstieg der GHR-Genexpression in der Leber spiegelt die zunehmende GH-Bindung an microsomale Membranproteine wieder. Eine altersabhängige Änderung der GH-Bindung im Skelettmuskel und in der Niere kann nicht beobachtet werden (LEE et al., 1993; BINGHAM et al., 1994; DUCHAMP et al., 1996; PENG et al., 1996, 1998; SCHNOEBELEN-COMBES et al., 1996; MATTERI et al., 2000). Wie bei anderen Spezies, werden auch beim Schwein die bisher identifizierten GHR-mRNA-Varianten während der postnatalen Ontogenese entwicklungs- und gewebespezifisch exprimiert. Die mRNA-Variante 1B ist bis zum Alter von 77 Tagen in der Leber das vorherrschende GHR-Transkript. Die in der Leber des trächtigen Tieres dominant exprimierte Variante 1A kann bis zum Alter von 28 Tagen p.p. nur in geringsten Konzentrationen detektiert werden. Das Transkript 1B wird im Vergleich zum 1A-Transkript des 77 Tage alten Tiers auch im Skelettmuskel beobachtet. Die vorliegende Untersuchung lässt auf Grund von nicht weiter spezifizierten Signalen im Ribonuclease Protection Assay die Existenz von zusätzlichen mRNA-Spezies beim Schwein vermuten (LIU et al., 2000).

Im Vergleich zu anderen Spezies liegen für das Schwein keine Informationen zur GHR-Genexpression in den unterschiedlichen Organen während der Embryonalentwicklung bzw. der frühen Fetalentwicklung vor. Informationen zu pränatalen Genexpression der bisher bekannten GHR-mRNA-Varianten existieren nicht. Immunhistochemische Nachweise und *in situ* Hybridisierungen zur zellulären

Lokalisation des GHR und seiner mRNA wurden während der Ontogenese des Schweins bisher nicht geführt.

## **2.6. Der GHR und die renale GH / IGF-Achse**

Effekte des GH auf die Nierenfunktion sind seit langer Zeit bekannt. Diese beinhalten Veränderungen des Mineralhaushalts und der Hämodynamik (HENNEMAN et al., 1960; CORVILAIN & ABRAMOW, 1962).

Die renale GH / IGF-Achse hat eine wichtige Rolle bei der Nephrogenese und der Nierenentwicklung. Zudem liegt eine weitreichende Funktion beim pathologischen Verlauf von verschiedenen Nierenerkrankungen vor. (zur Übersicht: FELD & HIRSCHBERG, 1996; WOLF et al., 2000; RICHMOND et al., 2001). Auf Grund dieser Relevanz wird im Folgenden gesondert auf die Expression von Komponenten der GH / IGF-Achse in der Niere eingegangen.

In der Niere können der GHR, IGF-I und IGF-II sowie deren Rezeptoren bzw. IGFBP's nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Immunhistochemie und der *in situ* Hybridisierung konnten die Expression der Proteine bzw. deren mRNA's in der Niere lokalisiert werden. IGF-I und IGF-II ließen sich nach einer Gewebeextraktion ebenfalls mittels RIA detektieren. Die Expression der Proteine ist hoch organisiert und unterscheidet sich zwischen den funktionell abgrenzbaren Abschnitten des Nephrons.

Beim Schwein sind die Transkripte des IGF-I und IGF-II, die mRNA's ihrer Rezeptoren genauso wie die mRNA's des IGFBP-1 und IGFBP-3 bereits während der Fetalentwicklung nachgewiesen worden (PENG et al., 1996). In der Niere der Ratte können das IGF-I als auch die IGF-I-mRNA detektiert werden, obwohl ein Nachweis in der humanen Niere nicht möglich ist. Die renale IGF-I-mRNA wird bei der Ratte vorrangig in der äußeren Medulla exprimiert. Die Applikation von GH bewirkt bei hypophysektomierten Ratten den Anstieg des immunoreaktiven IGF-I in cortikalen und medullären Abschnitten der Niere. Im Bereich der inneren Medulla ist die höchste spezifische IGF-I-Bindung zu beobachten. Diese wird zumindest teilweise auf die Bindung an IGF-Bindungsproteine (IGFBP) zurückgeführt (BORTZ et al., 1988; CHIN & BONDY, 1992; MATEJKA et al., 1992). Die renale IGF-I-Synthese wird durch GH reguliert (D'ERCOLE et al., 1984; BORTZ et al., 1988; ROGERS et al., 1990). Eine signifikante IGF-I-Genexpression kann allerdings auch nach Hypophysektomie in

der äußeren Medulla der Rattenniere beobachtet werden. Sie wird durch die Gabe von GH weiter angehoben (CHIN et al., 1992 a).

Bereits während der Fetalentwicklung kann die GHR-mRNA in der Niere der Ratte im äußeren Streifen der äußeren Medulla als auch in den Markstrahlen beobachtet werden. Postnatal kommt der innere Streifen der äußeren Medulla hinzu. Die Expression der GHR-mRNA kann der Pars recta des proximalen Tubulus als auch der Pars recta des distalen Tubulus zugeordnet werden. Nur in der Pars recta des distalen Tubulus findet die parallele Expression der GHR-mRNA mit der IGF-1-mRNA und IGF-I-Rezeptor-mRNA statt. Einige proximale Tubulusabschnitte des Cortex weisen ebenfalls Signale der GHR-mRNA *in situ* auf. Hypophysektomie bewirkt den Abfall der GHR-Genexpression in der Niere, welcher durch die Substitution mit GH revidiert werden kann. Nachweislich steht der proximale Tubulus in direkter Beziehung zur GH-bedingten Phosphat-Reabsorption und Gluconeogenese (CHIN et al., 1992 b).

### **3. Interaktion der somatotrophen Achse mit dem Vitamin-D-endokrinen System**

#### **3.1. Vitamin-D-endokrines System**

Das pflanzliche Vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol) und das in der Haut synthetisierte oder mit der Nahrung aufgenommene Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) werden bei vergleichbarer Aktivität als Vitamin D bezeichnet. Sie sind die Vorstufen einer Anzahl von Vitamin-D-Metaboliten. Das seco-Steroid 1,25-Dihydroxy Vitamin D<sub>3</sub> (Calcitriol) ist die metabolisch aktivste Form des Vitamin D. Calcitriol spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase. Dabei moduliert es die Calcium- und Phosphatabsorption (REICHEL et al., 1989). Es ist erforderlich für die normale Entwicklung und Aufrechterhaltung des mineralisierten Knochens. Direkte anabole Effekte auf Osteoblasten sind nachgewiesen worden (KURIHARA et al., 1986). Gleichzeitig stimuliert es die Knochenresorption (RAISZ et al., 1972). Antiproliferierende, aber auch proliferierende sowie differenzierende Wirkungen werden dem Calcitriol zugesprochen. Weitere Funktionen des Calcitriol in unterschiedlichen Geweben

und Entwicklungsstadien sind bekannt. Nach NORMAN (1980) beinhalten diese auch Effekte auf die Insulinsekretion.

Der Hauptsyntheseort des Calcitriol ist die Niere. Extrarenale Lokalisationen der Genese sind bekannt. Die Synthese erfolgt durch die  $1\alpha$ -Hydroxylase, welche eine Cytochrom P<sub>450</sub>-Monooxygenase mit gemischter Funktion ist. Beim Schwein findet die  $1\alpha$ -Hydroxylierung vornehmlich durch ein mitochondriales Enzym statt. Von AXÉN (1995) wurde allerdings auch ein microsomales Enzym mit entsprechender Aktivität aus der Niere und aus der Leber isoliert. Nach Ansicht von KATO (2001) sind zumindest für den Menschen neben der  $1\alpha$ -Hydroxylase (CYP27B1) weitere Enzyme anzunehmen, die ebenfalls die spezifische oder aber unspezifische Produktion von Calcitriol bewirken.

Die Kontrolle der Calcitriolsynthese erfolgt durch die klassischen mineralregulierenden Zielorgane Niere, Darm, Knochen und Nebenschilddrüse.

Die vorrangigen Regulatoren der Calcitriolsynthese sind Parathyrin (PTH), Calcitonin, Calcium, Phosphat und Calcitriol selbst (PAULSON & DeLUCA, 1985; HENRY, 1992; SILVER & NAVEH-MANY, 1993; IDA et al., 1995; MENARD et al., 1995; zur Übersicht: DeLUCA, 1984; DeLUCA et al., 1990; BOUILLON et al., 1995; BROWN et al., 1999; HEWISON et al., 2000; SALLE et al., 2000).

Calcitriol entfaltet seine Effekte vornehmlich am Darm und an den Knochen. Die Wirkungsorte des PTH sind die Knochen und die Niere. Dabei ist Calcitriol in der Lage den PTH-abhängigen Calciumtransport zu modulieren. PTH und Calcitonin steigern die Calcitriolkonzentration im Serum. Die Genexpression der  $1\alpha$ -Hydroxylase in der Niere wird durch PTH und Calcitonin erhöht. Calcitriol reduziert die Konzentration der Calcitonin-mRNA und der PTH-mRNA und blockiert die stimulierenden PTH- und Calcitonineffekte auf die eigene Synthese (SILVER et al., 1986; FRIEDMAN & GESEK, 1993; SILVER & NAVEH-MANY, 1993; MURAYAMA et al., 1999).

### 3.2. Effekte von GH und IGF-I auf die Calcitriolsynthese und die Mineralhomöostase

Viele Effekte der somatotrophen Achse auf den Knochenstoffwechsel werden durch das Vitamin-D-endokrine System vermittelt (PFEILSCHIFTER, 1997). Die Haupteffekte der GH/IGF-I-Achse auf das Vitamin-D-endokrine System scheinen die Aktivität der renalen  $1\alpha$ -Hydroxylase zu betreffen (SAGGESE et al., 1995). IGF-I ist in der Lage die GH-Effekte auf eine Anzahl renaler Funktionen zu vermitteln. Zu ihnen gehören die IGF-I-vermittelten, PTH-unabhängigen, GH-Effekte auf die renale  $1\alpha$ -Hydroxylase (BIANDA et al., 1997, 1998) sowie die forcierte Phosphat- und Natrium-Reabsorption bei einer gesteigerten glomerulären Filtrationsrate (CAVERZASIO et al., 1990).

IGF-I moduliert die renale 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>  $1\alpha$ -Hydroxylaseaktivität zeit- und dosisabhängig (NESBITT & DREZNER, 1993). Die Effekte des IGF-I sind vermutlich indirekt, da sie die Proteinneusynthese beinhalten. Gleichzeitig sind sie im Gegensatz zu den PTH-Effekten calciumabhängig (MENAA et al., 1995).

GH ist bei der Ratte in der Lage die Calcium- und Phosphatabsorption im Darm zu erhöhen. Dies ist bedingt durch eine gesteigerte Calcitriolsynthese (SPANOS et al., 1978). Hypophysektomie bewirkt eine verringerte  $1\alpha$ -Hydroxylierung des 25-Hydroxy Vitamin D<sub>3</sub> in der Niere der Ratte, welches zu einer verringerten Calcitriolkonzentration im Serum führt. GH erhöht bei diesen Tieren die intestinale Calciumabsorption, ohne dass eine Änderung des Mucosagewichts beobachtet wird (WONGSURAWAT et al., 1984; YEH & ALOIA, 1984). Unter Phosphatmangel wird die abgesenkte Calcitriolkonzentration im Plasma der hypophysektomierten Ratte durch die Applikation von GH gesteigert und durch die Substituierung von T<sub>3</sub> weiter angehoben (GRAY et al., 1983; GRAY, 1987).

Auch beim Menschen kann eine gesteigerte Calcitriolsynthese nach der Applikation von GH beobachtet werden, welche unabhängig vom PTH ist und durch IGF-I vermittelt wird (OGLE et al., 1994; WRIGHT et al., 1997; WEI et al., 1998).

Die beim Menschen gemachten Beobachtungen sind gleichwohl kontrovers. GERTNER et al. (1979) beobachteten zwar einen Abfall der Calciumexkretion und einen Anstieg der Phosphatreabsorption nach der Behandlung von Kindern mit GH-Mangel, die Effekte waren allerdings PTH- und Calcitriol-unabhängig.

Die GH-Behandlung GH-defizitärer Kinder resultiert in einer Steigerung der glomerulären Filtrationsrate. HARBISON & GERTNER (1990) konnten unter Phosphatdeprivation einen weiteren Anstieg der Filtrationsrate beobachten. Nur in dieser Situation stellten sie auch eine gesteigerte Calcitriolsynthese fest.

BURSTEIN et al. (1983) registrierten, dass hohe Dosen von GH nur kurzzeitig in der Lage sind, einen positiven Effekt auf die Calcitriolsynthese zu bewirken. Ein signifikanter Effekt auf die Calcitriolwerte ist bereits nach 4 Behandlungstagen zu verzeichnen (BRIXEN et al., 1992).

Von CHIPMAN et al. (1980) wurde festgestellt, dass die langfristige Therapie mit GH, bei einer forcierten Calciumaufnahme, den Abfall der Calcitriolsynthese zur Folge hat. WEI et al. (1997) konnten bei GH-defizitären Kindern einen Anstieg der Calcitriol-Konzentration nach der Therapie mit GH bei einem Abfall der PTH-Werte beobachten. Die Calcitriolwerte blieben über den gesamten Untersuchungszeitraum von 6 Monaten erhöht. Bei den Kindern lagen keine Veränderungen der Phosphat- und Calciumkonzentration im Serum vor. Die renale Calciumexkretion und Phosphatreabsorption wurden gesteigert. Die erhöhte Calciumexkretion könnte allerdings eher durch Prolaktin als durch das GH verursacht worden sein (FELD & HIRSCHBERG, 1996).

Auch beim Schwein sind positive Effekte des GH auf die Calcium- und Phosphatabsorption und deren Retention aus Untersuchungen an heranwachsenden intakten männlichen Schweinen und Börgen bekannt. Die Effekte sind unabhängig vom PTH. Bei den Tieren wird der Vitamin-D-Metabolismus stimuliert, was sich aus einer gesteigerten Konzentration an Calcitriol im Serum und Plasma sowie aus einer erhöhten Konzentration des Vitamin-D-abhängigen Calciumbindungsproteins Calbindin-D<sub>9k</sub> (CaBP) im Jejunum ableiten lässt. Die Masse des Dünndarms und der Niere waren infolge der GH-Applikation in dieser Untersuchung erhöht. Gleichzeitig war die Bindungskapazität des Vitamin-D-Rezeptors in der Niere der behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verringert (GOFF et al., 1990; DENIS et al., 1994). Die ursprüngliche Annahme von MAUNDER et al. (1987), nach der GH keinen Einfluss auf die Expression des CaBP beim Schwein ausübt, konnte nicht bestätigt werden.

Auch bei der hypophysektomierten Ratte wird durch die Applikation von GH das CaBP verstärkt synthetisiert (BRUNS et al., 1983). GH und PTH haben additive Effekte auf die Expression des CaBP bei älteren weiblichen Ratten. Die



Wirkungen von GH und PTH auf die Konzentration an CaBP und eine erhöhte Calciumabsorption sind unabhängig voneinander. Die Calcitriolkonzentration im Serum wird bei den älteren Tieren im Untersuchungszeitraum von 12 Tagen nur durch PTH signifikant gesteigert. Es kann eine erhöhte Phosphatkonzentration im Serum beobachtet werden (FLEET et al., 1994).

### 3.3. Effekte von Calcitriol auf die GH-Synthese und GH-Sekretion

Calcitriol bewirkt seine genomischen Effekte über einen Rezeptor (Vitamin-D-Rezeptor), der zur nukleären Rezeptorsuperfamilie gehört. Die Rezeptoren dieser Familie fungieren als Transkriptionsfaktoren. Über die nichtgenomischen Effekte des Calcitriol auf die Genexpression ist wenig bekannt (YANAKA et al., 1998; zur Übersicht: GLASS, 1994; CARLBERG, 1995; MALLOY et al., 1999).

Calcitriol reduziert die Bindungskapazität des nukleären Schilddrüsenhormonrezeptors in hypophysären Tumorzellen der Linie GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> *in vitro* und bewirkt eine verringerte Stimulation der GH-Sekretion durch T<sub>3</sub> (KAJI & HINKLE, 1989). Calcitriol hat keinen Effekt auf die basale GH-Sekretion der GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> Zellen. Es ist jedoch in der Lage die durch T<sub>3</sub> und Retinsäure stimulierte GH-Sekretion durch Transaktivierung zu unterdrücken. Dieser Effekt ist dosisabhängig und wird durch das Schilddrüsenhormon-RE im GH-Gen vermittelt. In den nicht hypophysären COS-7 Zellen sind down-regulierende Effekte des Vitamin-D-Rezeptors auch ohne die Bindung des Liganden Calcitriol zu beobachten (GARCIA-VILLALBA et al., 1996).

Die Resistenz gegenüber Calcitriol auf Grund eines Rezeptordefekts hat HOCHBERG et al. (1985) zufolge keinen Einfluss auf die stimulierte Hormonsekretion endokriner Drüsen des Menschen. Der GH-Stimulationstest mit L-Dopa ergibt eine normale Ansprechbarkeit der Hypophyse im hypocalcämischen und normocalcämischen Zustand bei Kindern, die diesen Defekt aufweisen.

Calcitriol und IGF-I haben synergistische Effekte auf die Osteoblastenfunktion. Calcitriol stimuliert die Bildung der IGFBP-3  $\beta$ -Untereinheit in Osteosarkomzellen der Linie MG63. Es ist anzunehmen, dass durch die erhöhte lokale IGFBP-3 Synthese die IGF-I-Bindung erhöht und die IGF-I-Funktion forciert wird (MORIWAKE et al., 1992).

### 3.4. Calcitrioltransport und -synthese während der fetalen und perinatalen Entwicklung

Während der Trächtigkeit und der Laktation verändern sich die Anforderungen an den Mineralstoffwechsel. Der Organismus der weiblichen Ratte reagiert infolge der Anpassung mit einer erhöhten Konzentration an Calcitriol im Serum. Entgegen ursprünglicher Beobachtungen (KUMAR et al., 1979) ist mittlerweile gesichert, dass beim Menschen nur zur Zeit der Schwangerschaft maternal erhöhte Calcitriolwerte vorliegen und dass diese während der Laktation im Gegensatz zu denen der Ratte wieder auf Normalwerte sinken.  $1\alpha$ -Hydroxylaseaktivität kann in der Placenta der Ratte und in der Decidua des Menschen beobachtet werden (TANAKA et al., 1979; WEISMAN et al., 1979; REDDY et al., 1983; zur Übersicht: KOVACS & KRONENBERG, 1997).

Der Transfer von Calcitriol vom maternalen zum fetalen Kompartiment der Plazenta scheint in unterschiedlichen Tiermodellen nur begrenzt möglich zu sein (KOVACS & KRONENBERG, 1997). Ein Transport von Calcitriol über die Placenta ist für den Menschen anzunehmen (HOOGENBOEZEM et al., 1989). Der transplazentäre Calcitrioltransport beim Menschen wird durch die Applikation von pharmakologischen Calcitrioldosen, im Rahmen einer Behandlung gegen Hypoparathyreoidismus, bestätigt (SALLE et al., 1980). Auch beim Schwein, wie vermutlich auch beim Kaninchen, ist ein Calcitrioltransport vom Muttertier zum Fetus gegeben (CARE et al., 1982; DELVIN et al., 1988; LACHENMAIER-CURRLE & HARMEYER, 1989). Die Plazenta der Ratte ermöglicht im Gegensatz zum Transport von 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> nicht ohne weiteres den Übertritt von Calcitriol (HADDAD Jr. et al., 1971; NOFF & EDELSTEIN, 1978).

Die Synthese von Calcitriol durch den Fetus konnte bei mehreren Arten nachgewiesen werden. Bei der Ratte und dem Schaf resultiert die fetale Nephrektomie in einer reduzierten Calcitriolkonzentration beim Fetus (ROSS et al., 1980; CHALON & GAREL, 1985). Vergleichende Messungen an arteriellem und venösem Umbilikalblut bestätigen die fetale Synthese von Calcitriol beim Menschen (WIELAND et al., 1980). Bei der Maus kann die *in vitro* stimulierbare Expression der  $1\alpha$ -Hydroxylase-mRNA in der Organkultur mit metanephrogenem Gewebe ab dem 13,5. Tag der Entwicklung beobachtet werden. Sie erfolgt nach

dem Beginn der Genese der Nierentubulie (YAMAGATA et al., 2001). Neben der plazentären Calcitriolsynthese kann in der fetalen Rattenleber die Hydroxylierung von 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> zu 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> beobachtet werden. Postnatal geht diese Fähigkeit schnell verloren. Gleichzeitig steigt die Synthese von Calcitriol in der Niere stark an (TAKEUCHI et al., 1994).

Auf Grund von Untersuchungen am Menschen und anderen Arten ist davon auszugehen, dass Calcitriol nicht zwingend notwendig für die fetale und frühe postnatale Calciumhomöostase und Skelettentwicklung ist.

Feten von homozygoten Sauen einer Schweinelinie mit einer autosomal rezessiv vererbten Störung der renalen 1 $\alpha$ -Hydroxylierung (HARMEYER et al., 1982; WINKLER et al., 1986) weisen trotz niedriger Calcitriolwerte Calcium- und Phosphatkonzentrationen im Plasma auf, die für einen Nettotransport dieser Mineralien über die Plazenta sprechen. Demnach ist ein Vitamin-D-unabhängiger transplacentärer Transport von Calcium und Phosphat für das Schwein anzunehmen (LACHENMAIER-CURRLE & HARMEYER, 1989). In Bezug auf den Calciumtransport liegen für das Schaf (LIMA et al., 1993) wie auch für die Ratte entsprechende Daten vor. Bei der Ratte wird die Calciumaufnahme allerdings bereits weniger als drei Tage nach der Geburt durch Calcitriol kontrolliert (HALLORAN & DeLUCA, 1980). Die Konzentration an Calcium und Phosphat im Plasma des Schweins wird während der frühen postnatalen Entwicklung nicht durch unphysiologisch niedrige Calcitriolwerte beeinflusst. Im Alter von 2,5 - 5 Wochen entwickeln die Tiere eine Hypocalcämie. Erst zur Zeit des Absetzens der Ferkel, im Alter von 4 bis 6 Wochen, treten bei ihnen die klassischen Calcitriol-abhängigen Mechanismen der Calcium- und Phosphataufnahme auf (LACHENMAIER-CURRLE & HARMEYER, 1988; SCHROEDER et al., 1998 a,b). Die gezielte Ausschaltung des 1 $\alpha$ -Hydroxylase-Gens der Maus hat keine phänotypischen Effekte bei den Neugeborenen zur Folge. Im Alter von 3 Wochen, mit dem Absetzen, liegen allerdings bereits signifikant reduzierte Calcium- und Phosphatkonzentrationen im Serum vor. Gleichzeitig ist kein Calcitriol nachweisbar (DARDENNE et al., 2001).

Betrachtet man die Versorgung des Fetus durch transplacentalen Transport, so sind die unterschiedlichen Plazentatypen der Mammalia, insbesondere bezüglich

der maternalen-fetalen Barriere, zu berücksichtigen. Als Beispiel sind die Rodentia, Primates und andere zu nennen, bei denen eine Plazenta des hemichorialen Typs vorliegt. Bei Lemuren, Cetacea, Suidae und weiteren Gruppen findet man eine epithelichoriale Plazenta. (JAINUDEEN & HAFEZ, 1993; ZISWILER, 1976).

### **III. Zielsetzung**

Aus der Literaturübersicht geht hervor, dass die Informationen zur Regulation der GHR-mRNA unvollständig sind. Die Bedeutung des fetalen GH ist nicht abschließend geklärt. Gleichzeitig liegen keine Untersuchungen zur Rolle der GHR-Genexpression bei der Modulation des Vitamin-D-endokrinen Systems durch die somatotrophe Achse vor.

Im Vergleich zu anderen Spezies existieren für das Schwein keine Daten zur GHR-Genexpression in den unterschiedlichen Organen während der Embryonalentwicklung bzw. der frühen Fetalentwicklung.

In vorangegangenen Studien war auf Grund eines sehr niedrigen Niveaus der GHR-Genexpression in unterschiedlichen fetalen Altersgruppen bisher keine Quantifizierung möglich. Notwendig war aus diesem Grund die Entwicklung eines hinreichend sensitiven Nachweissystems für die porcine GHR-mRNA.

Untersuchungen wurden an porcinen Feten und postnatalen Schweinen unterschiedlicher Altersgruppen durchgeführt.

In verschiedenen Versuchsansätzen wurde der Ontogenese der GHR-Genexpression in Leber und Niere nachgegangen. Von besonderem Interesse waren hierbei Fragestellungen zur

- pränatalen Ontogenese der GHR-mRNA-Konzentration
- postnatalen Ontogenese der GHR-Genexpression
- Auswirkung eines renalen  $1\alpha$ -Hydroxylasedefekts auf die GH-Sekretion und die GHR-Genexpression während der pränatalen und postnatalen Entwicklung

## IV. Material und Methoden

### 1. Molekularbiologische Methoden

Für die Bestimmung der Konzentration der porcinen GHR-mRNA beim Fetus wurden mehrere Protokolle entwickelt und auf ihre Verwendbarkeit getestet (Abb. 3). Protokolle, Puffer und Lösungen sowie Geräte, die im Text nicht genauer definiert sind, werden im Anhang aufgeführt.

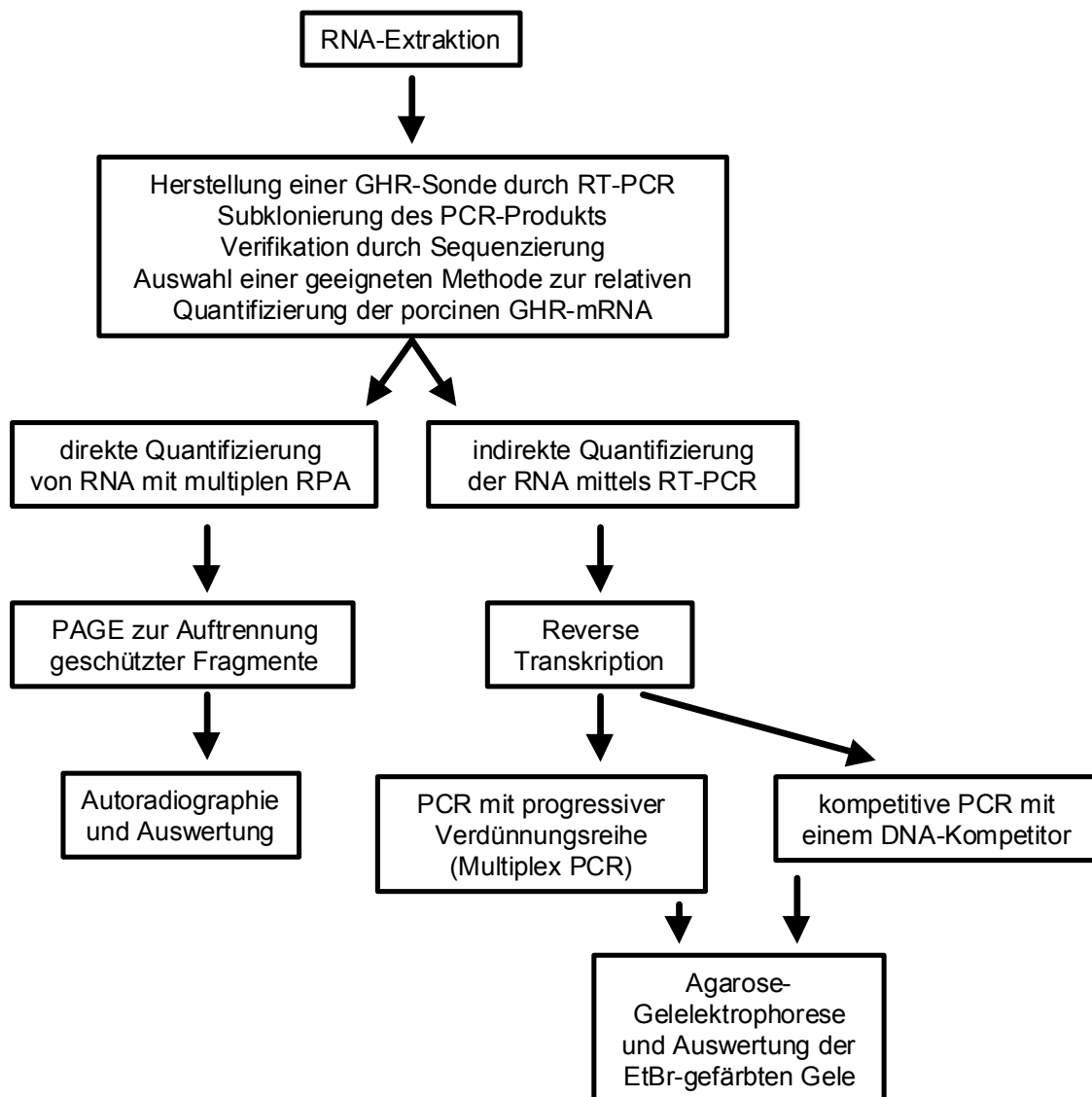


Abb. 3: Versuchsansätze zur Bestimmung der porcinen GHR-mRNA; EtBr = Ethidium Bromid; PAGE = Polyacrylamidgelelektrophorese; PCR = Polymerase-Kettenreaktion; RPA = Ribonuclease Protection Assay (weitere Erläuterungen im Text)

## 1.1. Aufarbeitung von Gesamt-RNA

### 1.1.1. RNA-Extraktion

Die Extraktion von Gesamt-RNA erfolgte mit geringfügigen Modifikationen nach der Methode von CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987), die eine Abwandlung des Protokolls nach CHIRGWIN et al. (1979) darstellt. Für die RNA-Extraktion wurden in Abhängigkeit von dem Probenmaterial ca. 500 mg Gewebe unter flüssigem Stickstoff zerkleinert und zum Auftauen in ein adäquates Volumen einer Denaturierungslösung (10 ml / g Gewebe) mit dem chaotrophen Salz Guanidinthiocyanat als Hauptkomponente überführt. Die Verwendung von Guanidinsalzen bietet einen hochwirksamen Schutz gegen RNase-Aktivität. Die Protein-denaturierung wird durch das reduzierende Agens  $\beta$ -Mercaptoethanol, welches das Aufbrechen der intramolekularen Disulfidbrücken unterstützt, vervollständigt. Der weitere Gewebeaufschluß erfolgte in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator. Um eine weitere Lyse der Zellen abzuwarten standen die Homogenate 10 min auf Eis. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden sie kurzzeitig bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Im Anschluss an die saure Phenol-Chloroformextraktion (Fließschema im Anhang) erfolgten die Aufnahme der RNA in DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  und die Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 1.1.2. Qualitätskontrolle und Konzentrationseinstellung der RNA

#### 1.1.2.1 Bestimmung der RNA Konzentration

Die Konzentration und Reinheit der extrahierten- und gelösten Gesamt-RNA wurde photometrisch in einer Verdünnung von 1:100 gegen DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  bei 260 nm ermittelt ( $1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g} / \text{ml}$ ). Aus dem Quotienten der Messung bei 260 / 280 nm konnten Rückschlüsse auf die Proteinverunreinigung der Nukleinsäure gezogen werden (GLASEL, 1995; WARBURG & CHRISTIAN, 1941). Der pH-Wert und die Ionenkonzentration der vorliegenden Lösung haben einen bedeutenden Einfluss auf das Ergebnis der Messung (WILFINGER et al., 1997). Dabei erhöht DEPC die Absorption bei 280 nm (OKAMOTO & OKABE, 2000). Bei 240 nm wurde in Abständen durch den Quotienten aus 260 nm / 240 nm, der größer als 1 sein sollte, die Kontamination der Proben mit Phenol kontrolliert.

Ein Aliquot der RNA-Lösung wurde in Vorbereitung auf die reverse Transkription über eine Zwischenverdünnung auf eine Endkonzentration von  $0,3 \mu\text{g} / \mu\text{l}$  eingestellt.

#### 1.1.2.2 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der RNA-Integrität wurde die RNA im denaturierenden Formaldehyd-MOPS Puffersystem (SAMBROOK et al., 1989) untersucht.

Für die RNA-Gelelektrophorese wurden  $5 \mu\text{g} - 10 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA verwendet. Die Proben wurden mit einem 5X RNA-Ladepuffer (Quiagen, RNeasy Mini Handbook 1997, modifiziert) für 10 min bei  $65^\circ\text{C}$  denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Für die Herstellung des 1,2 % Formaldehyd-MOPS Gels wurden nach dem Aufkochen und Abkühlen der Agarose auf unter  $70^\circ\text{C}$  zuerst der 10X MOPS Puffer und dann das 12,3 M Formaldehyd hinzugefügt. Das bei  $60^\circ\text{C}$  gegossene Gel wurde nach dem Erstarren der Agarose mit 1X MOPS Laufpuffer überschichtet. Die Proben wurden mit einer Spannung von  $3,5 \text{ V} / \text{cm}$  für 2 h 15 min aufgetrennt. Unter UV-Licht erfolgte die Bewertung der aufgetrennten Gesamt-RNA. Die Intensität des Fluoreszenzlichts steht in Relation zur Größe und zur Masse der dargestellten Nukleinsäure (BONINI & HOFMANN, 1991).

## 1.2. Reverse Transkription

Die reverse Transkription dient der Synthese eines komplementären DNA-Stranges ausgehend von einer RNA- oder Einzelstrang DNA-Matrize (GERARD & GRANDGENETT, 1975; VERMA, 1975). Ursprünglich wurden die RNA-abhängigen reversen Transkriptasen aus Retroviren isoliert. Es existieren auch gentechnisch veränderte Varianten, wie die SuperScript™ II RNase H<sup>-</sup> MMLV reverse Transkriptase (Life Technologies), ohne die für diese Gruppe von Enzymen typische RNase H-Aktivität (KOTEWICZ et al., 1988) bei einer großen Effizienz der cDNA-Synthese. Eine intrinsische RNase-Aktivität reduziert insbesondere bei der cDNA-Synthese von langen mRNA's als Vorlage die Ausbeute (NATHAN et al., 1995). Ein Nachteil der intakten mRNA in der nachfolgenden PCR liegt bei einer möglichen Competition mit der cDNA als Matrize (HU et al., 1991). Die komplette Degradierung der RNA mit RNase H im Anschluss an die reverse Transkription wird allerdings nur bei cDNA-Zielen von über 1 Kilobasen (Kb) empfohlen. Die reverse Transkriptase ist in ihrer Funktion abhängig von



einem Startermolekül (Primer). Es existieren drei Mechanismen für das priming von mRNA:

1. Priming mit einem 3' (Reverse) genspezifischen Primer, der nach der reversen Transkription die cDNA Matrize für den 5' (Forward) Primer bereitstellt (CHELLY et al., 1988)
2. Oligo (dT) Priming zur reversen Transkription von Poly(A)<sup>+</sup> RNA (BALLAGI-PORDÁNI et al., 1991). Diese Methode eignet sich nicht zur PCR-Amplifikation von Zielsequenzen die mehrere Kb stromaufwärts lokalisiert sind, da große mRNA's nicht immer vollständig umgeschrieben werden (McLEOD, 1981)
3. Random Priming, meist mit randomisierten Hexanukleotidsequenzen, zur unspezifischen Umschreibung von Gesamt-RNA in cDNA (VERES et al., 1987). Diese Methode ist insbesondere für sehr große RNA's oder auch für RNA's ,deren Umschreibung in cDNA durch Haarnadelstrukturen behindert wird, geeignet

Die Effizienz der Umschreibung von RNA in cDNA wird durch vielerlei Faktoren wie Salz- und Phenolverunreinigung der Probe beeinflusst. Die umgekehrte Transkription stellt somit eine Quelle hoher Variabilität (FREEMAN et al., 1999) im Hinblick auf eine spätere Quantifizierung der RNA dar. Die Effizienz der reversen Transkription, die durch Präinkubation der RNA mit den Primern gesteigert werden kann (RAPPOLEE, 1990), lässt sich wie folgt formulieren:

$$[cDNA] = [RNA] \times \text{Effizienz}$$

Das Protokoll der reversen Transkription wurde für die Umschreibung von 1,8 µg Gesamt-RNA in cDNA mit Random-Hexamer-Primern optimiert. Parameter der Optimierung waren die Masse an RNA, die Nukleotidkonzentration und die Konzentration an reverser Transkriptase. Die reverse Transkription wurde mit dem Enzym SuperScript™ II RNase H<sup>-</sup> (Life Technologies) mit einem Reaktionsvolumen von 20 µl in dem zugehörigen Puffersystem entsprechend Tabelle 2 auf Eis angesetzt.

Tabelle 2: Hauptkomponenten im Ansatz der reversen Transkription

Komponente	Endkonzentration
Random-Hexamer-Primer	2,5 $\mu$ M
dNTP's	500 $\mu$ M
DTT	10 mM
Tris-HCl pH 8,3	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
KCl	75 mM
Ribonuklease Inhibitor	10 U
Reverse Transkriptase	100 U

Zum Aufbrechen von Sekundärstrukturen in den RNA-Molekülen wurde die Gesamt-RNA vor der reversen Transkription 5 min auf 65°C erhitzt. Es folgte die sofortige Kühlung auf 4°C zum Erhalt des linearisierten Zustands. Nach dem Annealing der Random-Hexamer-Primer (Perkin Elmer) bei 27°C für 10 min startete die reverse Transkription. Die Reaktion lief 1 h bei 42°C und wurde durch das 1-minütige Erhitzen auf 99°C gestoppt. Der Hitzeschritt führt zum Ablösen der reversen Transkriptase von der cDNA, zur Inaktivierung der beteiligten Enzyme sowie zur Trennung der RNA-DNA Hybride bei einer partiellen Degradierung der RNA. Eine Kühlung auf 4°C schloss sich an.

### 1.3. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (SAIKI et al., 1985) nach der von MULLIS und FALCOONA (1987; Nobelpreis für Chemie an Mullis 1993) veröffentlichten Methode beruht auf der *in vitro* Amplifikation ausgewählter Nukleotidsequenzen mit DNA-Polymerasen. Diese wurden ursprünglich aus thermophilen Bakterien isoliert und sind auch bei höheren Temperaturen längere Zeit stabil. Das Prinzip der PCR begründet sich auf der zyklischen Wiederholung von drei Reaktionsschritten, die den Nachweis einzelner DNA-Moleküle in einer Probe zulassen (ALBERTS et al., 1994):

1. der Auftrennung von DNA-Doppelsträngen (Denaturierung)
2. der Anlagerung von Primern an komplementäre Sequenzen, da die DNA-Polymerase wie auch die reverse Transkriptase nicht *de novo* arbeitet (Primerannealing)

3. der Polymerisation, in dessen Verlauf bei optimaler Reaktionstemperatur für die DNA-Polymerase (72 - 74°C) komplementäre Nukleotide ausgehend vom 3' Ende der Primer an die einzelsträngige DNA-Matrize angelagert werden (Extension)

Die Anzahl der zum Nachweis spezifischer DNA-Fragmente notwendigen Zyklen hängt in erster Linie von der Kopienzahl der Ziel-DNA in der Probe ab (INNIS & GELFAND, 1990). Die neu synthetisierte DNA dient während der folgenden Zyklen selbst als Matrize. Die exponentielle Phase der Kettenreaktion entspricht nach CHELLY et al. (1988) folgendem Modell:

$$N = N_0 (1+E)^n$$

$N$  = Anzahl der amplifizierten Moleküle  
 $N_0$  = Anzahl der initialen Moleküle  
 $n$  = Anzahl der Zyklen  
 $E$  = Effizienz der Amplifikation

### 1.3.1. Auswahl der PCR-Primer

Bei der Wahl der genspezifischen Primer ist zu bedenken, dass sie einen entscheidenden Einfluss auf die Sensitivität der PCR ausüben (HE et al., 1994). Die genspezifischen Primer werden im Allgemeinen nach verschiedenen Kriterien konzipiert und mit einer Endkonzentration von 0,1 µM bis 0,5 µM verwendet (INNIS & GELFAND, 1990).

Die Auswahl der Primer erfolgte mit dem Programm OLIGO 4.0 (National Biosciences Inc.).

Primer für folgende Gensequenzen wurden entwickelt:

- a.) Bakteriophage Lambda  
 Schwanzgen  
 Fragmentgröße 92 Bp; Bezeichnung: LAMTAIL  
 NIH-Genbank Zugriffsnr.: S66722  
 Lokalisation auf dem Genom: Position 10059 - 10150
- b.) *Sus scrofa domestica*, Göttinger Miniaturschwein  
 Fragment der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase mRNA  
 Fragmentgröße: 224 Bp; Bezeichnung: pGAPDH

NIH-Genbank Zugriffsnr.: U48832; partielle cDNA-Sequenz

Lokalisation auf der cDNA: Position 8 - 232

c.) *Sus scrofa domestica*, Deutsche Landrasse

Fragment der Wachstumshormonrezeptor-mRNA

Fragmentgröße: 322 Bp; Bezeichnung: pGHR

NIH-Genbank Zugriffsnr.: X54429, cDNA-Sequenz

Lokalisation auf der cDNA: Position 779 - 1100

Tabelle 3: Sequenzen der entwickelten Primer

Fragment	Ausrichtung	Sequenz
LAMTAIL	Forward	5' AATGCCCTGAACAGACAGAG 3'
LAMTAIL	Reverse	5' CAGTTTCAGGGCAAACACTCAG 3'
pGAPDH	Forward	5' CACCAGGGCTGCTTTTAACTC3'
pGAPDH	Reverse	5' TAGCACCAGCATCGCCCCATT3'
pGHR	Forward	5' TGAGCCCATTTGCATGTGAAGA 3'
pGHR	Reverse	5' TCTGAGCCTTCAGTCTTTTCATC 3'

Die Primer wurden von der Fa. Life Technologies bezogen. Eine Ausnahme bildeten die für die Amplifikation eines 488 Bp langen Fragments der ribosomalen 18 S RNA (18 S rRNA) notwendigen konservativen Primer der Fa. Ambion, deren Sequenz im Kit-Protokoll nicht vermerkt ist.

Die Primer wurden so gewählt, dass die resultierenden Fragmente auf Grund ihrer Größe sowohl in der Multiplex-PCR als auch im multiplen Ribonuclease Protection Assay (RPA) in Kombination angewendet werden können.

Das Primerpaar für das Schwanzgen des Bakteriophagen Lambda (LAMTAIL) wurde als mögliche externe Kontrolle für die Anwendung im RPA entwickelt.

Die porcinen Primer sind Exon / Intron umspannend konzipiert, damit eine eindeutige Unterscheidung von amplifizierter cDNA und möglicherweise kontaminierender DNA nach der Auftrennung der PCR-Produkte gewährleistet werden kann (GILLILAND et al., 1990). Eine Untersuchung der Primer und der resultierenden Fragmente auf mögliche Übereinstimmungen zu anderen bekannten Sequenzen erfolgte mit dem Programm BLAST (ALTSCHUL et al., 1990).

### 1.3.2. Durchführung der PCR

Die PCR-Ansätze wurden auf Eis pipettiert und anschließend in den auf 72°C vorgeheizten PCR-Block verbracht.

Es wurden 100 ng Lambda-DNA in einem Volumen von 1 µl und im übrigen 3 µl Ansatzvolumen der reversen Transkription für die Amplifikation mit den Zyklusparametern entsprechend Tabelle 4 verwendet.

Tabelle 4: Zyklusbedingungen PCR

Fragment	LAMTAIL	pGAPDH	pGHR	18 S rRNA
Zyklus				
	72°C	72°C	72°C	72°C
Denaturierung	95°C 30 sec	95°C 60 sec	95°C 60 sec	95°C 60 sec
Primer-Annealing	58°C 30 sec	61°C 10 sec	61°C 10 sec	61°C 10 sec
Extension	72°C 30 sec	72°C 20 sec	72°C 20 sec	72°C 20 sec
Zykluszahl	35	24	24-33	16
finale Extension	72°C 5 min	72°C 5 min	72°C 5 min	72°C 5 min
Kühlung	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞

Die PCR wurde mit einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Die mit der cDNA in die PCR überführten Salze und Nukleotide wurden nicht berücksichtigt. Die Einzelkomponenten des PCR-Ansatzes mit den entsprechenden Konzentrationen sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Hauptkomponenten im PCR Ansatz

Fragment	LAMTAIL	pGAPDH	pGHR	18 S rRNA
Komponente				
Tris-HCl	20 mM	31 mM	25 mM	25 mM
MgCl <sub>2</sub>	-	2,94 mM	2,04 mM	2,04 mM
MgSO <sub>4</sub>	2 mM	-	-	-
KCl	10 mM	88,5 mM	58,5 mM	58,5 mM
Triton X - 100	0,1% (v/v)	0,1% (v/v)	0,1% (v/v)	0,1% (v/v)
dNTP MIX jeweils	200 µM	100 µM	100 µM	100 µM
Primer jeweils	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM	0,4 µM
DNA-Polymerase	2,5 U	2 U	2 U	2 U

Die Optimierungsparameter der PCR waren unterschiedliche Konzentrationen an Primern, Nukleotiden,  $Mg^{2+}$ , KCl, Enzym sowie der pH-Wert im PCR Ansatz (INNIS & GELFAND, 1990; HENEGARIU et al., 1994, 1997). Getestet wurden ebenso unterschiedliche Temperaturen und Zeiten für das Annealing der Primer. Die Amplifikation von LAMTAIL (siehe Kap. 1.3.1) wurde mit der Pfu DNA-Polymerase (Stratagene) und dem zugehörigen Reaktionspuffer durchgeführt. Die Synthese der übrigen PCR-Produkte erfolgte mit der DyNAzyme™ DNA-Polymerase (Finnzymes Oy, Vertrieb Biometra). Das zugehörige Puffersystem wurde mit dem Puffer der reversen Transkription kombiniert. Ziel war es bei den zuletzt erwähnten Fragmenten über die Wahl der Parameter auch eine multiple Amplifikation zu ermöglichen. Der Schritt der finalen Extension diente dem Auffüllen nicht komplett amplifizierter DNA-Fragmente.

#### 1.3.2.1 PCR-Kontrollen

Eine Kontamination der verwendeten Einzelkomponenten mit spezifischen DNA-Fragmenten ist denkbar. Als Negativkontrolle wurde daher in einem Kontrollansatz der reversen Transkription immer Wasser anstelle von RNA verwendet.

#### 1.3.2.2 DNA-Gelelektrophorese

Aliquots der PCR-Ansätze (18  $\mu$ l) wurden mit einer Spannung von 4,1 V / cm in einem 2% tigen Agarosegel mit 0,3  $\mu$ g / ml EtBr in 1X TAE-Puffer für 1 h 35 min aufgetrennt. Es wurde ein Ladepuffer mit Orange G als Frontmarker (Orange Mix) verwendet. Beim Gebrauch dieses Ladepuffers kommt es im Vergleich zu einem Ladepuffer mit Bromphenolblau als Frontmarker nicht zu einer sichtbaren Beeinträchtigung des Fluoreszenzsignals der aufgetrennten PCR-Produkte unter UV-Licht. Die Signale wurden mit einer CCD Kamera (Kappa CF 8/1 FMC) aufgezeichnet und mit dem Programm Movie Machine II (Fast Multimedia) gespeichert.

#### 1.3.3. Verifikation der PCR-Produkte

Die Größe der PCR-Produkte wurde nach der Gelelektrophorese mit Hilfe des Molekulargewichts (MW) - Markers  $\Phi$  X 174 DNA / BsuRI (Hae III) (MBI Fermentas) bei einer Auftragsmenge von 200 ng / Spur visuell ermittelt. Eine genaue Größenbestimmung erfolgte nach der Datensicherung mit einer Software zur Gelauswertung (Image Master 1D Elite, ver. 3, Amersham-Pharmacia Biotech).

### 1.3.3.1 Vorbereitung der PCR-Produkte für die Subklonierung

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) entsprechend dem Kit-Protokoll aufgereinigt. Zur Elution der DNA von der Silica-Gel Membran wurde die Säule mit 50 µl Tris-HCl, pH 8 beschickt und in Abweichung zum Originalprotokoll für 2 min bei 50°C inkubiert. Anschließend folgte zur Gewinnung der eluierten DNA eine 1 minütige Zentrifugation bei 10000 g.

Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde mit Hilfe des MW-Markers  $\Phi$  X 174 DNA / BsuRI (Hae III) und der low DNA-Massenleiter der Fa. Life Technologies nach der DNA-Gelelektrophorese visuell bestimmt.

### 1.3.3.2 Subklonierung und Identifikation positiver Klone

Die Subklonierung der PCR-Produkte in Epicurian Coli XL 1-Blue Mrf<sup>r</sup> Kan folgte dem Protokoll des verwendeten pCR Script™ Amp SK(+) Cloning Kit (Stratagene). Für die Insertion eines DNA-Fragmentes in die Srf I Schnittstelle im Polylinker des Vektors sind glatte DNA-Enden notwendig. PCR-Produkte, erstellt mit der Dynazyme DNA-Polymerase, wurden mit der im Kit enthaltenen Pfu DNA-Polymerase geglättet. Auf Grund der 3'-5' Exonukleaseaktivität dieser Polymerase werden die von anderen Polymerasen in der Regel erzeugten Überhänge beseitigt. Die Ligationsansätze wurden mit unterschiedlichen Vektor / Insert-Verhältnissen vorbereitet und wie folgt berechnet:

$$\text{pmol Enden} / \mu\text{g DNA} = \frac{2 \times 10^6}{\text{Anzahl Basenpaare} \times 660}$$

Nach der Ligation wurde der Vektor entsprechend dem Kit-Protokoll in Epicurian Coli transformiert, auf LB Amp IPTG / X-Gal Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zwei Kriterien wurden für die Identifikation positiver Klone herangezogen:

1. Die auf dem Vektor codierte Ampicillinresistenz ( $\beta$ -Lactamase) ermöglicht das Wachstum von transformierten Bakterien auf Ampicillin-haltigen Nährböden.
2. Der Nachweis der erfolgreichen Insertion von DNA in den Vektor durch die Zerstörung des LacZ' Gens, welches das  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galactosidase codiert und den Polylinker des Vektors beinhaltet, mittels blau - weiß Farbreaktion.

Die Deletion  $\Delta$  M15 im LacZ Gen des Bakteriengenoms kann nach erfolgreicher Insertion in das Plasmid nicht mehr ausgeglichen werden (keine  $\alpha$ -Komplementation). Da vom X-Gal, einem Substrat der  $\beta$ -Galactosidase, kein Indoxyl abgespalten und zum unlöslichen Indigo aufoxidiert werden kann, sind vermeintlich positive Klone weiß.

Zwei Methoden wurden zur Auswahl von selektierten weißen Kolonien für die Sequenzierung genutzt:

1. Restriktion mit Endonukleasen:

Aus Verdünnungsausstrichen wurden Klone isoliert und zum Beimpfen von 4 ml LB Amp Medium verwendet. Nach der Inkubation bei 37°C im Schüttelinkubator (180 rpm) über Nacht erfolgte die Isolation der Plasmide (Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit, BioRad; QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) nach Angaben der Hersteller. 1  $\mu$ g - 5  $\mu$ g der isolierten Plasmide wurden nach photometrischer Quantifizierung (1 OD<sub>260</sub> = 50  $\mu$ g / ml DNA) für 1 h bei 37°C mit adäquaten Restriktionsendonukleasen inkubiert. Das Volumen des Restriktionsansatzes betrug 20  $\mu$ l. Zum Nachweis der gesuchten Inserts wurden im Fall des GHR-Fragments EcoR I, des GAPDH-Fragments HIND III und des Fragments LAMTAIL Bsp120 I nach den Angaben des Herstellers zur Restriktion verwendet. Die benutzten Enzyme schneiden jeweils einmal im Vektor und im Insert. Der Enzymaktivierung bei 65°C für 10 min schlossen sich die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Restriktion unter UV-Licht an.

2. Kolonie-Screening mittels PCR:

Angewandt wurde ebenfalls das Kolonie-Screening mittels PCR, welches eine alternative und schnellere Möglichkeit zum Nachweis positiver Transformanten darstellt. Hierfür wurde Zellmaterial aus einer ausgewählten Kolonie aufgenommen und zum Beimpfen einer neuen LB Amp Agarplatte an bezeichneter Position verwendet. Anschließend wurde erneut ein wenig Zellmaterial aus der ursprünglichen Kolonie aufgenommen und in 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O eingerührt. Die Zellsuspension wurde nun für 5 min aufgekocht. 5  $\mu$ l dieser frisch angesetzten Lösung wurden nun mit vektor- oder insertspezifischen Primern in der PCR eingesetzt. Eine Variante dieser Methode stellt auch das direkte Einrühren von Zellmaterial der ausgewählten Kolonie in den PCR-Ansatz dar.



Die Klone mit den erwarteten Bandenmustern wurden aus einer Reinkultur in die Dauerkultur überführt. Plasmide dieser Klone wurden von der Fa. TopLab (Martinsried) im Auftrag, oder am hiesigen Institut (LI-COR, Modell 4000L DNA-Sequencer, MWG Biotech) sequenziert.

#### **1.4. Methoden zur Quantifizierung von RNA**

Unterschiedliche Methoden stehen zur Quantifizierung spezifischer RNA's zur Verfügung. Zu unterscheiden sind direkte und indirekte Methoden. Die Methoden der Quantifizierung beinhalten zum Teil die Normierung der gemessenen Genexpression um den Betrag eines konstant exprimierten Gens als Ladekontrolle bzw. zur Kontrolle der Effizienzen enzymatischer Reaktionen. In Frage kommt hierfür die RNA eines sogenannten „Haushaltsgens“. Es wird davon ausgegangen, dass dieses unter einer Vielzahl physiologischer Bedingungen eine gleichartige Genexpression aufweist (THELLIN et al., 1999). Für die durchgeführten Untersuchungen zur porcinen Ontogenese der GHR-Genexpression in Leber und Niere wurden die GAPDH-mRNA und die 18 S rRNA auf ihre Verwendbarkeit als Ladekontrolle bzw. zur Überprüfung der cDNA-Syntheseeffizienz getestet.

##### **1.4.1. Ribonuclease Protection Assay (RPA)**

Der RPA stellt eine Möglichkeit zur direkten Quantifizierung einer spezifischen RNA dar. Er beruht auf der Hybridisierung der Ziel-RNA an eine antisense RNA-Sonde, die durch *in vitro* Transkription hergestellt wird. Unspezifische RNA, nicht komplementäre Anteile der spezifischen RNA sowie überschüssige Sonde werden nach der Hybridisierung mit RNasen, die in den einzelsträngigen Bereichen der RNA schneiden, degradiert. Die doppelsträngigen- und somit geschützten Bereiche der Ziel-RNA werden anschließend von den fragmentierten Einzelsträngen mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) separiert. Der Nachweis multipler RNA's ist im RPA möglich und lässt die Verwendung einer Kontrollsonde im gleichen Assay zu.

Um Verluste bei der Präzipitation der RNA im Assay zu berücksichtigen und als Ladekontrolle der Gesamt-RNA wurde die GAPDH-mRNA zur Kontrolle des GHR-Signals gewählt (KOBAYASHI et al., 1999).

### 1.4.1.1 *In vitro* Transkription zur Herstellung radioaktiv markierter cRNA Sonden

Bei der *in vitro* Transkription von RNA wird unter Verwendung von DNA abhängigen RNA-Polymerasen die Matrizen-DNA in cRNA umgeschrieben. Die RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T3 und T7 (McALISTER et al., 1973; CHAMBERLIN & RING, 1973) besitzen spezifische Promotorregionen, die den Polylinker des verwendeten Plasmids beidseitig flankieren. Auf Grund der verifizierten Einbaurichtung des Inserts in den Polylinker kann festgelegt werden, mit welcher Polymerase antisense-RNA synthetisiert wird. Um das Ende der zu transkribierenden cRNA zu definieren wird das Plasmid linearisiert (run-off Transkription). Die Linearisierung der verwendeten Plasmide wurde mit den Restriktionsendonukleasen entsprechend Tabelle 6 durchgeführt.

Tabelle 6: Restriktionsenzyme für die Plasmidlinearisierung

Strangsynthese:	sense	antisense
Plasmid:	Restriktionsenzym u. RNA-Polymerase	
pGHR K20/2 (3283 Bp):		
Linearisierung	Hind III	Not I
verwendete Polymerase	T3	T7
pGAPDH K6 (3185 Bp):		
Linearisierung	Bsp120 I	Not I
verwendete Polymerase	T3	T7

Die Restriktion erfolgte mit den entsprechenden Puffern und Enzymkonzentrationen über 2 h bei 37°C. Nach der Enzyminaktivierung durch 20 minütiges Erhitzen bei 65°C wurde die geschnittene DNA im Agarosegel aufgetrennt. Das interessierende DNA-Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem GeneClean II Kit (Dianova, Hamburg) aus dem Gel extrahiert. Es folgten die Elution in H<sub>2</sub>O und die photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA.

Die *in vitro* Transkription fand mit dem MAXIscript™ Kit (Ambion) unter Verwendung von 1 µg DNA und 10 U RNA-Polymerase statt. Die Funktionalität der verwendeten Matrize wurde mit unmarkiertem Nukleotid in der *in vitro* Transkription geprüft, mittels PAGE aufgetrennt und mit Silber gefärbt (DNA silver staining Kit, Amersham-Pharmacia Biotech). Im Fall der radioaktiven Markierung der cRNA

wurde dem Transkriptionsansatz [ $\alpha$ - $^{32}$ P] UTP mit einer spezifischen Aktivität von 800 Ci/mmol zugegeben. Durch die Zugabe von unmarkiertem UTP konnte die spezifische Aktivität der Sonden, unter Einhaltung der notwendigen Molarität an dem limitierenden Nukleotid UTP im Ansatz, variiert werden. Die Inkubation der Ansätze erfolgte für 60 min bei 37°C. Im Anschluss an die Inaktivierung der Polymerase bei 95°C für 2 min wurde die DNA-Matrize mit DNase I entsprechend dem Kit-Protokoll abgebaut. Bei der Entfernung der nicht inkorporierten Nukleotide wurden drei Verfahren getestet:

- Ammoniumacetat / Ethanol fällung der cRNA entsprechend dem Kit-Protokoll
- RNA Extraktion (RNeasy Mini Kit, Qiagen)
- Auftrennung der Fragmente mittels PAGE (Kap. 1.4.1.3), Autoradiographie zur Identifikation des spezifischen Fragments voller Länge, Überführung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, Elution über Nacht in 350  $\mu$ l 0,5 M Ammoniumacetat, 1 mM EDTA, 0,2% SDS

Nach der Aufreinigung wurde die spezifische Aktivität der Sonde nach Szintillationszählung im  $\beta$ -Counter ermittelt und bei -20°C gelagert.

#### 1.4.1.2 Durchführung des Ribonuclease Protection Assay

Der RPA erfolgte unter Verwendung des RPA II Kit (Ambion, Austin, USA). In Vorbereitung auf die Hybridisierung wurden 10  $\mu$ g - 20  $\mu$ g Gesamt-RNA gemeinsam mit 1 - 5 x 10<sup>5</sup> cpm radioaktiv markierter cRNA-Sonde nach Zugabe von Ammoniumacetat (Endkonzentration 0,5 M) und dem 2,5 fachen Volumen Ethanol ausgefällt. Im Anschluss an eine 30 minütige Inkubation bei -20°C folgte eine 15 minütige Zentrifugation mit 16000 g bei 4°C. Nach der Abnahme des Überstandes wurde das Pellet bei RT getrocknet und anschließend in 20  $\mu$ l Hybridisierungspuffer gelöst. Die Probe wurde für 4 min bei 90°C denaturiert und bei 42°C für 18h inkubiert.

Anschließend folgte der Verdau mit einem im Kit enthaltenen RNase Mix, bestehend aus den RNasen T1 (250 U / ml) und A (10.000 U / ml) im zugehörigen Reaktionspuffer. Eine optimale Verdünnung der RNasen wurden in einem Bereich von 1:50 bis 1:200 ermittelt. Der Puffer wurde nach Angabe des Herstellers mit Glyco Blue versetzt, wodurch das Pellet größer und somit besser

sichtbar ist. Der Verdau erfolgte bei 37°C über 20 min. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Inaktivierungspuffer gestoppt. Die nun folgende Fällung mit 100% Ethanol wurde durch die Zugabe von 5 µg Hefe-RNA forciert. Die Proben wurden wie oben beschrieben in der Kälte inkubiert und zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands und der Trocknung des Pellets wurde dieses in 10 µl H<sub>2</sub>O und 10 µl denaturierenden Ladepuffer aufgenommen, für 4 min bei 95°C inkubiert und sofort auf Eis gestellt.

#### 1.4.1.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die PAGE zur Auftrennung der Fragmente wurde in Anlehnung an PLATH et al. (1996) mit einer horizontalen Gelelektrophoresekammer (Multiphor® II, Amersham-Pharmacia Biotech) durchgeführt. Die 0,5 mm dicken diskontinuierlichen Gele bestanden aus einem Sammelgel (T = 5%, C = 3%) und einem Trenngel (T = 8%, C = 2%). Sie wurden vorab auf Gelbond® PAGE Film (Amersham-Pharmacia Biotech) gegossen, für jeweils 20 min zweimal in H<sub>2</sub>O, einmal in 2% Glycerin sowie einmal in 10% Glycerin auf dem Schüttler gewaschen und anschließend bei 40°C getrocknet. Die bei 4°C aufbewahrten Gele wurden bei Bedarf für eine Stunde in denaturierendem Puffer rehydriert. Zur Aufnahme der Elektrodenpuffer wurde 6 cm breites Blottingpapier (Schleicher & Schuell GB0003, doppelt eingesetzt) verwendet. Die Zusammensetzungen der Puffer sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Rehydratations- und Elektrodenpuffer für die PAGE

Rehydratation	Kathode	Anode
0,3 M Tris-HCl	1,2 M Tricin	0,9 M Tris-HCl
8 M Harnstoff	0,12 M Tris-HCl	0,15% SDS (w/v)
0,1% SDS (w/v)	0,15% SDS (w/v)	Eisessig ad pH 8,4

Die Proben und ein RNA-MW Marker (Ambion) wurden durch 5 X 1 cm große „sample application pieces“ (Serva, Heidelberg) mit einer Kapazität von 20 µl auf das Gel aufgebracht. Sobald sich die Proben komplett im Sammelgel befanden, wurde die Temperatur des Umlaufwasserbads von 25°C auf 40°C hochgeregelt. Das Gel und das Elektrodenpufferpapier wurden zum Schutz vor Verdunstung mit Folie abgedeckt. Der Gellauf erfolgte für 1 h 50 min bei 150 V. Im Anschluss verblieb das Gel bei 40°C für 1 h 45 min zur Trocknung auf dem Geltisch. Der

Bereich mit dem RNA-MW Marker wurde von dem Gel abgetrennt und das übrige Gel in Folie eingeschweißt. Der Nachweis der geschützten Fragmente erfolgte durch Autoradiographie mit Verstärkerfolie. Der RNA-MW Marker wurde einer Silberfärbung entsprechend Kap. 1.4.1.1 unterworfen und bei der Auswertung zur Größenidentifikation der geschützten Fragmente herangezogen.

#### 1.4.2. Relativ quantifizierende PCR mit einer progressiven RNA-Verdünnungsreihe als Multiplex-PCR

NICOLETTI & SASSY-PRIGENT (1996) stellten eine Methode für die relative Quantifizierung von PCR-Produkten in der exponentiellen Phase der PCR vor. Der Vorteil dieses Protokolls ist, dass der Aufbau eines exogen zugeführten internen Standards und dessen Validierung, im Vergleich zur kompetitiven PCR entfällt. Basis der Methode ist die Verwendung einer Reihe progressiver RNA-Verdünnungen, die durch das Mischen von zwei zu bestimmenden RNA-Lösungen, mit einem unbekanntem Verhältnis der Ziel-RNA zueinander, gewonnen werden.

Das Verfahren lässt sich wie folgt darstellen:

Besitzt eine Mischung beider Lösungen ( $V_A + V_B$ ) das finale konstante Volumen  $V_f$  mit einer initialen Anzahl an Molekülen  $N_0$  der Ziel-mRNA ( $X$ ) dann gilt:

$$N_0(X)_i = (V_f - i) \cdot [X]_A + i \cdot [X]_B$$

von diesem Mix enthalten  $m$  Mikroliter

$$(N_0(X)_i \cdot m) / V_f \text{ mRNA}$$

dieses bedeutet im Fall der exponentiellen Amplifikation, sofern  $m / V_f$  konstant sind, dass die folgende Zahl an amplifizierten Molekülen ( $N$ ) der Ziel-mRNA  $X$  vorliegt:

$$N(X)_i = (V_f - i) \cdot [X]_A + i \cdot [X]_B \cdot m$$

Der Quotient der erhaltenen Signaldichten aus  $[X]_A / [X]_B$  beschreibt im Ergebnis in jedem Punkt der Regressionsgeraden das relative Verhältnis der RNA-Proben zueinander. Die Lage der Punkte auf der Regressionsgeraden gibt an, ob die Effizienz der Reaktion in allen PCR-Reaktionsgefäßen vergleichbar ist.

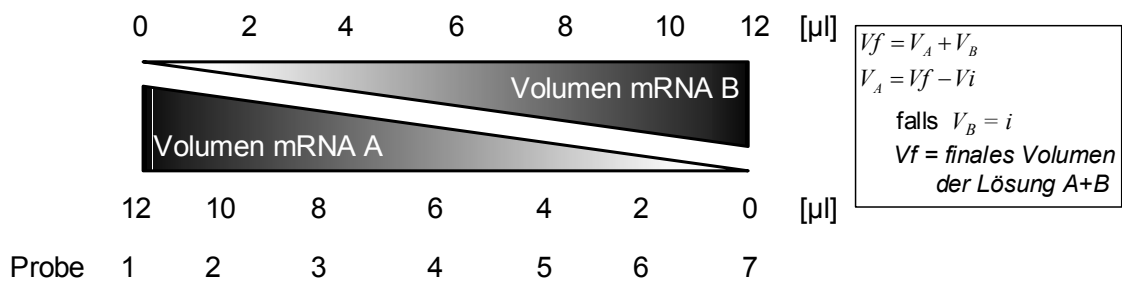


Abb. 4: Pipettierschema der progressiven Verdünnungsreihe nach NICOLETTI & SASSY-PRIGENT (1996)

Da Variationen beim Laden mit Gesamt-RNA zwischen den Reaktionsgefäßen denkbar sind, führten NICOLETTI & SASSY-PRIGENT (1996) im Weiteren eine PCR zur Normierung mit GAPDH-genspezifischen Primern als interne Kontrolle nach dem selben Schema durch.

Für das Protokoll wurden Effizienzkurven der Amplifikation mit GAPDH- und GHR-Primern aufgenommen, um die exponentielle Phase der PCR für die jeweiligen Primerpaare zu ermitteln. Für die reverse Transkription wurde gepoolte Gesamt-RNA von 180 Tage alten weiblichen DL-Schweinen verwendet.

Um einerseits die separate PCR zur Normierung unnötig zu machen und andererseits die Aussagefähigkeit der PCR zu verbessern, wurde das Protokoll nach NICOLETTI & SASSY-PRIGENT (1996) umgestaltet und als Multiplex-PCR durchgeführt.

Bei der Multiplex-PCR wird die mRNA eines Haushaltsgens zusammen mit der Ziel-mRNA unter der Verwendung von zwei unabhängigen Primerpaaren in der exponentiellen Phase der Reaktion amplifiziert (NOONAN et al., 1990; ASHWELL et al., 1999; KUES et al., 2000).

Die Bedingungen der PCR sind Kap. 1.3.2 zu entnehmen. Die Optimierung des Protokolls für beide Primerpaare in der Multiplex-PCR wurde in Kap. 1.3.2 aufgezeigt und in einem Volumen von 50 μl mit den entsprechenden Zyklusparametern durchgeführt. Die KCl-Konzentration musste bei Verwendung der GAPDH-Primer deutlich erhöht werden, um die Amplifikation unspezifischer größerer Produkte zu unterbinden. Die Begründung liegt darin, dass größere DNA-Fragmente unter hohen Salzkonzentrationen langsamer denaturiert werden als kürzere Moleküle,

welche dann bevorzugt amplifiziert werden. Die höhere Salzkonzentration setzt allerdings zugleich die Stringenz des Puffers herab. Bei einer gleichzeitigen Erhöhung der  $MgCl_2$ -Konzentration ergeben sich additive Effekte beider Salzkonzentration unter einer partiellen Hemmung der Polymerase (HENEGARIU et al., 1994, 1997).

Tabelle 8: Hauptkomponenten in den Pipetieransätzen der Multiplex-PCR

	Teil 1	Teil 2	Endkonzentration
Zugabe zu Zyklus	1	6	-
Primer	GHR	GAPDH	GAPDH / GHR
Volumen [ $\mu$ l]	25	25	50
Tris-HCl	25 mM	37 mM	31 mM
$MgCl_2$	2,04 mM	3,84 mM	2,94 mM
KCl	58,5 mM	118,5 mM	88,5 mM
Triton x - 100	0,1% (v/v)	0,1% (v/v)	0,1% (v/v)
dNTP MIX jeweils	200 $\mu$ M	-	100 $\mu$ M
Primer	0,8 $\mu$ M	0,8 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M
DNA-Polymerase	2 U	-	2 U
Zykluszahl	30	25	-

Auf Grund der im Vergleich zum GAPDH-Fragment nur geringen Genexpression des GHR-Fragments wurde in den ersten 5 Zyklen der Multiplex-PCR mit einem Teil des Reaktionsansatzes die Amplifikation der GHR-cDNA forciert. Zum Schutz vor Verdunstung wurde der Ansatz mit Wachs (Dynawax, Finnzymes Oy, Vertrieb Biometra) überschichtet. Um die Variabilität gering zu halten, erfolgte die Zugabe der GAPDH-Primer in einem Volumen von 25  $\mu$ l bei 95°C durch die Wachsschicht hindurch. Gleichzeitig wurde nun eine Salzkonzentrationen eingestellt, die eine Bildung von unspezifischen Banden durch die GAPDH Primer verhinderte, aber trotzdem für die Amplifikation der GAPDH- und GHR-DNA-Fragmente optimal geeignet war.

Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die spezifischen Signaldichten wurden mit dem Programm Image Master 1D Elite entsprechend Kap. 1.4.3 bestimmt und die Quotienten aus den erhaltenen Signalintensitäten beider RNA-Proben ( $[X]_A / [X]_B$ ) berechnet. Als Ergebnis können die relativen Konzentrationen der unbekannt RNA-Proben zueinander, unter Berücksichtigung der Amplifikation der internen Kontrolle, angegeben werden.

### 1.4.3. Relative kompetitive PCR mit einem heterologen DNA-Standard

Erstmals wurde die Methode der Quantifizierung von mRNA mittels kompetitiver PCR von WANG et al. (1989) und GILLIAND et al. (1990) beschrieben. Das Prinzip dieser Technik beruht auf der gemeinsamen Amplifikation des Zielgens mit einem parallel amplifizierten Standard bekannter Konzentration. Bedingung sind identische Primerbindungsstellen (DUFVA et al., 1995) an beiden Sequenzen und vergleichbare Effizienzen der parallelen Amplifikation, die nach CHELLY et al. (1988) ermittelt werden können. Bei dem Kompetitor kann es sich um eine cRNA (PFAFFL et al., 1998) oder aber um eine cDNA (SIEBERT & LARRICK, 1992, 1993; JACOBSON et al., 1998) handeln. Eine absolute Quantifizierung ist allerdings nur unter Verwendung eines cRNA-Kompetitors möglich, da in diesem Fall die Effizienz der reversen Transkription direkt kontrolliert wird. Nicht berücksichtigt wird dabei die Tatsache, dass die RNA-Proben teilweise degradiert sein könnten, ohne dass der Kompetitor in seinem Amplifikationspotential beeinflusst wird (VOLKENHANDT et al., 1992). Diese Überlegung wurde von BRANDSTETTER et al. (2000) indirekt durch eine Normierung gegen die 18 S rRNA-Expression aufgenommen. Parallel zur kompetitiven PCR mit einem cRNA-Standard wurde in dieser Studie separat ein Northern blot zur Kontrolle der RNA-Integrität und der Ladung von Gesamt-RNA durchgeführt.

Der Aufbau des Protokolls der kompetitiven PCR zur relativen Quantifizierung der GHR-mRNA erfolgte mit Hilfe des PCR MIMIC<sup>TM</sup> Construction Kit (Clontech). Der heterologe DNA-Standard entstammt einem Fragment des v-erbB Gens (SIEBERT & LARRICK, 1992, 1993). In Anlehnung an JACOBSEN et al. (1998) und THELLIN et al. (1999) wurde das Ergebnis gegen die Expression der 18 S rRNA normiert.

#### 1.4.3.1 Herstellung des heterologen DNA-Kompetitors

Die für die Vorbereitung des pGHR-Kompetitors in der primären PCR benötigten zusammengesetzten Primer bestanden aus den GHR-Primern, die mit den v-erbB-spezifischen Primern ligiert waren. Die Primer wurden so konzipiert, dass der DNA-Kompetitor einen Größenunterschied von mindestens 100 Bp zum 322 Bp GHR-Fragment aufweist (Abb. 5). Der spätere interne Standard sollte auf dem Agarosegel gut vom GHR-Fragment differenzierbar sein und wurde daher mit einer Gesamtgröße von 431 Bp aufgebaut.



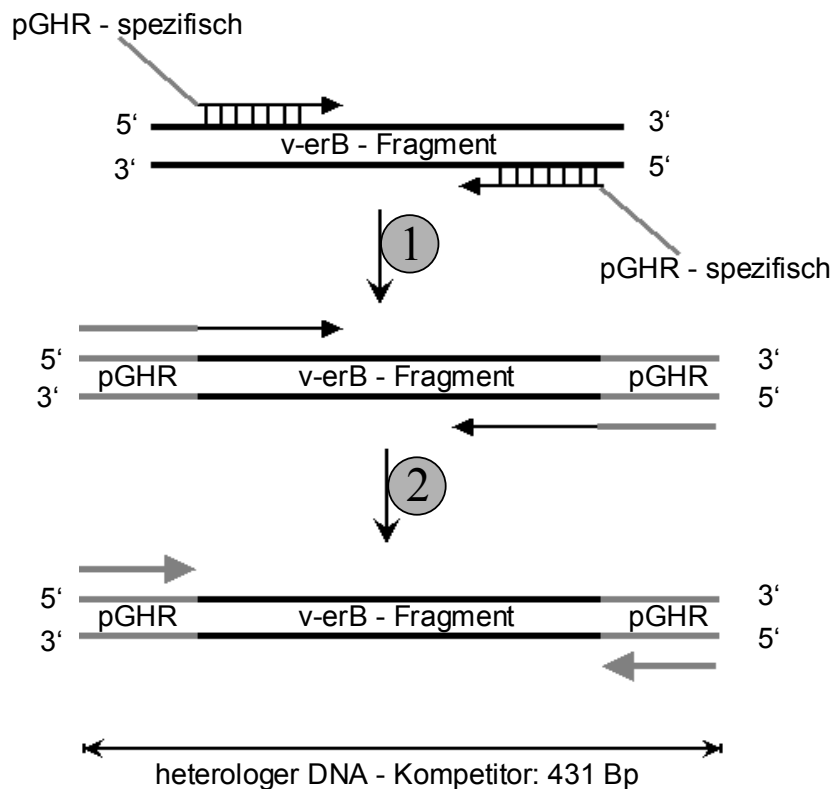


Abb. 5: Herstellung des heterologen DNA-Kompetitors mit Hilfe zusammengesetzter Primer (1), anschließend Amplifikation mit GHR-genspezifischen Primern (2) (modifiziert nach Clontech Kit-Protokoll)

Die primäre PCR zur Herstellung des heterologen DNA-Kompetitors wurde mit den in Tabelle 9 genannten Bedingungen durchgeführt. Ein Aliquot des Produkts der primären PCR-Amplifikation wurde 1:10 verdünnt. Anschließend wurden 2 µl dieser Lösung zusammen mit einer Endkonzentration von jeweils 2 µM GHR-genspezifischen Primern, 200 µM eines jeden Nukleotids und den in Kap. 1.3.2. genannten weiteren Komponenten mit den in Tabelle 9 beschriebenen Zyklusparametern amplifiziert.

Das Produkt wurde nach Auftrennung auf einem Agarosegel bewertet und 1:100 verdünnt. Aliquots von 2 µl dieser Verdünnung wurden unter den vorherigen Bedingungen reamplifiziert und nach Überprüfung im Agarosegel mit den im Kit enthaltenen Chroma Spin + TE-100 Säulen nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

Tabelle 9: Bedingungen der primären PCR zur Herstellung des heterologen DNA-Kompetitors

Komponente	Endkonzentration	PCR-Zyklus	Zeit [sec]	Temp. [°C]
v-erB DNA (1ng)	20 pg / $\mu$ l	Denaturierung	45	94
Tris-HCl	10 mM	Annealing	45	50
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	Extension	90	72
KCl	50 mM			
dNTP MIX jeweils	200 $\mu$ M	Zykluszahl	X 21	
Primer	0,4 $\mu$ M			
DNA-Polymerase	2 U	Kühlung		4°C

Der aufgereinigten DNA wurden zur Stabilisierung 1 / 10 Volumen 10 X PCR Puffer (Endkonzentration 50 mM KCl) zugefügt. In der nun folgenden Gel-elektrophorese wurden einerseits die Qualität des aufgereinigten Kompetitors beurteilt und andererseits dessen Konzentration im Aufreinigungsansatz bestimmt. Die Quantifizierung der DNA-Masse im Gel erfolgte mit dem im Kit enthaltenen MW-Marker  $\Phi$  174 Hae III, der mit drei unterschiedlichen Konzentrationen auf das Gel aufgetragen wurde. Auf Grund der mit dem Programm Image Master 1D Elite ermittelten DNA-Konzentration wurde dieser Stock mit einer 10  $\mu$ g / ml Glycogenlösung auf 100 amol /  $\mu$ l eingestellt. Die verwendete Glycogenlösung wurde aus einer Stammlösung mit 5  $\mu$ g /  $\mu$ l (w / v) Glycogen in H<sub>2</sub>O und TE-Puffer, pH 7,5 hergestellt. Aliquots der Kompetitor-Verdünnung von 100 amol /  $\mu$ l wurden dekadisch bis auf 10<sup>-6</sup> amol /  $\mu$ l weiter verdünnt. Diese Standards wurden bei -20°C eingefroren und im Folgenden nicht mehr als dreimal aufgetaut.

#### 1.4.3.2 Validierung der kompetitiven PCR

Bereits in Kap. 1.3.2 wurden die optimierten Parameter der Amplifikation der GHR cDNA aufgezeigt. Im Weiteren war es notwendig zu beweisen, dass die Amplifikation der spezifischen cDNA mit dem GHR-Kompetitor parallel erfolgt. Bei der Aufnahme der entsprechenden Effizienzkurve wurde darauf geachtet, bei einem Volumen von jeweils 3  $\mu$ l, vergleichbare Konzentrationen an cDNA und Kompetitor einzusetzen, da die Zuverlässigkeit des Systems bei ähnlichen Konzentrationen am höchsten ist (SOUAZÉ et al., 1996). Wiederholt wurden die cDNA und der Kompetitor gemeinsam einer PCR mit 21 bis 33 Zyklen den in

Tabelle 4 genannten Parametern unterworfen. Zur Darstellung der Linearität und des dynamischen Bereichs des Systems wurden serielle 1:10 und 1:2 Verdünnungsreihen des Kompetitors mit einem konstanten Volumen an cDNA amplifiziert. Nachdem Parallelität und Linearität der kompetitiven PCR entsprechend Kap. 1.4.3.3 nachgewiesen worden waren, wurde im Rückschluss die relative GHR-Genexpression in einem Gesamt-RNA Pool unter Verwendung unterschiedlicher Zykluszahlen überprüft (ZHANG & BYRNE, 1999).

#### 1.4.3.3 Durchführung der kompetitiven PCR

Zur Bestimmung einer unbekannt Gruppe von Proben mit einem diskreten Merkmal erfolgte in einem Vorversuch zuerst die Titration einzelner Proben oder eines Probenpools gegen die serielle 1:10 Verdünnungsreihe des Kompetitors. Nach der Festlegung des Erwartungsbereiches wurden ausgehend von dem Standard, dessen PCR-Produkt eine höhere Bandenintensität ergab als das Produkt der parallel amplifizierten GHR cDNA, serielle 1:2 Verdünnungsreihen angelegt. Für die relative Quantifizierung der GHR-mRNA wurden 3 µl der cDNA einer unbekannt RNA-Probe mit jeweils 3 µl dreier adäquater serieller 1:2 Verdünnungen des Kompetitors amplifiziert. Diese von der Fa. Clontech als „fine-tuned kompetitive PCR“ bezeichnete Titration ist notwendig, da das Ergebnis der Quantifizierung umso exakter ist, je äquimolarer die Ziel-cDNA und der Kompetitor im PCR-Ansatz zueinander vorliegen (RAEYMAEKERS, 1993; NAGANO & KELLY, 1994; SOUAZÉ et al., 1996). Alle Ansätze der kompetitiven PCR wurden mit Wachs (Dynawax, Finnzymes Oy, Vertrieb Biometra) überschichtet.

#### 1.4.3.4 Auswertung der relativen kompetitiven PCR

Die Auswertung erfolgte nach der Auftrennung der EtBr gefärbten PCR-Produkte im Agarosegel (Kap. 1.3.2.2). Das Fluoreszenzsignal des unter UV-Licht angeregten EtBr wurde nach der digitalen Sicherung mit dem Programm Image Master 1D Elite quantifiziert.

Bestimmung der äquivalenten Signalintensitäten:

Die Signalintensität der PCR-Produktbande ergibt sich nach dem Abzug der ermittelten Hintergrundintensität von der zugehörigen Bandenintensität. Sie stellt die Summe der Intensitäten eines jeden Pixels der Bande dar. Es wurde der Quotient aus der Signalintensität der GHR- und der Kompetitor-PCR-Produkt-

bande gebildet. Eine Korrektur des Fluoreszenzsignals bezüglich der variierenden Größe der DNA-Fragmente (MENZO et al., 1992) erfolgte im Sinne der relativen Quantifizierung nicht. Der  $\log_{10}$ -Betrag des Verhältnisses der Signalintensitäten wurde gegen die zugehörige  $\log_{10}$ -Konzentration an verwendetem Kompetitor ( $\text{amol } \mu\text{l}^{-1}$ ) aufgetragen (SIEBERT & LARRICK, 1992). Mit Hilfe der Geradengleichung der linearen Regression, erhalten aus den drei Messwerten einer unbekannt RNA-Probe, wurde dem Äquivalenzpunkt beider Signalintensitäten auf der y-Achse ( $\log_{10} [\text{GHR} / \text{GHR-Kompetitor}] = 0$ ) der Wert auf der x-Achse ( $\log_{10} [\text{amol } \mu\text{l}^{-1} \text{ Kompetitor}]$ ) zugeordnet. Durch das Bestimmtheitsmaß ( $B = r^2$ ) wurde auf die Güte der PCR geschlossen.

Ergebniskorrektur der kompetitiven PCR durch die Amplifikation von 18 S rRNA:  
Die Verwendung eines DNA-Kompetitors zur Quantifizierung der Genexpression mit Hilfe der kompetitiven PCR erlaubt aus unterschiedlichen Gründen nur die Darstellung von relativen Verhältnissen:

- eine variierende Ladung von Gesamt-RNA bei der Synthese der cDNA wird nicht offenbar
- Differenzen in der Effizienz der reversen Transkription werden nicht erfasst

Da die oben angeführten Argumente kontrolliert werden müssen, ergab sich die Notwendigkeit einer Ergebniskorrektur. Für diesen Zweck wurde die 18 S rRNA ausgewählt, die eine geeignete Ladekontrolle für Gesamt-RNA darstellt (Davis et al., 1997). Mit diesem Fragment lassen sich zugleich variierende Effizienzen bei der cDNA-Synthese überprüfen. Für die Kontrollreaktion wurde ein weiteres Aliquot der bereits in der kompetitiven PCR analysierten cDNA mit 18 S rRNA genspezifischen Primern entsprechend Kap. 1.3.2 amplifiziert. Zuvor wurde der exponentielle Bereich der PCR durch die Aufnahme einer Effizienzkurve festgestellt. Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und nach Digitalisierung quantifiziert.

Erstellung eines Korrekturfaktors:

Um mehrere Agarosegele gegeneinander abzugleichen wurde zuerst die Signaldichte der spezifischen 18 S rRNA PCR-Produktbande in Relation zu dem MW-

Marker  $\Phi$  X 174 DNA / BsuRI (Hae III), bei zweifachem Auftrag des Markers auf das Gel, gesetzt. Anschließend wurde der Mittelwert aller 18 S rRNA Bandenintensitäten, bestehend aus allen Proben eines Experiments, durch jede einzelne Bande dividiert. Der erhaltene Wert bildete den Korrekturfaktor mit dem jedes Ergebnis der kompetitiven PCR multipliziert wurde.

Das Ergebnis der relativen Quantifizierung der porcinen GHR-mRNA wurde in relativen Einheiten [A.U.] dargestellt.

In Entsprechung zu Kap. 1.3.2.1 wurde in jeder PCR eine Kontrolle mitgeführt. In Abständen wurde zusätzlich cDNA auf mögliche Kontamination mit Kompetitor und umgekehrt untersucht.

## **2. Hormonanalytik**

Die Bestimmung von GH im Plasma erfolgte mit einem homologen Doppelantikörper-Radioimmunoassay (Bauer & Parvizi, 1996). Für Markierung und Standards wurde hochreines porcines GH der Fa. Biogenesis (Poole, Großbritannien) verwendet. Die Markierung des GH mit Na<sup>125</sup>I erfolgte mit Lactoperoxidase (PINTO et al., 1977). Der erste Antikörper (Kaninchen-Anti-pGH; Endverdünnung 1:20000) und der zweite Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen IgG, Endverdünnung 1:45) wurden im Institut hergestellt und aufgereinigt. Eine Kreuzreaktivität mit anderen hypophysären Hormonen existiert nicht. Plasmapoolwiederholungen ergaben einen Intraassay-Variationskoeffizienten von 9% und einen Interassay-Variationskoeffizienten von 14%. Alle Plasmaproben eines Tieres bzw. einer Gruppe wurden in einem Assay in Doppelbestimmung analysiert.

### **3. Untersuchungsgruppen und Eingriffe am Tier**

#### **3.1. Versuchstiere**

Die Untersuchungen wurden an Schweinen der Rasse DL sowie an Schweinen einer DL-Linie mit einem erblichen Defekt der renalen 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -Hydroxylierung durchgeführt (zur Übersicht: HARMEYER, 1991). Die Geneprodukte des P450c1- (CYP27B1) Mixed-function oxidase Gens von Tieren dieser Linie weisen Mutationen unterschiedlichen Typs auf (CHAVEZ et al., 2000). Die homozygoten Ferkel dieser Linie bilden mit zunehmenden Alter das Krankheitsbild der Pseudovitamin-D-Mangelrachitis Typ 1 (PVDRI) aus (PLONAIT, 1969). Des Weiteren standen Göttinger Miniaturschweine (MINI) sowie ihre PVDRI Pendant (MINI-PVDRI) zur Verfügung.

#### **3.2. Tierhaltung**

Die Tiere entstammten dem Zuchtbetrieb des Instituts für Tierzucht und Tiervershalten (Mariensee, Mecklenhorst). Die PVDRI-Linien wurden mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Harmeyer (Institut für Physiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover) am Institut für Tierzucht und Tiervershalten in Mariensee etabliert.

Die homozygoten PVDRI-Schweine wurden alle 4 - 6 Wochen entsprechend eines Behandlungsplans (Institut für Physiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover) mit Vitamin D<sub>3</sub> (D<sub>3</sub> Vitamin D wasserlöslich, WDT, Garbsen) therapiert. Die Behandlung von trächtigen Sauen, deren Nachkommen für den Versuch vorgesehen waren, wurde 8 Wochen vor dem errechneten Geburtstermin ausgesetzt (LACHENMAIYER-CURRLE & HARMEYER, 1989). Die Behandlung der für die Schlachtung vorgesehenen Tiere lag zum Zeitpunkt der Probenentnahme eine Behandlungsperiode zurück. Zur Schlachtung vorgesehene Ferkel mit einem Alter von bis zu 8 Wochen wurden nicht mit Vitamin D<sub>3</sub> therapiert. Die Ferkel der Miniaturschweinelinien wurden mit ca. 6 Wochen abgesetzt. Sofern eine Schlachtung mit 4 Wochen geplant war, blieben sie 24 Tage bei der Sau. Die DL-Ferkel wurden mit 4 Wochen von der Mutter entfernt.

### **3.3. Blut- und Gewebeproben**

#### **3.3.1. Chronische Katheterisierung von Sau und Ferkel**

Die Tiere erhielten 24 Stunden vor dem Eingriff letztmalig Futter und wurden vor dem Eingriff mit 2,5 mg / kg KG Azaperon (Streßnil<sup>®</sup>, Janssen, Neuss) i.m. sediert. Die Einleitung der Narkose erfolgte bei der Sau durch die Applikation von 10 mg / kg KG Ketamin (Ketamin 10%, Atarost, Twistring) über die Ohrvene. Die mit 35 Tagen katheterisierten Ferkel erhielten das Narkosemittel intraperitoneal verabreicht. Unter Narkose wurde das Operationsfeld rasiert, gereinigt und desinfiziert. Die Katheterisierung der Vena jugularis externa erfolgte nach der Methode von Ellendorff et al. (1977).

#### **3.3.2. Chronische Katheterisierung des Fetus**

Zur Bestimmung von GH-Sekretionsmustern beim Fetus erfolgte die chronische Katheterisierung der Feten mit  $98,6 \pm 0,9$  SEM Tagen p.c.. Das Alter des Fetus wurde auf das Deckdatum (Tag 0) bezogen.

Der Eingriff entsprach weitgehend der von BAUER & PARVIZI (1996) beschriebenen Methode. Die Operation wurde strikt steril unter dem Reinluftstrom einer horizontalen Laminar Air Flow (ICN Biomedicals, Meckenheim) durchgeführt. Eine Antibiotikatherapie der Sau mit 625000 I.E. Penicillin und 625 mg Dihydrostreptomycin (Tardomyocel comp. III, Bayer, Leverkusen) bis drei Tage nach der Operation diente der Infektionsprophylaxe. Die seitliche Naht sowie die Austrittsstelle des Katheters wurden täglich mit Sulfonamidpuder (WDT, Garbsen) behandelt.

#### **3.3.3. Blutentnahme beim Fetus- und Ferkel**

Mit den Blutentnahmen wurde frühestens zwei Tage nach der Katheterisierung begonnen. Das Blutentnahmevolumen betrug bei den Feten 1 ml im Intervall von 15 min über 120 min. Den Ferkeln wurden je 2 ml Blut im gleichen Rhythmus und Zeitraum, mit drei zusätzlichen Proben zum Zeitpunkt  $t = 35, 40, 50$  min, entnommen (siehe Abb. 7). Die Ferkel wurden 30 min vor Versuchsbeginn einzeln auf Stroh aufgestellt. Die Blutentnahmen begannen jeweils um 9 Uhr und wurden im Abstand von zwei Tagen solange fortgesetzt, wie der Katheter dies

ermöglichte. Das entnommene Blut wurde isovolumetrisch durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt. Die Blutproben wurden in heparinisierte Röhrchen verbracht und kurzfristig im Eiswasserbad gelagert. Das Plasma wurde nach Zentrifugation bei 4°C mit 1500 g für 20 min gewonnen und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **3.3.4. Blutgasbestimmung**

Zur Überprüfung physiologischer Blutparameter beim Fetus wurden zu Beginn und am Ende jeder Profilentnahme eine Blutprobe zur Blutgas- und Hämatokritbestimmung entnommen. In die Auswertung wurden nur Blutprofile aufgenommen, bei denen die Feten einen Sauerstoffpartialdruck von mehr als 18 mm HG bei einem pH-Wert zwischen 7,3 und 7,5 aufwiesen.

#### **3.3.5. Gewebeentnahme**

Die Entnahme von Leber- und Nierengewebe fand im institutseigenen Schlachthaus statt. Die Präparation des Gewebes, die innerhalb von 15 min nach der Schlachtung erfolgte, wurde auf eisgekühlter physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt. Die Proben wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

### **4. Experimente**

#### **4.1. Untersuchungen zur pränatalen Ontogenese der GHR-Genexpression**

Die Anzahl und die Altersgruppen der für einen ersten Versuchsteil zur Verfügung stehenden Tiere sind der Tabelle 10 zu entnehmen. Aufgearbeitet wurde die Gesamt-RNA von 18 Feten einer jeden Altersstufe (Alter p.c.  $\pm$  1 d). Die GHR-mRNA Konzentration der Feten wurde in Relation zu 180 Tage alten weiblichen Tieren betrachtet. Eine Geschlechtsbestimmung der Feten in der Gruppe 30 p.c. erfolgte nicht.



Tabelle 10: Altersgruppen und Tierzahlen im ersten Versuchsteil zur pränatalen Ontogenese der GHR-Genexpression

Alter [d]; Bereich; (Gruppe)	Anzahl der Tiere	männlich	weiblich
30; 30 - 31 (30 p.c.)	18	-	-
49; 48 - 50 (50 p.c.)	18	9	9
71; 70 - 71 (70 p.c.)	18	9	9
90; 89 - 91 (90 p.c.)	18	9	9
182; 149 - 214 (180 p.p.)	12	-	12

In einem zweiten Versuchsteil wurde den Auswirkungen eines hereditären renalen  $1\alpha$ -Hydroxylasedefekts auf die GHR-Genexpression in der Leber und der Niere des 90 Tage alten Fetus nachgegangen. Zur Verfügung standen Leber- und Nierenproben von 16 Feten der Linie DL-PVDRI und 24 Feten der Linie DL.

Tabelle 11: Alter und Anzahl der Feten im zweiten Versuchsteil zur pränatalen Ontogenese der GHR-Genexpression

Linie	Alter p.c. [d]; Bereich	Anzahl der Tiere	männlich	weiblich
DL	90; 89-91	24	12	12
DL-PVDRI	90; 90-91	16	7	9

#### 4.2. Untersuchungen zur postnatalen Ontogenese der GHR-Genexpression

In einem ersten Experiment erfolgte die Bestimmung der GHR-mRNA-Konzentration in der Leber von jeweils 8 42 Tage alten Ferkeln der Linien DL und DL-PVDRI.

In einem weiteren Versuchsteil wurde der postnatalen Ontogenese der GHR-Genexpression in Leber und Niere des Miniaturschweins nachgegangen. Die

Altersgruppen sowie die Anzahl der für dieses Experiment zur Verfügung stehenden Tiere sind der Tabelle 12 zu entnehmen. Besondere Berücksichtigung fand hier der Vergleich zwischen den Linien MINI und MINI-PVDRI.

Tabelle 12: Altersgruppen und Tierzahlen der untersuchten Miniaturschweine der Linien MINI und MINI-PVDRI

Alter [d]; Bereich; (Gruppe)		MINI		MINI-PVDRI	
MINI	MINI-PVDRI	männlich	weiblich	männlich	weiblich
28; 27 - 28 (4 Wochen)	29; 28 - 31 (4 Wochen)	3	3	3	3
63; 57 - 71 (8 Wochen)	56; 55 - 58 (8 Wochen)	3	3	3	3
113; 112 - 113 (16 Wochen)	118; 117 - 119 (16 Wochen)	3	3	3	3
235; 195 - 297 (adult)	399; 296 - 533 (adult)	3	3	3	3

### 4.3. Untersuchungen zur GH-Plasmakonzentration

#### 4.3.1. Vergleich der GH-Plasmakonzentration bei DL- und DL-PVDRI-Feten

Blutprofile wurden von 3 DL- und 4 DL-PVDRI-Feten über den chronischen Verweilkatheter gewonnen (Abb. 6).

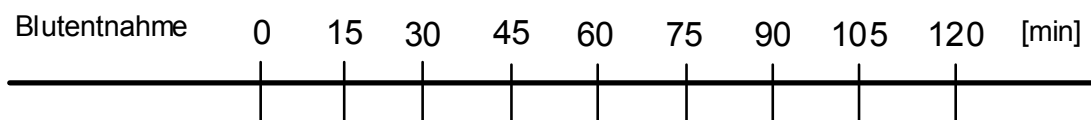


Abb. 6: Blutentnahmeschema beim Fetus

Für vergleichende Untersuchungen zur GH-Plasmakonzentration beim Ferkel standen 8 DL- und 10 DL-PVDRI-Ferkel bereit. Ihnen wurde erstmalig im Alter von 37 Tagen p.p. über den chronischen Verweilkatheter Blut entnommen (Abb. 7).

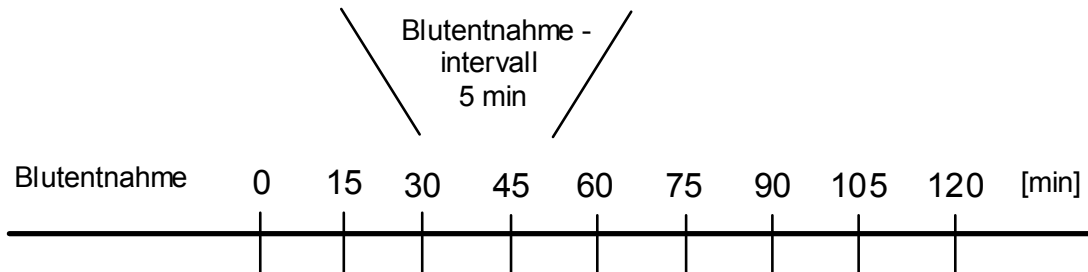


Abb. 7: Blutentnahmeschema beim Ferkel

#### 4.3.2. Vergleich der GH-Plasmakonzentration bei DL- und DL-PVDRI-Ferkeln

Um die Ansprechbarkeit der Hypothalamus-Hypophysen-Achse bei den Tieren der Linie DL-PVDRI zu überprüfen, erfolgte bei ihnen nach einem randomisierten Schema entsprechend RETTMER (1995) zusätzlich die Stimulation mit humanem GRF (1-29 NH<sub>2</sub>) der Fa. Bachem (Lot 513411) und SRIF (1-14, zyklisch) der Fa. Sigma (Lot 67H1611) (Abb. 8).

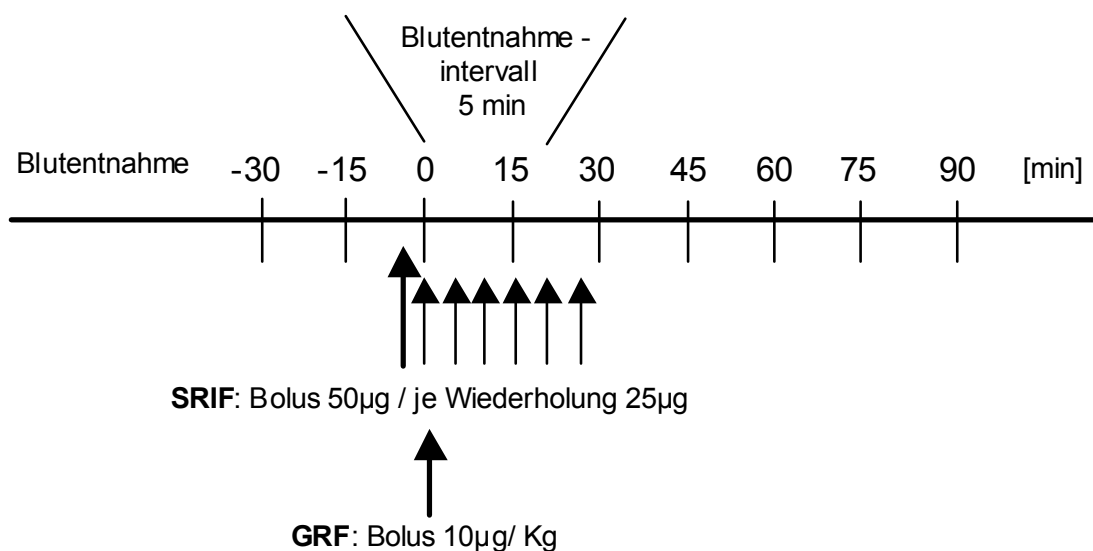


Abb. 8: Schema der Behandlung von DL-PVDRI-Ferkeln mit GRF und SRIF

GRF und SRIF wurden in einer Verdünnung von 0,5 µg / µl physiologischer Kochsalzlösung gelöst, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die Tiere erhielten jeweils 10 µg GRF / kg KG. Alternativ wurde ihnen nach einer einmaligen Applikation von 50 µg SRIF in 6 Wiederholungen jeweils 25 µg SRIF im Abstand von 5 min verabreicht. Die benötigten Aliquots wurden direkt vor der Applikation aufgetaut und auf das Injektionsvolumen von 1 ml mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt.

Durch die Untersuchungen von RETTMER (1995) an DL-Ferkeln vergleichbaren Alters, lagen bereits Vergleichswerte vor. Aus tierschutzrelevanten Gründen wurde daher auf eine Untersuchung weiterer DL-Ferkel verzichtet.

## **5. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen SigmaStat (ver. 2.03, Jandel Scientific) und SAS (SAS, ver. 6.12, Statistical Analysis System Institute, Cary, NC, USA). Das Signifikanzniveau  $\alpha$  wurde mit  $\leq 5\%$  festgelegt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\leq 10\%$  wurde als Tendenz ausgewiesen (LIU et al., 2000). Jeder Analyse ging die Überprüfung der Normalverteilungsannahme voraus. Eine Berücksichtigung der Geschlechter erfolgte nicht. Korrelationsanalysen wurden nach Pearson durchgeführt. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung wurden unabhängig von der Normalverteilungsannahme (DUFVA et al., 1995; JEFFRAY et al., 1998; SHEN et al., 1998) als Mittelwert ( $\bar{X}$ ) mit dem Standardfehler des Mittelwerts ( $\pm$  SEM) angegeben.

### **5.1. GHR-Genexpression während der pränatalen Entwicklung**

Als Tests kamen in Abhängigkeit von dem vorliegenden Datenmaterial der Student's t-Test und der Mann-Whitney Rangsummentest zur Anwendung. Die 90 Tage alten Feten der einzelnen Sauen der Linie DL-PVDRI wurden mit dem Kruskal Wallis Test gegen die Gruppe der DL-Feten getestet. In diesem Fall fand die Isolierung von Signifikanzen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest statt.

## 5.2. GHR-Genexpression während der postnatalen Entwicklung

Die Auswertungen wurden mit einer einfaktoriellen Varianz-Analyse (ANOVA) durchgeführt. Beim Vorliegen von Signifikanzen wurden diese mit dem Tukey Test im paarweisen Vergleich ermittelt.

Mit Hilfe der Varianz-Analyse (ANOVA) und dem Kruskal Wallis Test wurde ebenfalls Gruppenunterschieden während der pränatalen und postnatalen Ontogenese bei der Gewichtsentwicklung und der mRNA-Konzentration nachgegangen. Die Isolierung der Signifikanzen erfolgte während der postnatalen Entwicklung nach dem Kruskal Wallis Test mit der Dunn's Methode.

Bei Vorlage des entsprechenden Datenmaterials wurde der Student's t-Test angewendet.

## 5.3. GH-Plasmakonzentration

Sofern von einem Tier mehrere Blutentnahmeprofile einer Behandlung vorlagen, erfolgte die statistische Auswertung mit dem Mittelwert der GH-Plasmakonzentration zum Zeitpunkt  $t_i$ .

Die Auswertung der basalen und stimulierten GH-Sekretion beim Ferkel erfolgte durch Zeitreihenanalyse unter der Prozedur GLM (repeated measures analysis of variance).

Die Effekte einer Stimulation mit GRF und SRIF auf die GH-Plasmakonzentrationen beim Ferkel der Linie DL-PVDRI wurden zu jedem Zeitpunkt  $t_i$  als Prozentwerte im Vergleich zum Mittelwert der Vorbehandlungsperiode (-30 - 0 min) dargestellt. Die Vorbehandlungsperiode wurde mit 100 % gleichgesetzt.

Bei DL- und DL-PVDRI-Ferkeln wurde mit der Zeitreihenanalyse ebenfalls die Gewichtsentwicklung der Tiere zwischen der 1.- und der 5. Lebenswoche untersucht.

## V. Ergebnisse

### 1. Methode und qualitativer Nachweis der GHR-mRNA

#### 1.1. Verifikation der klonierten PCR-Produkte, Plasmide

Die Restriktionsanalyse der Plasmide sowie die sich anschließenden Sequenzierungen bestätigten die geforderten PCR-Produkte, die mit den selbst entwickelten Primern erhalten wurden. Das gewählte Insert / Vektor-Verhältnis von 1:40 ergab nach der Transformation als ein Indiz einer erfolgreichen Insertion, die höchste Anzahl weißer Zellklone.

#### 1.2. Qualitätsbeurteilung der Gesamt-RNA

Indikatoren für die Qualität der extrahierten RNA sind die ribosomalen Banden der 28 S rRNA und 18 S rRNA. Eine integrale Gesamt-RNA zeichnet sich nach EtBr-Färbung durch scharf gegeneinander abzugrenzende ribosomale Banden aus. Sie liegen im Verhältnis von 2:1, bei stöchiometrisch gleicher Verteilung der Moleküle in der Zelle vor. Schmalere Banden, angesiedelt zwischen den 28 S- und 18 S ribosomalen Banden (doppelsträngige RNA-Fragmente), sind Kennzeichen einer RNA-Degradierung (IVELL, 1998). Etwas „Schmier“ zwischen den ribosomalen Banden ist nach der Extraktion mit Guanidiniumsalzen allerdings als normal anzusehen (AUSUEBEL et al., 1997). Wie der Abb. 9 zu entnehmen ist, wurden die Bedingungen an die Integrität, aber auch an die Reinheit der extrahierten Gesamt-RNA erfüllt.

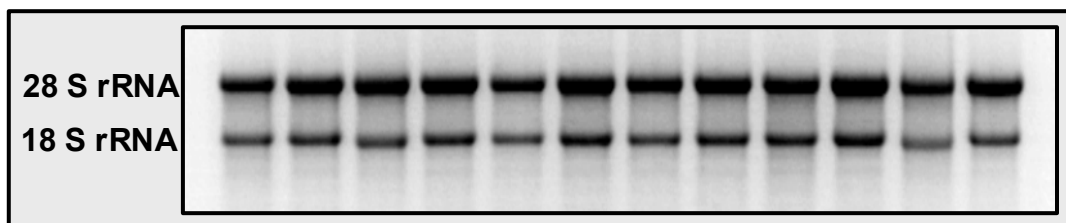


Abb. 9: Banden der 28 S rRNA- und 18 S rRNA nach der denaturierenden RNA-Gelelektrophorese im Formaldehyd / MOPS-Puffersystem

Sofern die Qualität der Gesamt-RNA auf Grund einer partiellen Degradierung als schlecht beurteilt wurde, erfolgte eine Wiederholung der RNA-Extraktion aus einer entsprechenden Gewebeprobe.

### 1.3. Lokalisation der GHR-Sonde

Die GHR-genspezifischen Primer wurden so gewählt, dass sowohl extrazellulär als auch intrazellulär codierende Bereiche der Rezeptor-mRNA involviert sind (Abb. 10). Mit diesem Primerpaar werden alle Varianten der GHR-mRNA nach alternativem Spleißen in der 5'-UTR erfasst. Die Primer sind auf Grund ihrer Homologie zur charakterisierten humanen GHR-DNA (GODOWSKI et al., 1989) auf Exon 7 und Exon 10 lokalisiert und schließen die Exons 8 und 9 komplett ein.

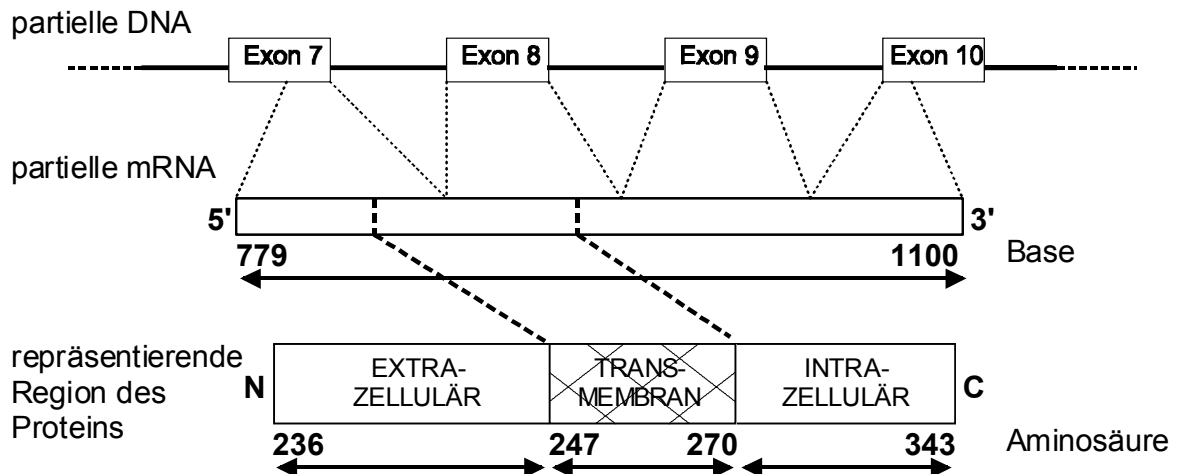


Abb. 10: Repräsentierende Abschnitte der porcinen GHR-Sonde auf der charakterisierten humanen DNA sowie dem GHR-Protein

PCR-Produktbanden, die auf Grund ihrer Größe der amplifizierten GHR-DNA zuzuordnen waren, wurden nicht beobachtet.

### 1.4. Qualitativer Nachweis der GHR-mRNA

Ein qualitativer Nachweis der porcinen GHR-mRNA konnte bereits in der jüngsten Untersuchungsgruppe von 30 Tagen p.c. durch RT-PCR geführt werden. Alle untersuchten Gewebe wiesen ein PCR-Produkt mit der spezifischen Größe von 322 Bp auf. Die überprüften Gewebe waren neben Leber und Niere Herz, Darm sowie Haut-Muskelgewebe der Körperwand.

Das Niveau der GHR-mRNA-Konzentration im Haut-Muskelgewebe der Körperwand war niedriger einzustufen (Abb. 11).

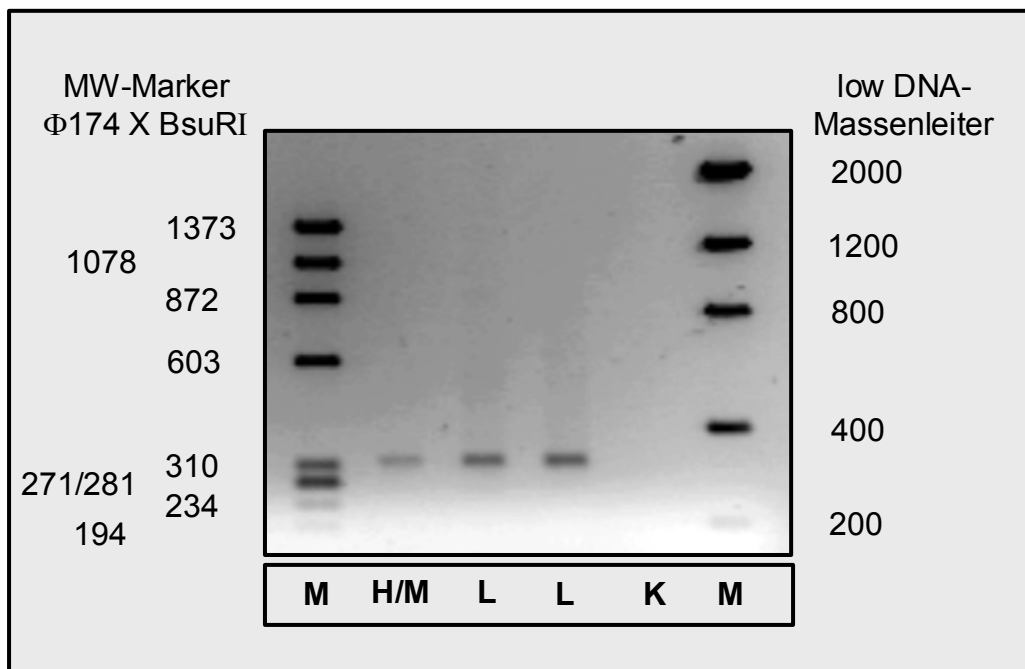


Abb. 11: Qualitativen Nachweis der GHR-mRNA in ausgewähltem fetalem Gewebe der Altersgruppe 30 p.c.; H/M: Haut-Muskelgewebe; K: PCR-Kontrolle; L: Leber; M: Marker

In der Niere, dem Herzen und dem Darm konnte im qualitativen Nachweis eine im Vergleich zur Leber der entsprechenden Altersgruppe bedeutend höhere Konzentration der GHR-mRNA beobachtet werden (Abb. 12).

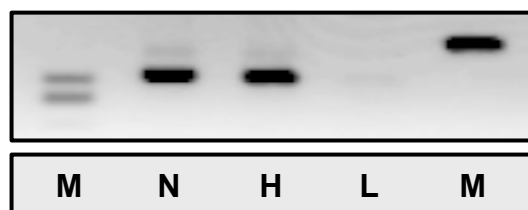


Abb. 12: Qualitativer Nachweis der GHR-mRNA in der fetalen Niere und dem Herzen im Vergleich zur fetalen Leber der Altersgruppe 30 p.c.; H: Herz; L: Leber; M: Marker; N: Niere

Ein starkes Signal des GHR-Fragments wurde ebenfalls im Lungengewebe von exemplarisch untersuchten 80 Tage alten Feten vorgefunden. Dieses war vergleichbar mit dem Signal in der Leber 180 Tage alter weiblicher Tiere (Abb. 13). Interessant ist dieser Nachweis im Hinblick auf die bewiesene Funktion des GHR in der Lunge des Rattenfetus (BATCHELOR et al., 1998).



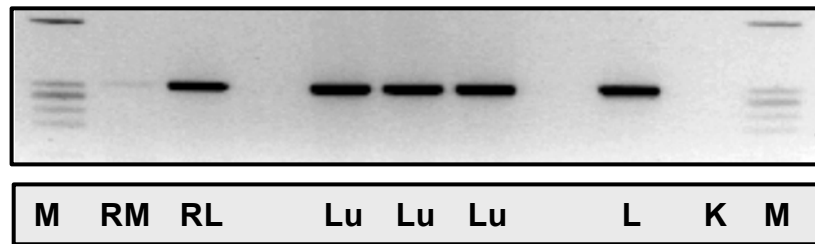


Abb. 13: Qualitativer Nachweis der GHR-mRNA in der Lunge des Schweinefetus (80 p.c.) sowie in der Leber und im Muskel des Rindes; K: Kontrolle; L: Leber 180pp weiblich; Lu: Lunge 80 p.c.; M: Marker; RL: Rinderleber; RM: Rindermuskel

Ein artübergreifender qualitativer Nachweis war mit den porcinen Primern möglich. Auf Grund der absoluten Übereinstimmung der Primer mit der bovinen Sequenz im 3'-Bereich, bei einer Gesamtübereinstimmung von 90 % bzw. 95 %, konnte ebenfalls die bovine GHR-mRNA nachgewiesen werden. Die Expression im bovinen Muskel war deutlich niedriger einzustufen als in der bovinen Leber (Abb. 13).

## 1.5. Auswahl der geeigneten Methode zur quantitativen Bestimmung der porcinen GHR-mRNA während der Ontogenese

### 1.5.1. Relativ quantifizierende PCR mit einer progressiven RNA-Verdünnungsreihe als Multiplex-PCR

Für die Bestimmung der relativen Unterschiede zweier RNA-Proben nach NICOLETTI & SASSY-PRIGENT (1996) war die Ermittlung der exponentiellen Phase der PCR-Amplifikation mit den ausgewählten GAPDH-Primern und GHR-Primern notwendig. Die Effizienzkurve der individuellen Amplifikation mit den GAPDH-Primern wies Linearität zwischen den Zyklen 21 und 27 auf. Ein linearer Bereich des exponentiellen Anstiegs war unter der alleinigen Verwendung der GHR-Primer zwischen dem 22. und 26. Zyklus gegeben. Ein linearer Bereich des exponentiellen Anstiegs war bei der Aufnahme der Effizienzkurve der Multiplex-PCR mit den GAPDH- und den GHR-Primern, bei einer vergleichbaren Steigung beider Kurven, zwischen den Zyklen 27 und 31 vorhanden (Abb. 14).

Im Vergleich zur GAPDH-Effizienzkurve wies die GHR-Effizienzkurve im Fall der Multiplex-PCR eine größere Variabilität auf. Durch die Verwendung der progressiven RNA-Verdünnungsreihe, zum relativen Vergleich von zwei unbekanntem RNA-Proben, wird diese Abweichung allerdings optimal kontrolliert.

Im Weiteren ist ein Ausgleich der unterschiedlichen Ladung an Gesamt-RNA sowie der abweichenden Effizienz der reversen Transkription und der PCR durch die Verdünnungsreihe gegeben. Mit Hilfe der Regressionsgleichung und dem sich ergebenden Bestimmtheitsmaß kann eine eindeutige Aussage über die Zuverlässigkeit des Ergebnisses erfolgen.

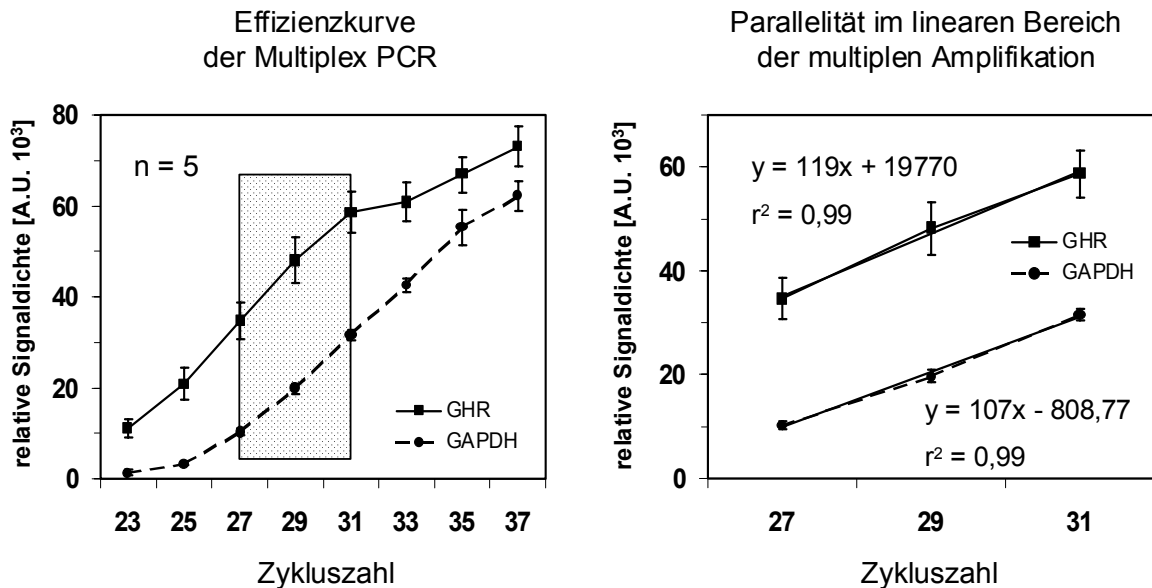


Abb. 14: Effizienz der Multiplex PCR mit GHR- und GAPDH-genspezifischen Primern ( $\pm$  SEM)

Die Multiplex-PCR mit GHR- und GAPDH-genspezifischen Primern ergab Unterschiede der GAPDH-Genexpression zwischen der fetalen Leber und der Leber adulter Schweine. In fetalen Leberproben wurde eine höhere GAPDH-mRNA-Konzentration als in der Leber der erwachsenen Tiere beobachtet. Gleichzeitig konnte der Nachweis der GHR-mRNA unter linearen PCR-Bedingungen in der unverdünnten fetalen Leberprobe nicht erbracht werden (Abb. 15).

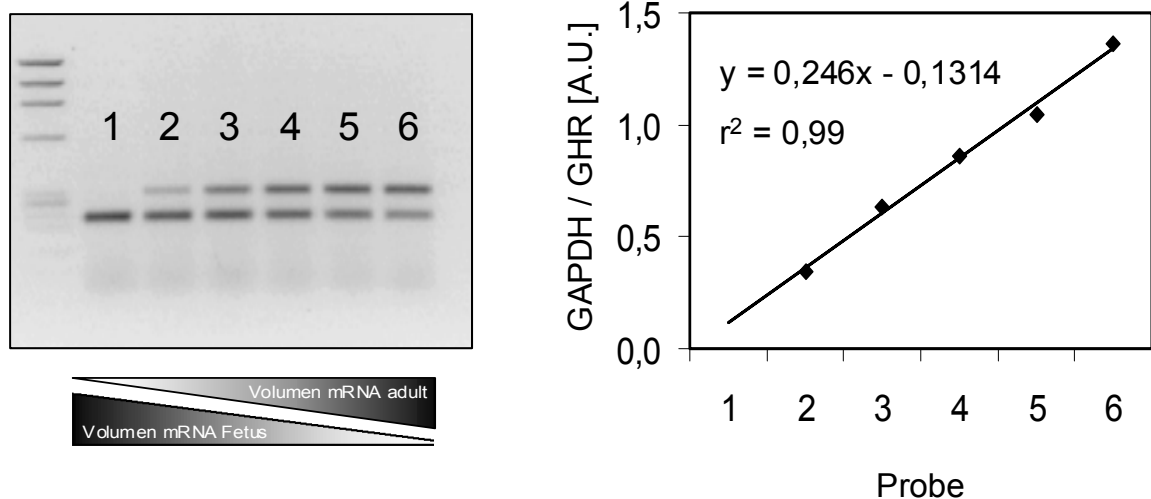


Abb. 15: Multiplex-PCR mit GAPDH- und GHR-genspezifischen Primern in einer Verdünnungsreihe der Gesamt-RNA nach NICOLETTI & SASSY-PRIGENT (1996)

Nur unter der ausschließlichen Verwendung der GHR-genspezifischen Primer war es möglich in der unverdünnten Leberprobe des Fetus eine Produktbande außerhalb des exponentiellen Bereichs der PCR zu beobachten (Abb. 16). Dieses Ergebnis weist auf große Unterschiede bei der Genexpression des GHR zwischen der Leber des Fetus und der Leber adulter Tiere hin. Die Differenzen ließen sich nicht linear darstellen.

Die Beobachtung der unterschiedlichen GAPDH-mRNA-Konzentration zwischen den zu untersuchenden RNA-Proben konnte mittels PCR unter der alleinigen Verwendung von GAPDH-Primern bestätigt werden ( $r^2 = 0,92$ ;  $P \leq 0,001$ ) (Abb. 16).

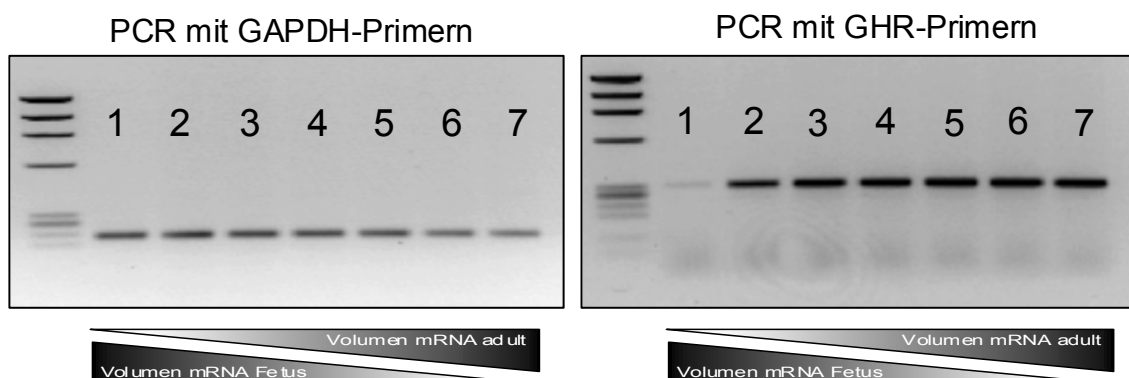


Abb. 16: PCR mit GAPDH- bzw. GHR-genspezifischen Primern in einer Verdünnungsreihe der Gesamt-RNA nach NICOLETTI & SASSY-PRIGENT (1996)

Der Quotient aus den erhaltenen Signaldichten ergab

$$[X]_A / [X]_B = 1,554$$

$[X]_A$  = PCR-Produkt fetale Leber  
 $[X]_B$  = PCR-Produkt adulte Leber

Somit beträgt die Differenz der GAPDH-mRNA-Konzentration zwischen der untersuchten fetalen- und der adulten Leber mehr als 55 %.

Beim Vergleich von Gesamt-RNA aus fetaler Niere mit adulter Leber ergaben sich Hinweise darauf, dass auch die renale Expression der GAPDH-mRNA beim Fetus deutlich höher ist als die Expression in der Leber adulter Tiere.

Auf Grund der Ergebnisse ist davon auszugehen, dass beim Schwein die GAPDH-mRNA entwicklungs- und gewebespezifisch reguliert wird. GAPDH ist somit als interne Kontrolle für Untersuchungen in Leber und Niere während der Ontogenese des Schweins nicht geeignet. Daraus resultierte, dass das entwickelte Protokoll der Multiplex-PCR für die Quantifizierung der porcinen GHR-mRNA während der pränatalen Ontogenese nicht angewendet werden konnte.

Der Einsatz der progressiven linearen Verdünnung der Gesamt-RNA nach NICOLETTI & SASSY-PRIGENT (1996) mit GAPDH als interne Kontrolle ist für den Vergleich der relativen GHR-Genexpression zwischen fetalen und postnatalen Altersgruppen ungeeignet. Im Weiteren ist der Probendurchsatz durch den Gebrauch der RNA-Verdünnungsreihe nur gering.

### 1.5.2. Ribonuclease Protection Assay

Die Einbauraten des radioaktiven Nukleotids [ $\alpha$ - $^{32}$ P] UTP betragen bei der Herstellung der cRNA-Sonden durch *in vitro* Transkription bis zu 36,4% (antisense GHR) und bis zu 63,9 % (antisense GAPDH). Unterschiedliche spezifische Aktivitäten der GAPDH-Sonde im Verhältnis zur GHR-Sonde wurden getestet. Eine Verringerung der spezifischen Aktivität der GAPDH-Sonde auf 1:25 im Verhältnis zur GHR-Sonde erwies sich hinsichtlich der notwendigen Sondenzugabe im Überschuss am sinnvollsten. Gleichzeitig ergab eine 1:200 Verdünnung des RNase-Mixes beim Verdau einzelsträngiger RNA-Fragmente die

besten Resultate. Auf Grund ihrer Größe konnte jeweils eine Bande der GHR-mRNA und der GAPDH-mRNA zugeordnet werden (Abb. 17). Signifikante Vorteile einer Gelaufreinigung der spezifischen Sonde nach PAGE wurden gegenüber der Aufreinigung mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) beim Nachweis der GHR-mRNA nicht beobachtet. Der Kit war der Ammoniumacetat / Ethanol fällung auf Grund der besseren Handhabung vorzuziehen.

Das Ziel, den RPA mit multiplen Sonden bei Verwendung des antisense GHR-cRNA Fragments mit GAPDH als interner Kontrolle durchzuführen, war unter Einhaltung eines linearen Zusammenhangs problematisch.

In der parallel durchgeführten Multiplex-PCR wurde bereits festgestellt, dass GAPDH als interne Kontrolle während der Ontogenese des porcinen Fetus nicht geeignet ist. Mit Hilfe dieser Methode wurde zugleich beobachtet, dass die GHR-Genexpression in der Leber des Schweinefetus auf sehr niedrigem Niveau stattfindet. Ein Nachweis der GHR-mRNA in der fetalen Leber mittels RPA erschien auf Grund der im Vergleich zur PCR viel geringeren Sensitivität zweifelhaft.

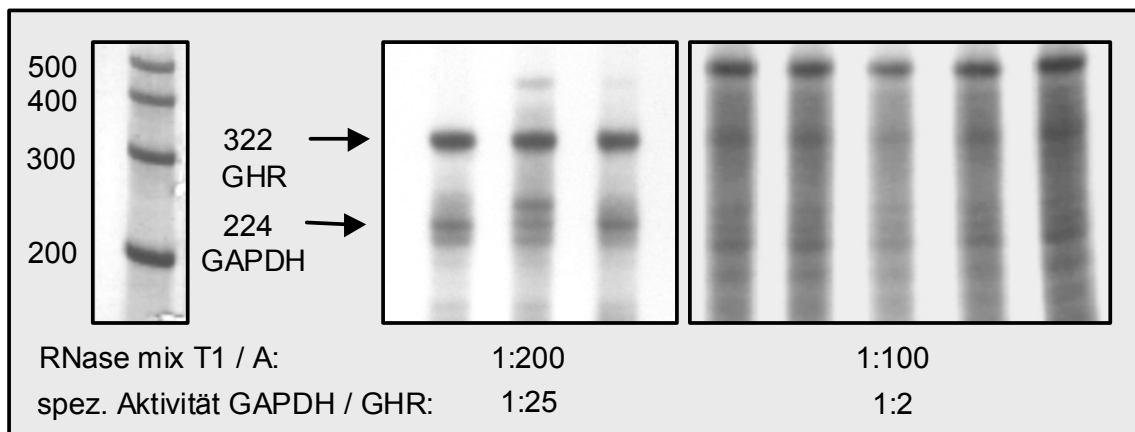


Abb. 17: Nachweis der GHR-mRNA und der GAPDH-mRNA mit Hilfe des Ribonuclease Protection Assay

### 1.5.3. Relative kompetitive PCR mit einem heterologen DNA-Standard

Unter Verwendung der progressiven RNA-Verdünnungsreihe nach NICOLETTI & SASSY-PRIGENT (1996) wurden große Konzentrationsunterschiede der GHR-mRNA zwischen den Altersgruppen beobachtet. Im weiteren wurde daher auf Grund des breiten dynamischen Bereichs die kompetitive PCR als Methode der Wahl zur relativen Bestimmung der GHR-Genexpression herangezogen.

Für die Etablierung des Testsystems war der Nachweis der parallelen Amplifikation des porcinen cDNA-Fragments des GHR mit dem DNA-Kompetitor notwendig. Die entsprechende Effizienzkurve unter Verwendung von renaler Gesamt-RNA ist in Abb. 18 dargestellt.

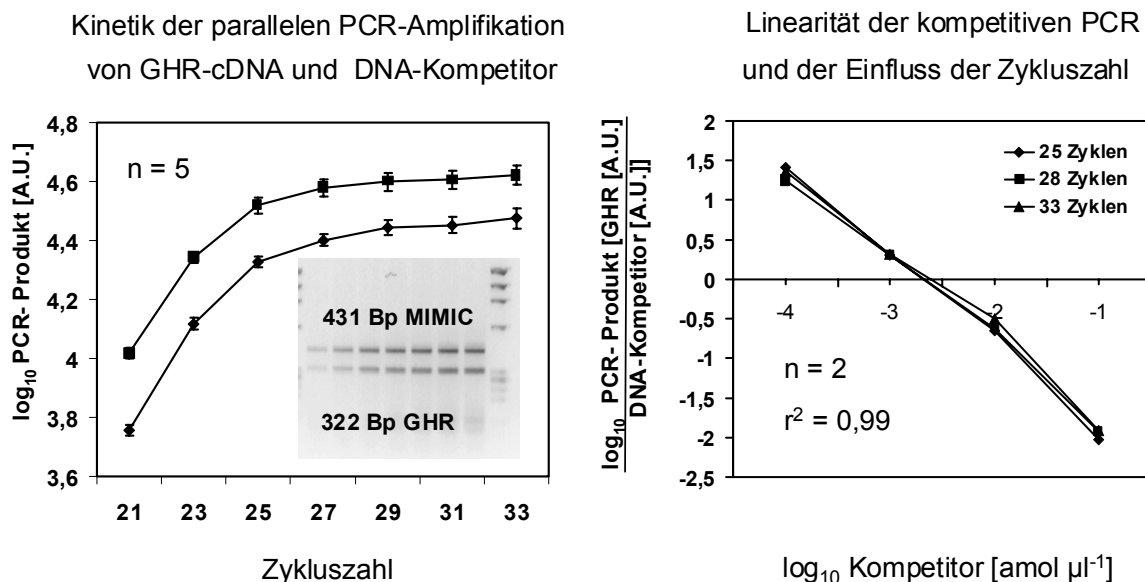


Abb. 18: Parallelität und Linearität der kompetitiven PCR mit einem DNA-Kompetitor ( $\pm$  SEM)

In Anlehnung an ZHANG & BURNE (1999) wurde die PCR mit unterschiedlichen Zykluszahlen durchgeführt. Nach der Bestimmung äquivalenter Signaldichten ( $\log_{10} [\text{GHR} / \text{GHR-Kompetitor}] = 0$ ) konnten nach 25, 28 und 33 PCR-Zyklen übereinstimmende Konzentrationen an GHR-mRNA ermittelt werden. Für diesen Test wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe des Kompetitors verwendet. Die reverse Transkription erfolgte im angeführten Beispiel mit Gesamt-RNA fetaler Leber (90 p.c.). Der Variationskoeffizient betrug 7,4 %. Das Ergebnis bestätigt im Rückschluss wie gefordert die parallele Amplifikation der GHR-cDNA mit dem DNA-Kompetitor (Abb. 18).

Der dynamische Bereich des Tests ermöglicht die Darstellung von bis 1000-fachen Unterschieden innerhalb eines Experiments. Messungen wurden mit Kompetitorverdünnungen von  $10 \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$  bis  $10^{-5} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$  durchgeführt.

Nach Vorversuchen wurde festgestellt, dass mit der gegebenen Bandbreite und Messempfindlichkeit des Systems alle Untersuchungsgruppen erfasst werden können.

Es wurden 1:10 und 1:2 Verdünnungsreihen des Kompetitors zur Beurteilung der Linearität des Systems herangezogen. Gleichzeitig wurde dabei die Stabilität des Tests beim Einsatz von unterschiedlichen Mengen an Gesamt-RNA (Abb. 19) und cDNA geprüft.

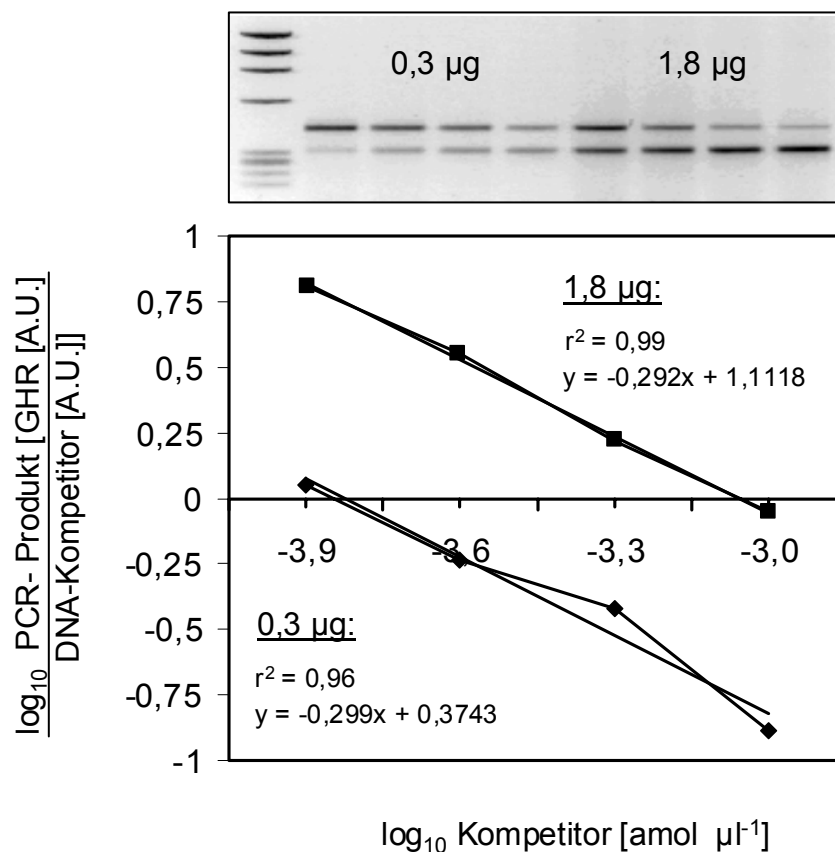


Abb. 19: Kompetitive PCR mit einer 1:2 Verdünnungsreihe des DNA-Kompetitors unter Verwendung von unterschiedlichen Massen an Gesamt-RNA in der reversen Transkription

Der variierende Einsatz von Gesamt-RNA in der reversen Transkription (0,3 µg vs. 1,8 µg Gesamt-RNA) ergab nach einer einzelnen Ermittlung eine Abweichung von 2,1 % vom theoretischen Wert. Nach einer 1:2 Verdünnung der cDNA war der Messwert 14,1 % niedriger als der Erwartungswert. Die Verdünnung von

cDNA bewirkte somit eine größere Abweichung vom erwarteten Ergebnis als der Einsatz unterschiedlicher Massen an Gesamt-RNA. Linearität und Parallelität der verdünnten Probe im Vergleich zur unverdünnten Probe konnte in einer 1:2 Verdünnungsreihe allerdings in beiden Fällen festgestellt werden.

#### 1.5.3.1 Ergebniskorrektur mit Hilfe der 18 S rRNA und Reproduzierbarkeit

Auf Grund des hohen Anteils der 18 S rRNA an der Gesamt-RNA konnte bereits nach 12 Zyklen ein spezifisches PCR-Produkt von 488 Bp beobachtet werden. Eine Linearität der PCR ( $r^2 = 0,99$ ) war bei einem exponentiellen Anstieg des spezifischen Signals zwischen den Zyklen 12 und 18 gegeben (Abb. 20).

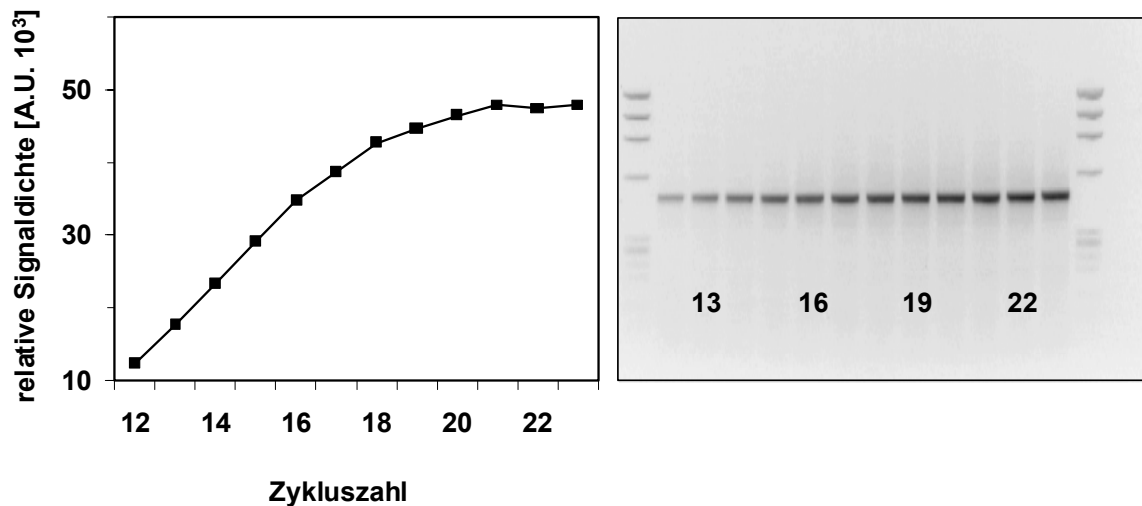


Abb. 20: Beispiel einer Effizienzkurve bei Amplifikation mit 18 S rRNA-genspezifischen Primern

Die 18 S rRNA-Genexpression wurde in unterschiedlichen fetalen Untersuchungsgruppen (30 p.c.; 50 p.c.; 70 p.c.) getrennt nach Geschlecht und Organ im Vergleich zur Leber von 180 Tage alten weiblichen Tieren geprüft und varianzanalytisch getestet. Es wurden in drei unabhängigen Experimenten drei verschiedene Probenpools an Gesamt-RNA jeder Gruppe untersucht. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede ( $P = 0,97$ ) zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abb. 21).



Auf Grund des vorliegenden Ergebnisses ist die 18 S rRNA-Genexpression als eine geeignete interne Kontrolle während der porcinen Ontogenese von Leber und Niere ab dem 30. Tag der Entwicklung anzusehen. Die 18 S rRNA ist somit eine gute Ladekontrolle, die auch den Abgleich der Effizienz der Reversen Transkription zwischen den einzelnen Proben während der Entwicklung der porcinen Leber und Niere ermöglicht.

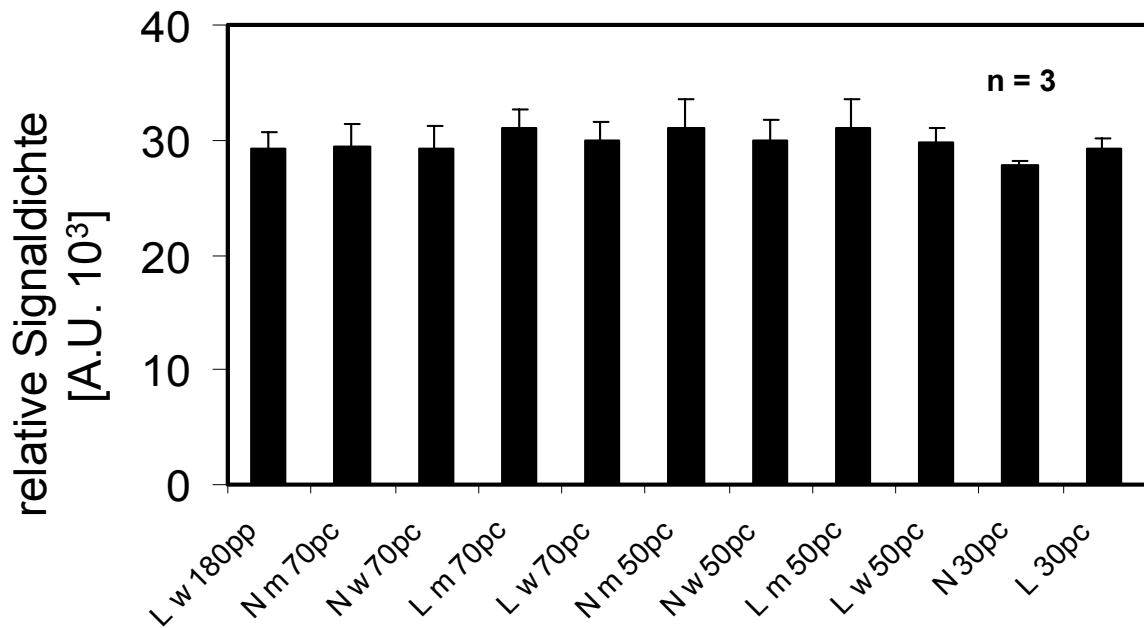


Abb. 21: 18 S rRNA-Genexpression in unterschiedlichen Untersuchungsgruppen; L: Leber; m: männlich; N: Niere; w: weiblich; Zahl: Alter in Tagen p.p. bzw. p.c. ( $\pm$  SEM)

Untersuchungen zur Wiederholbarkeit der relativen kompetitiven RT-PCR ergaben nach der Ergebniskorrektur mit Hilfe der 18 S rRNA-Genexpression einen Intraassay-Variationskoeffizienten von 7,6 % ( $n = 10$ ). Der Interassay-Variationskoeffizient lag bei 20,3 % ( $n = 16$ ).

In der Leber der Altersgruppen 30 p.c. - 70 p.c wurde eine im Vergleich zu den anderen Untersuchungsgruppen und im Verhältnis zur Niere sehr geringe GHR-Genexpression festgestellt. Auf Grund der besseren Darstellungs- und somit Auswertungsmöglichkeit der PCR-Produktbanden wurden die Leberproben dieser Gruppen mit 28 PCR-Zyklen analysiert. Alle übrigen Gruppen und Gewebe wurden mit 25 PCR-Zyklen untersucht.

## 2. Untersuchungen zur pränatalen Ontogenese der GHR-Genexpression

Die Analyse der Gesamt-RNA aus Leber und Niere erfolgte im Versuchsteil zur pränatalen Ontogenese der GHR-Genexpression bis zum Tag 90 p.c. in jeweils 3 - 6 unabhängigen Probenpools.

Entsprechend der Abb. 22 wurde beobachtet, dass die GHR-Genexpression in der Leber des porcinen Fetus bis zum Alter von 70 Tagen p.c. auf einem sehr niedrigen Niveau erfolgt.

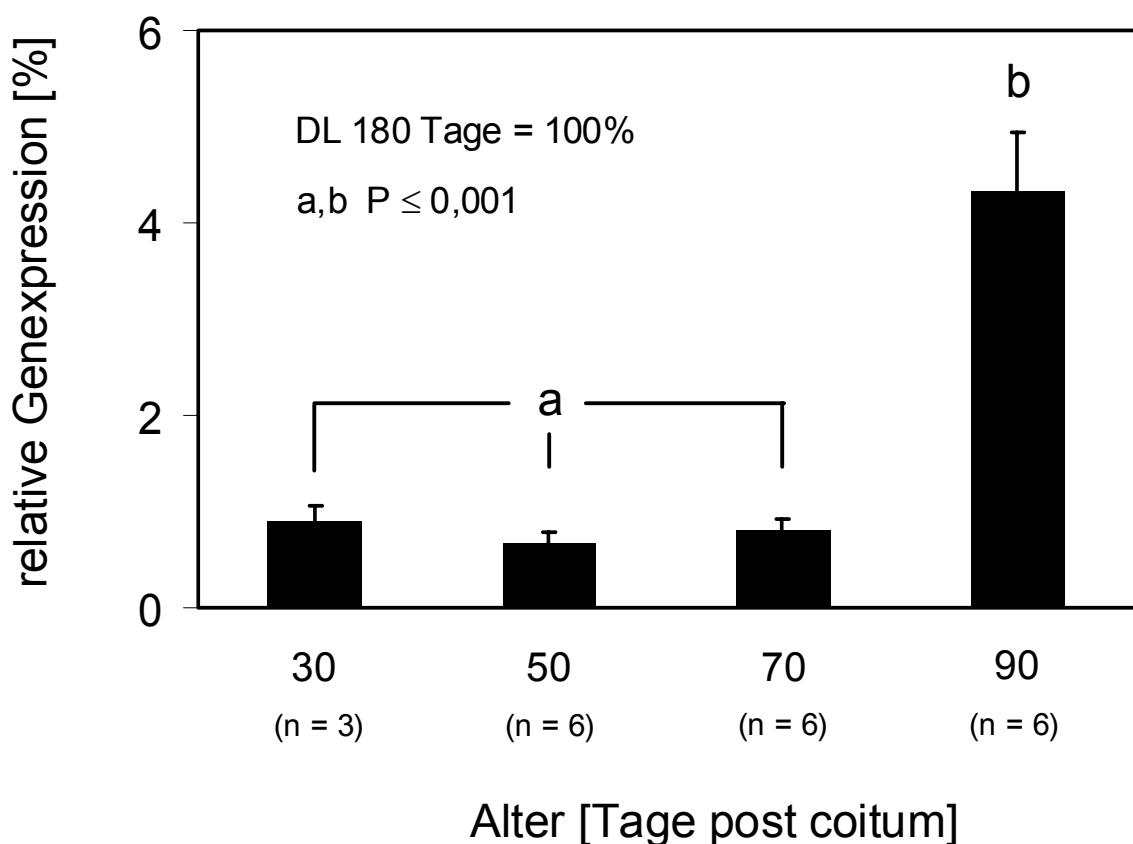


Abb. 22: Relative GHR-Genexpression in der Leber des porcinen Fetus im Vergleich zum 180 Tage alten weiblichen DL-Schwein = 100 % ( $\pm$  SEM)

In den einzelnen Untersuchungsgruppen betrug die Konzentration der GHR-mRNA  $0,596 \times 10^{-3} \pm 0,1 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$  (30 p.c.) bis  $0,528 \times 10^{-3} \pm 0,08 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$  (70 p.c.). Das entsprach weniger als 1 % von dem Wert, welcher in der Leber der 180 Tage alten weiblichen Tiere beobachtet und mit 100 % gleichgesetzt wurde ( $66,1 \times 10^{-3} \pm 0,2 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$ ). Prozentual ausgedrückt waren die GHR-mRNA-Konzentrationen bei 0,90 % (30 p.c.), 0,66 % (70 p.c.) und 0,79 % (70 p.c.) angesiedelt. Ein signifikanter Anstieg ( $P \leq 0,001$ ) der GHR-

Genexpression im Vergleich zur Gesamtheit der übrigen fetalen Altersgruppen wurde erstmals in der Altersgruppe 90 p.c. beobachtet. In dieser Gruppe lag die GHR-mRNA-Konzentration in Relation zu den 180 Tage alten weiblichen Tieren mit  $2,86 \times 10^{-3} \pm 0,4 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$  bei 4,3 %.

Die Feten unterschieden sich insgesamt signifikant von den 180 Tage alten weiblichen Tieren ( $P \leq 0,01$ ).

Wie der Abb. 23 zu entnehmen ist, war die GHR-Genexpression in der Niere des DL-Fetus im Vergleich zur Leber deutlich höher einzustufen. In der Niere der jüngsten Altersgruppe (30 p.c.) wurde eine GHR-mRNA Konzentration von  $26,2 \times 10^{-3} \pm 1,5 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$  gemessen. Dieser Wert betrug bereits 77 % von dem Betrag, der in der Niere der 180 Tage alten weiblichen Schweine beobachtet wurde.

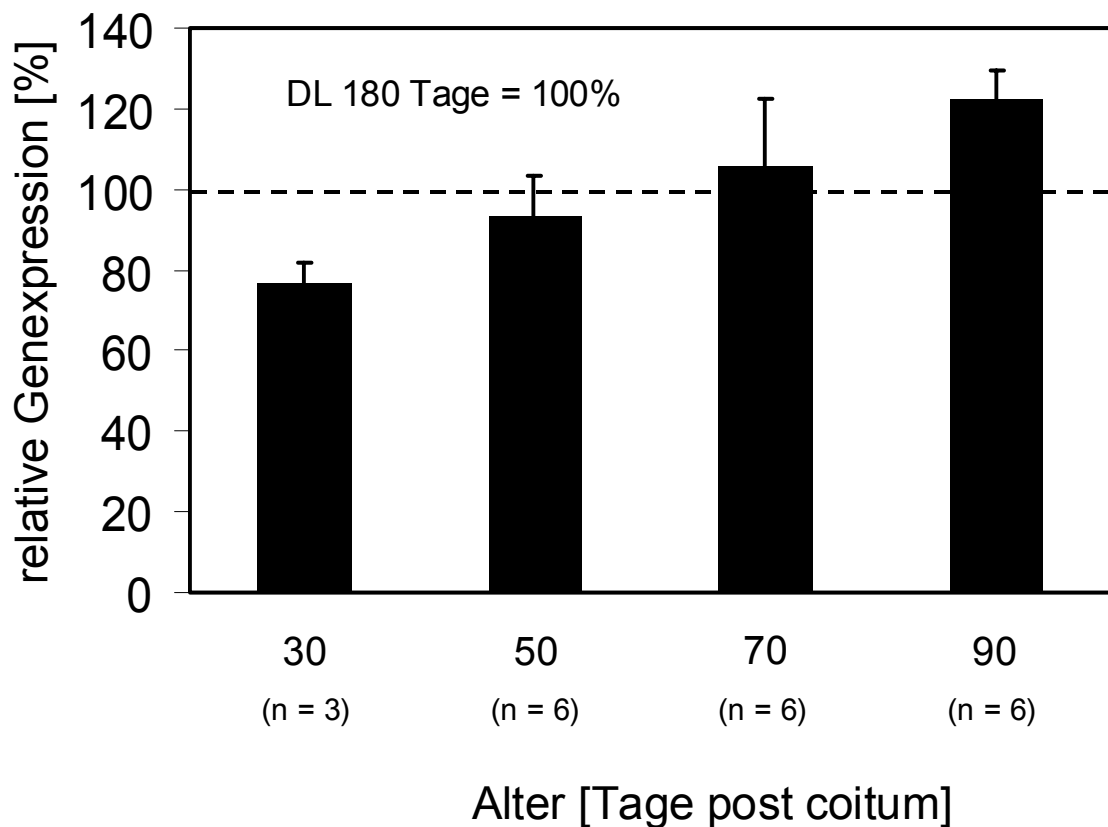


Abb. 23: Relative GHR-Genexpression in der Niere des porcinen Fetus im Vergleich zum 180 Tage alten weiblichen DL-Schwein = 100 % ( $\pm$  SEM)

Mit der Zunahme des Alters erfolgte bei den Feten ein kontinuierlicher Anstieg der GHR-Genexpression. In der Altersgruppe 70 p.c. (106 %) und 90 p.c. (122 %)

wurden Werte gemessen, welche die der 180 Tage alten Tiere ( $34,1 \times 10^{-3} \pm 3,0 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$ ) überstiegen. Der Anstieg der GHR-mRNA-Konzentration ließ sich zwischen den fetalen Untersuchungsgruppen nicht statistisch absichern ( $P = 0,127$ ).

Im zweiten Versuchsteil zur pränatalen Ontogenese der GHR-Genexpression wurde das Niveau der GHR-Genexpression zwischen den DL-Feten und den DL-PVDRI-Feten verglichen. Im Gegensatz zu den individuell analysierten Leberproben wurden die Nierenproben der 90 Tage alten DL-Feten in 8 und die der DL-PVDRI-Feten in 4 Gesamt-RNA Pools analysiert. Die Nierenproben der Feten einer DL-PVDRI-Sau (DL-PVDRI 3) wurden hingegen individuell untersucht.

Die GHR-mRNA-Konzentration in der Leber der untersuchten DL-Feten erwies sich im Mittel zur jeweiligen Sau homogen ( $2,83 \times 10^{-3} \pm 0,21 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$ ). Von diesem einheitlichen Expressionsmuster grundlegend abweichende Werte wurden in der Leber von Feten der Linie DL-PVDRI beobachtet (Abb. 24).

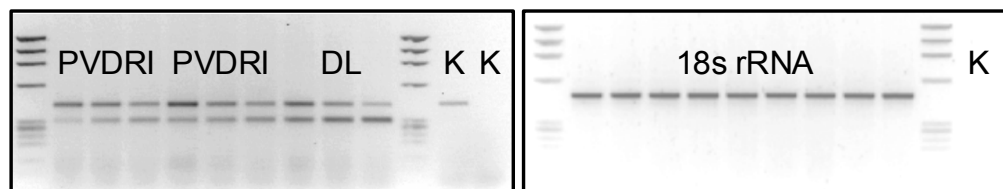
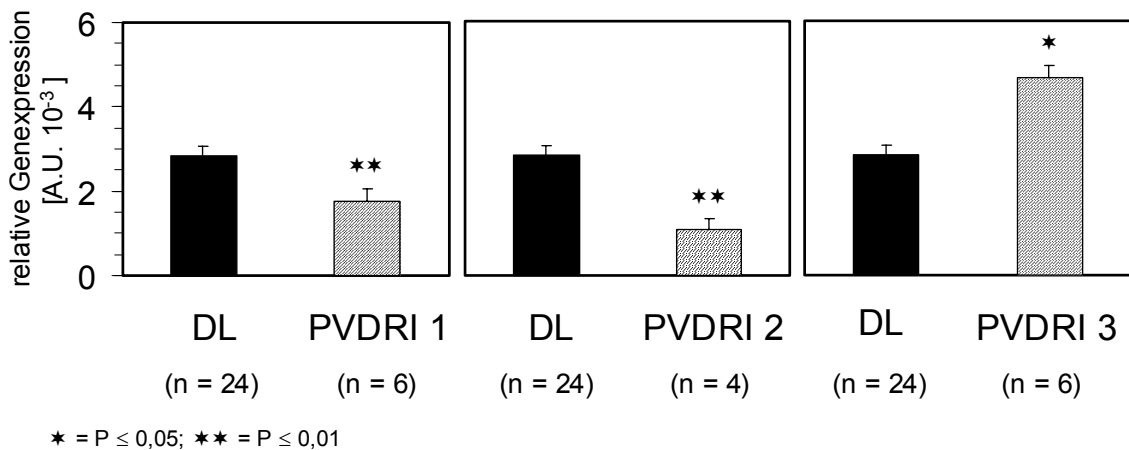


Abb. 24: GHR-Genexpression in der individuell analysierten Leber von DL-Feten im Vergleich zur individuell analysierten Leber von Feten einzelner Saue der Linie DL-PVDRI; K: Negativ-Kontrolle bzw. Kontrolle DNA-Kompetitor ( $\pm$  SEM)

Im Vergleich zu den DL-Feten wurde in der Leber der Feten, die von den DL-PVDRI-Sauen 1 und 2 abstammen signifikant niedrigere Werte festgestellt. In der Leber der Feten der Sau PVDRI 1 wurde eine GHR-mRNA-Konzentration von  $1,77 \times 10^{-3} \pm 0,26 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$  ( $p \leq 0,01$ ) gemessen. Die Lebern der Feten von der Sau PVDRI 2 wiesen eine Konzentration von  $1,08 \times 10^{-3} \pm 0,14 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$  ( $p \leq 0,002$ ) auf. Im Gegensatz dazu ergab die Bestimmung der GHR-Genexpression in den Lebern der Feten von der Sau DL-PVDRI 3 mit  $4,66 \times 10^{-3} \pm 0,26 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$  eine im Vergleich zur DL-Gruppe signifikant höhere GHR-mRNA-Konzentration ( $p \leq 0,05$ ).

Die GHR-Genexpression in der Niere unterschied sich mit  $44,1 \times 10^{-3} \pm 2,7 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$  bei den DL-Feten nicht signifikant von den Feten der DL-PVDRI-Sauen 1 und 2 ( $41,9 \times 10^{-3} \pm 3,2 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$ ) ( $P = 0,93$ ) (Abb. 25). Die GHR-mRNA-Konzentration der individuell analysierten Nierenproben der Feten von der Sau PVDRI 3 war hingegen mit  $63,9 \times 10^{-3} \pm 2,4 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$  signifikant höher einzuordnen als bei den DL-Feten ( $P \leq 0,01$ ).

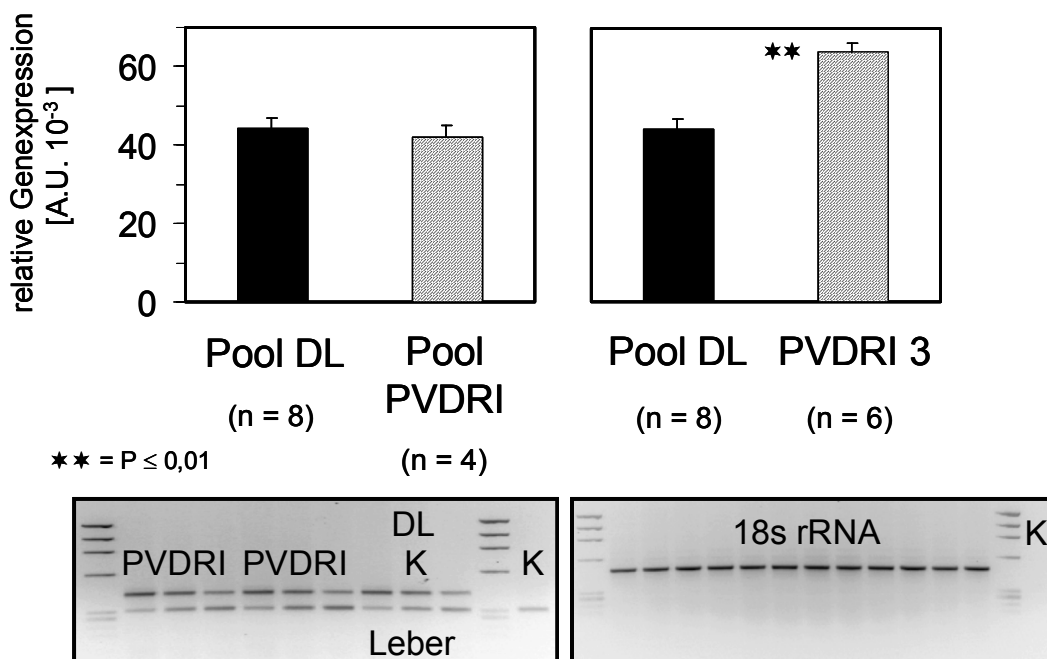


Abb. 25: GHR-Genexpression in der Niere von DL-Feten im Vergleich zu Feten der Linie DL-PVDRI; K: Kontrollprobe Leber, Negativ-Kontrolle bzw. Kontrolle cDNA ( $\pm$  SEM)

Somit ergaben sich in der Niere wie auch in der Leber bedeutende Unterschiede zwischen den Fetten der Sau PVDR1 3 und den übrigen Fetten der Linie DL-PVDRI. Zugleich war die GHR-Genexpression bei den Fetten der Sau PVDR1 3 signifikant stärker ausgeprägt als bei den DL-Feten.

### 3. Untersuchungen zur postnatalen Ontogenese der GHR-Genexpression

In der Leber von 42 Tage alten Ferkeln der Linien DL und DL-PVDRI wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen beobachtet ( $P = 0,96$ ). Die GHR-mRNA-Konzentration lag bei den DL-Ferkeln bei  $25,94 \times 10^{-3} \pm 2,1 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$  und bei den DL-PVDRI-Ferkeln bei  $25,75 \times 10^{-3} \pm 3,2 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$  (Abb. 26). Die GHR-mRNA-Konzentration in der Leber der DL-Ferkel (42 p.p.) betrug 39 % des GHR-mRNA-Wertes, der beim weiblichen Schwein (180 Tage) beobachtet wurde.

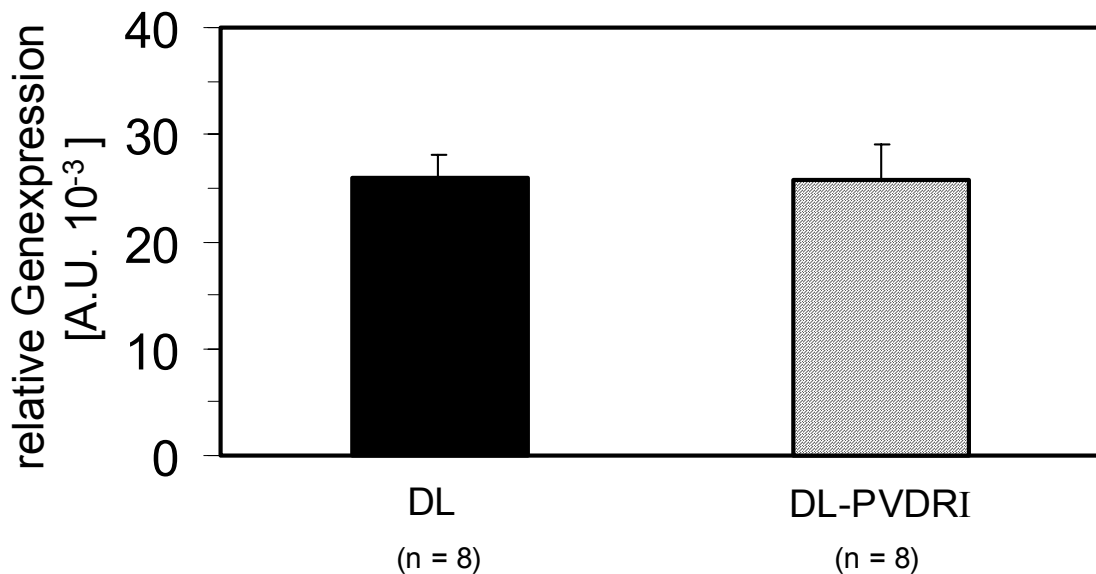


Abb. 26: GHR-Genexpression in der Leber von Ferkeln (42 p.p.) der Linien DL und DL-PVDRI ( $\pm$  SEM)

Im zweiten Versuchsteil wurde der postnatalen Ontogenese der GHR-Genexpression in der Leber und der Niere der Linien MINI und MINI-PVDRI nachgegangen.

Zwischen den Leberproben der beiden Untersuchungsgruppen wurden während der Entwicklung keine signifikanten Unterschiede der GHR-Genexpression beobachtet (Abb. 27).

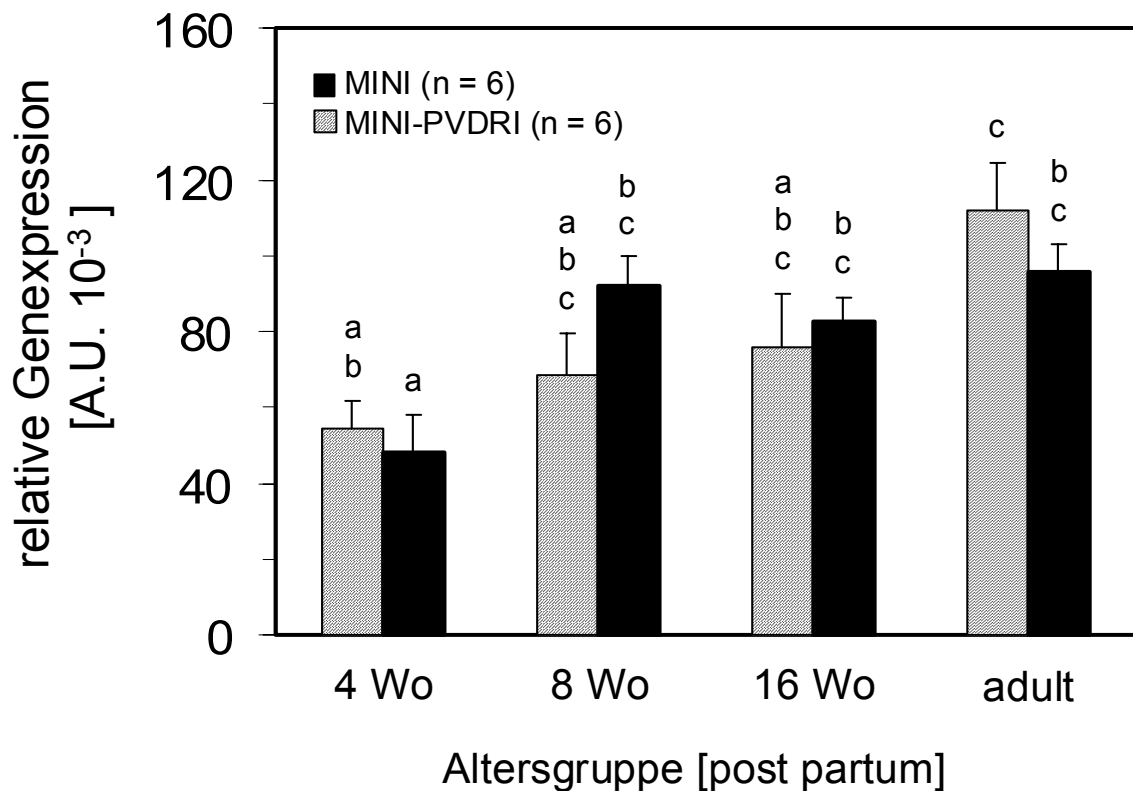


Abb. 27: Postnatale Ontogenese der GHR-Genexpression in der Leber von Schweinen der Linien MINI und MINI-PVDRI; Wo: Wochen (Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz; das Signifikanzniveau wird im Text angegeben) ( $\pm$  SEM)

Bei den Tieren der Linie MINI-PVDRI lag ein kontinuierlicher Anstieg der GHR-mRNA-Konzentration hin zum adulten Tier vor. Signifikant unterschied sich die GHR-Genexpression in dieser Linie zwischen den 4 Wochen alten ( $54,46 \times 10^{-3} \pm 7,4 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$ ) und den adulten Tieren ( $112,04 \times 10^{-3} \pm 12,5 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$ ) ( $P \leq 0,01$ ). Zwischen den 16 Wochen alten ( $75,76 \times 10^{-3} \pm 14,2 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$ ) und den adulten Tieren konnte der stärkste Anstieg der GHR-mRNA-Konzentration beobachtet werden.

Die Veränderung der GHR-mRNA-Konzentration während der postnatalen Ontogenese der MINI-Schweine unterschied sich grundlegend von der der MINI-PVDRI-Schweine. Es konnte im Gegensatz zur Entwicklung der MINI-PVDRI-Schweine ein starker Anstieg der GHR-Genexpression zwischen den 4 Wochen alten ( $48,09 \times 10^{-3} \pm 9,7 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$ ) und den 8 Wochen alten MINI-Schweinen ( $91,86 \times 10^{-3} \pm 7,7 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$ ) festgestellt werden ( $P \leq 0,01$ ). Das Niveau der GHR-mRNA-Konzentration war bei den 8 Wochen alten Tieren vergleichbar mit dem der adulten Tiere ( $95,54 \times 10^{-3} \pm 7,3 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$ ). Zugleich unterschieden sich die 4 Wochen alten MINI-Ferkel signifikant von den 16 Wochen alten ( $82,67 \times 10^{-3} \pm 6,1 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$ ) ( $P \leq 0,05$ ) und den adulten MINI-Schweinen ( $P \leq 0,01$ ).

Im Laufe der Entwicklung war bei beiden Miniaturschweinelinien eine Verdopplung des GHR-mRNA-Niveaus zu beobachten. Auf Grund des verzögerten Anstiegs der GHR-mRNA-Konzentration ist bei den MINI-PVDRI-Schweinen von einer verzögerten Entwicklung auszugehen.



Während der postnatalen Entwicklung konnten beim Vergleich der renalen GHR-Genexpression zwischen den Linien MINI und MINI-PVDRI keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Mit der Zunahme des Alters lagen auch innerhalb einer Linie keine signifikanten Differenzen vor (Abb. 28). Die GHR-mRNA-Konzentration war während der Entwicklung bei beiden Linien auf einem konstanten Niveau angesiedelt. Sie unterschied sich nur unbedeutend von den Werten, die bei den adulten Tieren der Linien MINI und MINI-PVDRI beobachtet wurden ( $29,44 \times 10^{-3} \pm 4,1 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$  vs.  $33,93 \times 10^{-3} \pm 2,7 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$ ). Auffällig war, dass in der Altersgruppe 16 Wochen bei den Tieren beider Linien (MINI:  $27,14 \times 10^{-3} \pm 4,0 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$ ; MINI-PVDRI:  $25,21 \times 10^{-3} \pm 2,7 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$ ) die GHR-Genexpression auf dem niedrigsten Niveau erfolgte.

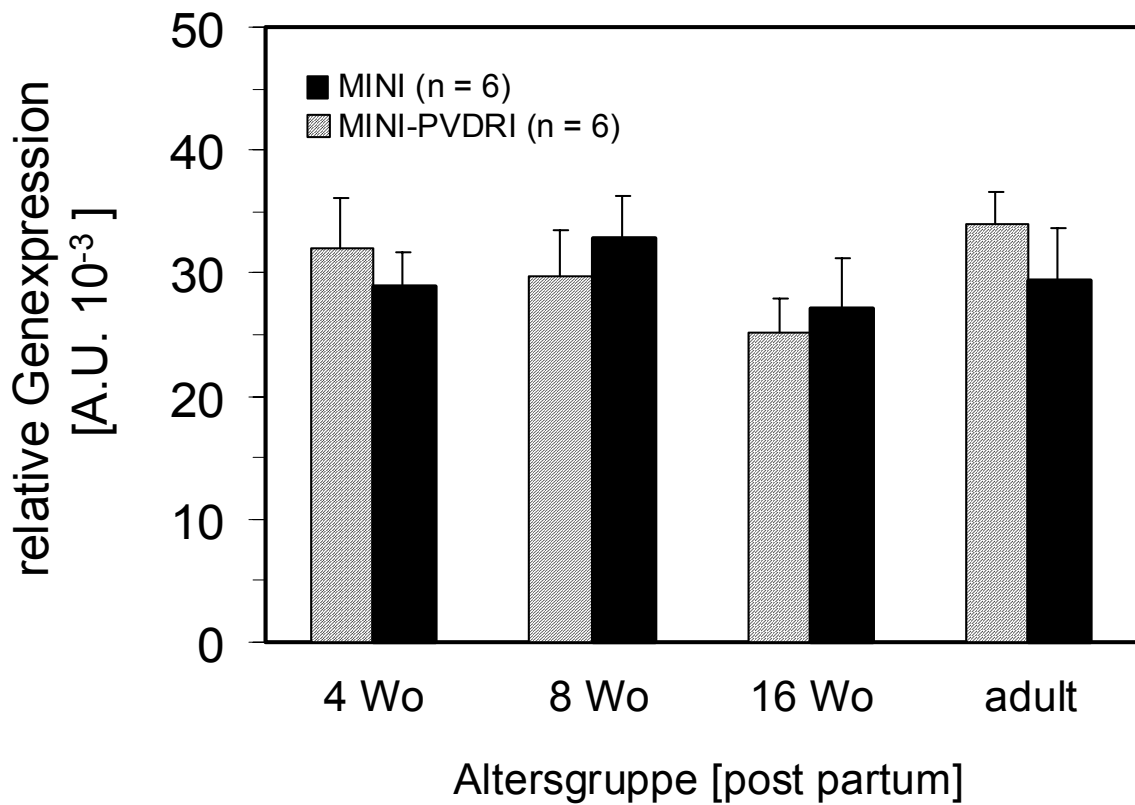


Abb. 28: Postnatale Ontogenese der GHR-Genexpression in der Niere von Schweinen der Linien MINI und MINI-PVDRI; Wo: Wochen ( $\pm$  SEM)

#### 4. Vergleich der GHR-Genexpression zwischen Miniatur- und DL-Schweinen

Vergleichende Betrachtungen zur GHR-Genexpression zwischen den Miniaturschweinen beider Linien und den DL-Schweinen der jeweils ältesten Gruppe ergaben eine signifikant höhere GHR-mRNA-Konzentration in der Leber der Miniaturschweine ( $P \leq 0,05$ ). Die GHR-Genexpression in der Leber der DL-Schweine lag mit  $66,1 \times 10^{-3} \pm 0,2 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$  auf einem Niveau von nur 64 % im Vergleich zu dem der Miniaturschweine. Das Niveau der GHR-mRNA-Konzentration in der Leber der 8 Wochen alten Miniaturschweine war mit  $80,2 \times 10^{-3} \pm 0,7 \times 10^{-3}$  bereits höher als bei den 180 Tage alten weiblichen DL-Schweinen ( $P = 0,43$ ). Wie dem Kap. V.3. zu entnehmen ist, unterschieden sich die Miniaturschweine beider Linien nicht signifikant voneinander und gingen daher als eine Gruppe in diese Bewertung ein. In der Leber der 4 Wochen alten MINI-Ferkel betrug die GHR-Genexpression  $48,1 \times 10^{-3} \pm 9,7 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$ . Sie lag damit bereits auf einem annähernd doppelt so hohem Level wie in der Leber der 6 Wochen alten DL-Ferkel ( $25,9 \times 10^{-3} \pm 2,1 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$ ) ( $P \leq 0,05$ ).

Die GHR-Genexpression in der Niere der jeweils ältesten Untersuchungsgruppe erfolgte hingegen mit  $34,1 \times 10^{-3} \pm 3,0 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$  beim DL-Schwein und mit  $31,6 \times 10^{-3} \pm 2,4 \times 10^{-3} \text{ amol } \mu\text{l}^{-1}$  bei den Miniaturschweinen auf einem annähernd gleichen Niveau.

Der Vergleich der Quotienten der GHR-Genexpression in Leber und Niere der jeweils ältesten Gruppe ergab bei den DL-Schweinen ein Wert von 1,91. Bei den Miniaturschweinen lag der Quotient bei 3,50. Die gewebespezifischen Unterschiede der GHR-Genexpression waren bei Miniaturschweinen in der Tendenz ( $P = 0,65$ ) stärker ausgeprägt als bei den gegenübergestellten weiblichen DL-Schweinen.

## 5. GH-Plasmakonzentration

### 5.1. GH-Plasmakonzentration bei Feten der Linien DL und DL-PVDRI

Signifikante Unterschiede der GH-Plasmakonzentration zwischen den untersuchten Feten der Linien DL und DL-PVDRI lagen nicht vor. Analysiert wurden im Fall der DL-PVDRI Feten 14 Blutprofile von 4 Feten sowie 8 Profile von 3 Feten der Linie DL. Bei den DL-Feten lag die mittlere GH-Plasmakonzentration bei  $66,83 \pm 4,14 \text{ ng ml}^{-1}$  und bei den DL-PVDRI-Feten wurde eine mittlere GH-Plasmakonzentration von  $73,46 \pm 2,85 \text{ ng ml}^{-1}$  beobachtet.

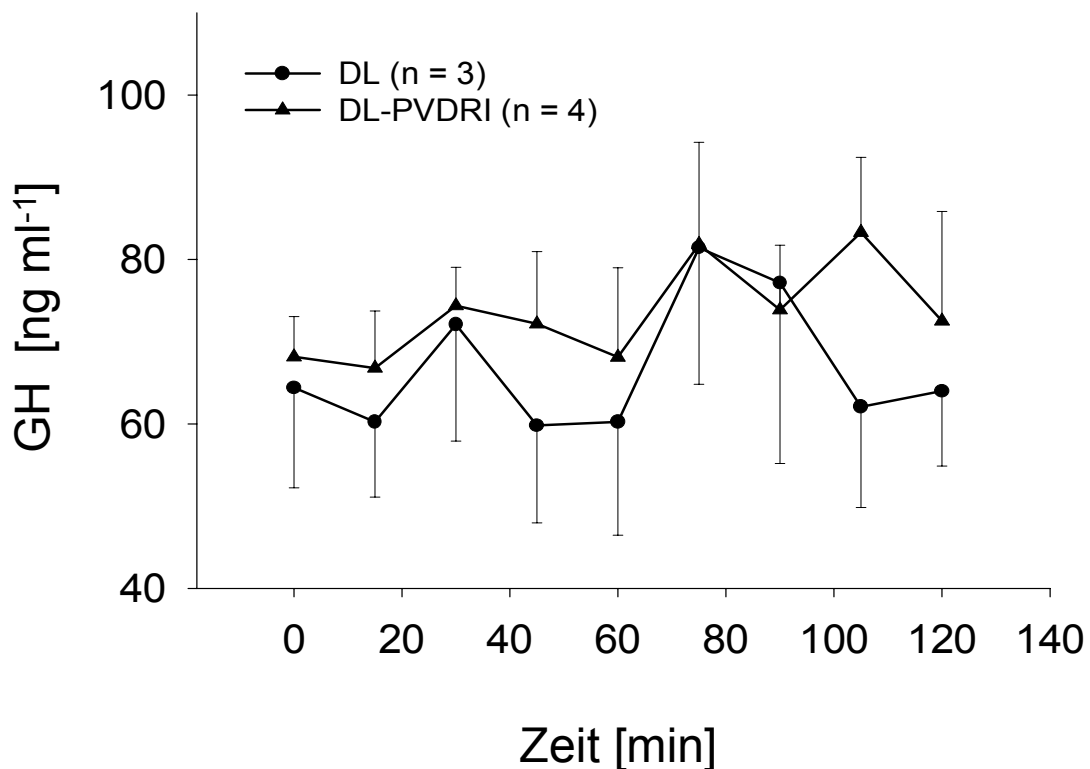


Abb. 29: GH-Konzentration im Plasma von Feten der Linien DL und DL-PVDRI ( $\pm$  SEM)

## 5.2. GH-Plasmakonzentration bei Ferkeln der Linien DL und DL-PVDRI

Wie aus der Abb. 30 hervorgeht, unterschied sich die GH-Konzentration im Plasma der DL- und DL-PVDRI-Ferkel im Beobachtungszeitraum signifikant voneinander. Die GH-Plasmakonzentration war bei den DL-PVDRI-Ferkeln mit  $30,5 \pm 1,8 \text{ ng ml}^{-1}$  höher als bei den DL-Ferkeln mit  $17,6 \pm 1,2 \text{ ng ml}^{-1}$  ( $P \leq 0,01$ ). Eine Interaktion von Zeit und Linie konnte nicht nachgewiesen werden.

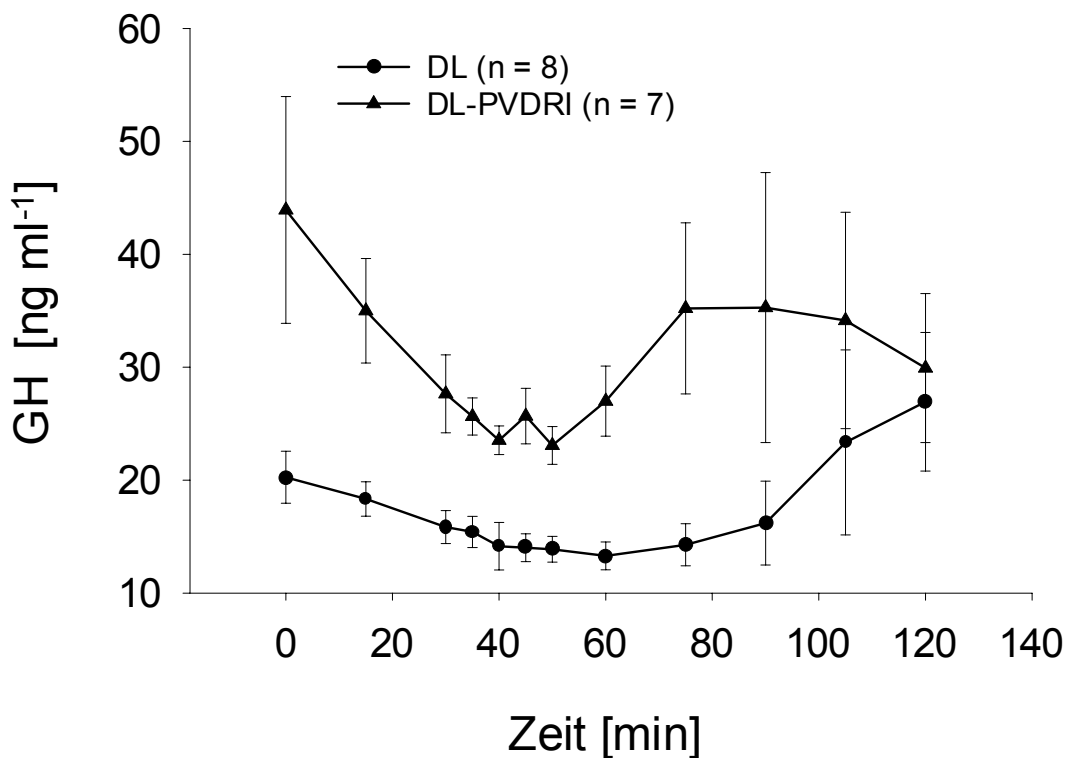


Abb. 30: GH-Konzentration im Plasma von Ferkeln der Linien DL und DL-PVDRI ( $\pm$  SEM)

### 5.3. Stimulation der GH-Sekretion bei DL-PVDRI Ferkeln mit GRF und SRIF

Die Stimulation der GH-Sekretion mit GRF ergab einen signifikanten Anstieg der GH-Plasmakonzentration im Vergleich zur Kontrollblutentnahme ( $P \leq 0,05$ ). Auffällig war ein Einbruch der GH-Sekretion nach der Stimulation mit GRF zum Zeitpunkt  $t_{20}$  (Abb. 31). Die Behandlung mit SRIF bewirkte im Vergleich zur Kontrollblutentnahme keinen Effekt auf die GH-Plasmakonzentration. Ein Anstieg der GH-Sekretion ab dem Zeitpunkt  $t_{60}$  nach der Behandlung mit SRIF war auf die sehr starke Zunahme der GH-Sekretion bei nur einem einzelnen männlichen Tier zurückzuführen. Dieser Anstieg ließ sich daher nicht statistisch absichern. Ein weibliches Tier reagierte auf die Behandlung mit SRIF vom Zeitpunkt  $t_{20}$  bis zum Zeitpunkt  $t_{60}$  mit einer deutlichen Zunahme der GH-Sekretion. Diese steigerte sich bis auf maximal 237 % im Vergleich zur Vorperiode (100 %), um dann wieder abzufallen.

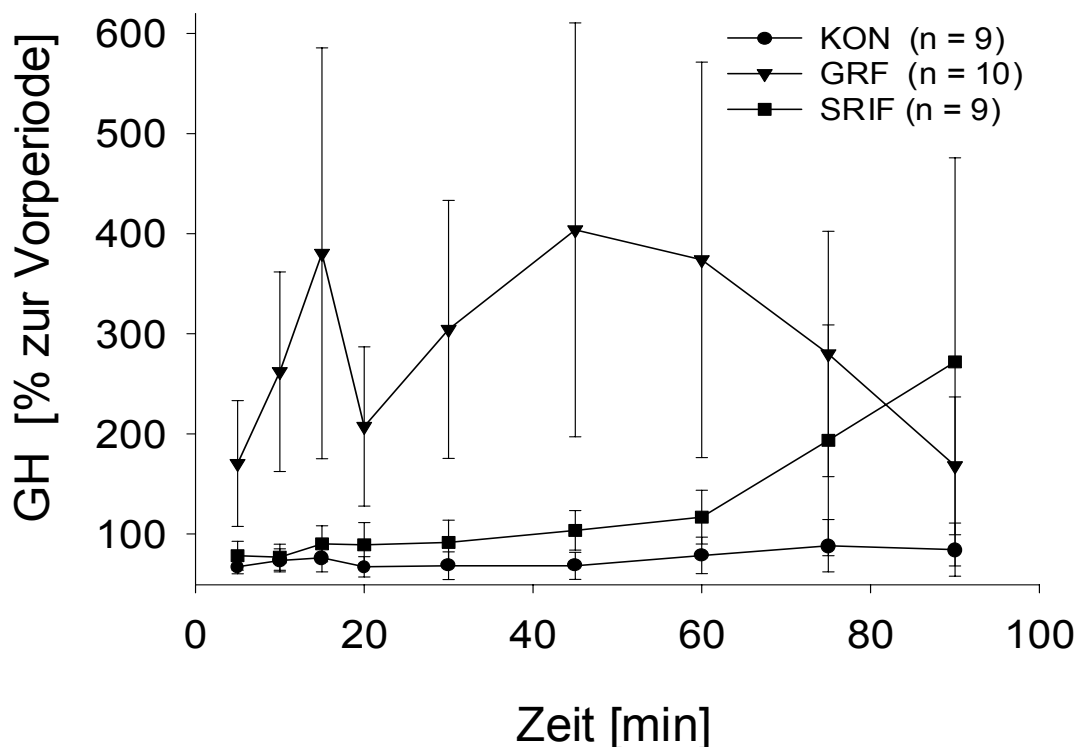


Abb. 31: GH-Konzentration im Plasma von Ferkeln der Linie DL-PVDRI nach der Stimulation mit GRF und SRIF im prozentualen Vergleich zur Vorbehandlungsperiode (100 %); GRF - KON:  $P \leq 0,05$  ( $\pm$  SEM)

## 6. Gewichtsentwicklung und RNA-Konzentration

### 6.1. Gewichtsentwicklung und Gesamt-RNA während der pränatalen Ontogenese

Das Gewicht während der Ontogenese des DL-Fetus nahm im Untersuchungszeitraum von  $1,87 \pm 0,06$  g bei der Altersgruppe 30 p.c. auf  $576,25 \pm 20,5$  g bei der Altersgruppe 90 p.c. zu.

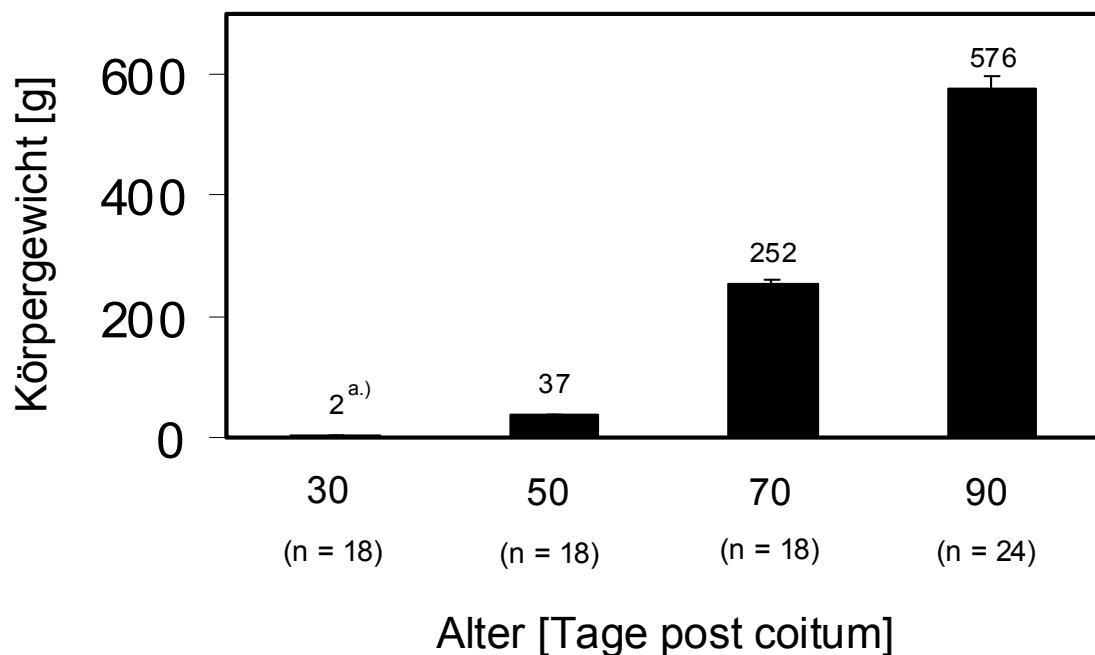


Abb. 32: Gewichtsentwicklung der untersuchten DL-Feten; a.) = Körpergewicht [g] ( $\pm$  SEM)

Beim Vergleich des Körpergewichts der 90 Tage alten Feten wurde festgestellt, dass sie mit  $576,25 \pm 20,5$  g signifikant schwerer waren als die Feten der Linie DL-PVDRI ( $510,62 \pm 14,5$  g) ( $P \leq 0,05$ ).

Obwohl die Feten der Sau DL-PVDRI 3 im Vergleich zu den anderen Feten der Linie DL-PVDRI eine viel höhere GHR-mRNA-Konzentrationen in der Leber und in der Niere aufwiesen, entsprach das Körpergewicht mit  $510 \pm 20,5$  g dem Gruppenmittel.

Wie auch das Körpergewicht war das Nierengewicht der DL-Feten mit  $2,40 \pm 0,1$  g signifikant höher ( $P \leq 0,05$ ) als bei den DL-PVDRI-Feten

( $2,01 \pm 0,08$  g). Gleichzeitig übertraf die renale GHR-Genexpression der DL-Feten die GHR-mRNA-Konzentration in der Niere der Linie DL-PVDRI (Feten der Sauen DL-PVDRI 1 u. 2) nur um 5,07 %.

Wie dem Kapitel V.2. zu entnehmen ist, wiesen die Feten der Sau DL-PVDRI 3 im Vergleich zu den übrigen DL-PVDRI-Feten eine erhöhte GHR-Genexpression in der Niere auf. Es wurden jedoch mit  $2,02 \pm 0,08$  g keine Unterschiede beim Nierengewicht zwischen diesen Feten und den übrigen Feten der Linie DL-PVDRI ( $2,04 \pm 0,11$  g) beobachtet .

Eine Korrelation zwischen dem Körpergewicht und der GHR-mRNA-Konzentration in der Leber konnte weder bei den Feten der Linie DL ( $r = -0,290$ ,  $P = 0,17$ ) noch bei den Feten der Linie DL-PVDRI ( $r = 0,0362$ ,  $P = 0,89$ ) festgestellt werden.

Wie der Abb. 33 zu entnehmen ist, war die Menge der aus der Leber von DL-Feten extrahierten Gesamt-RNA mit  $3,69 \pm 0,1$  mg g Gewebe<sup>-1</sup> signifikant größer ( $P \leq 0,01$ ) als die, welche aus der Leber von DL-PVDRI-Feten gewonnen wurde ( $2,99 \pm 0,2$  mg / g Gewebe).

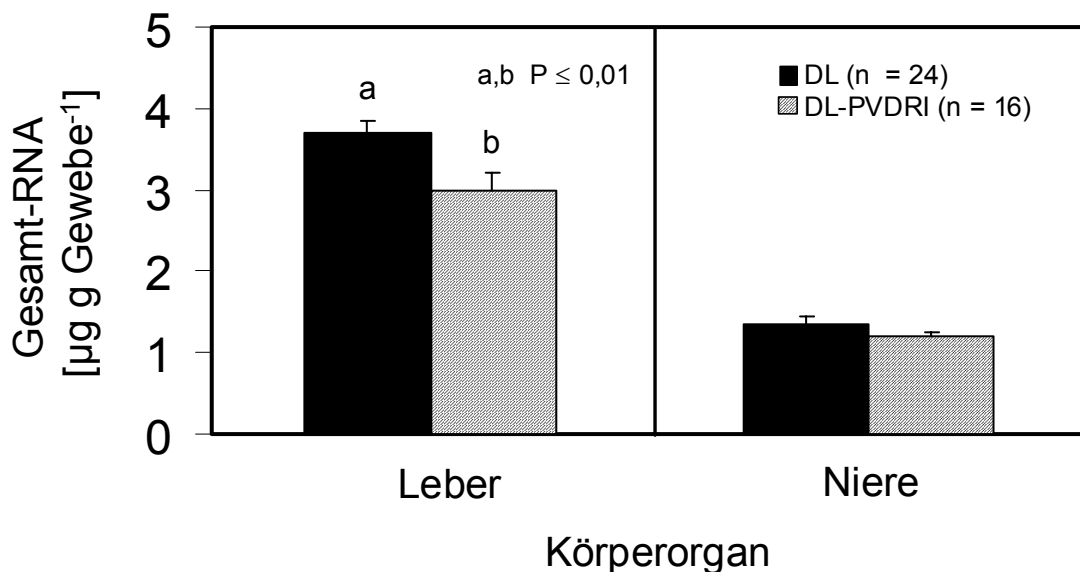


Abb. 33: Gesamt-RNA in der Leber und Niere von Feten der Linien DL und DL-PVDRI ( $\pm$  SEM)

Die Gesamt-RNA Konzentration in der Niere wies hingegen keine signifikanten Abweichungen zwischen den Feten der beiden Linien auf (DL:  $1,35 \pm 0,09$  mg / g Gewebe vs. DL-PVDRI:  $1,20 \pm 0,06$  mg / g Gewebe).

## 6.2. Gewichtsentwicklung und Gesamt-RNA während der postnatalen Ontogenese

### 6.2.1. Vergleichende Gewichtsentwicklung von Ferkeln der Linien DL und DL-PVDRI

Wie aus der Abb. 34 hervorgeht, unterschieden sich die auf GH untersuchten und verglichenen Ferkel beider Linien in ihrem Körpergewicht signifikant ( $p \leq 0,001$ ). Dabei waren die DL-Ferkel durchgehend schwerer als die DL-PVDRI-Ferkel. Es lag eine signifikant unterschiedliche Interaktion zwischen dem Alter und der Gewichtsentwicklung bei den Tieren beider Linien vor ( $P \leq 0,05$ ).

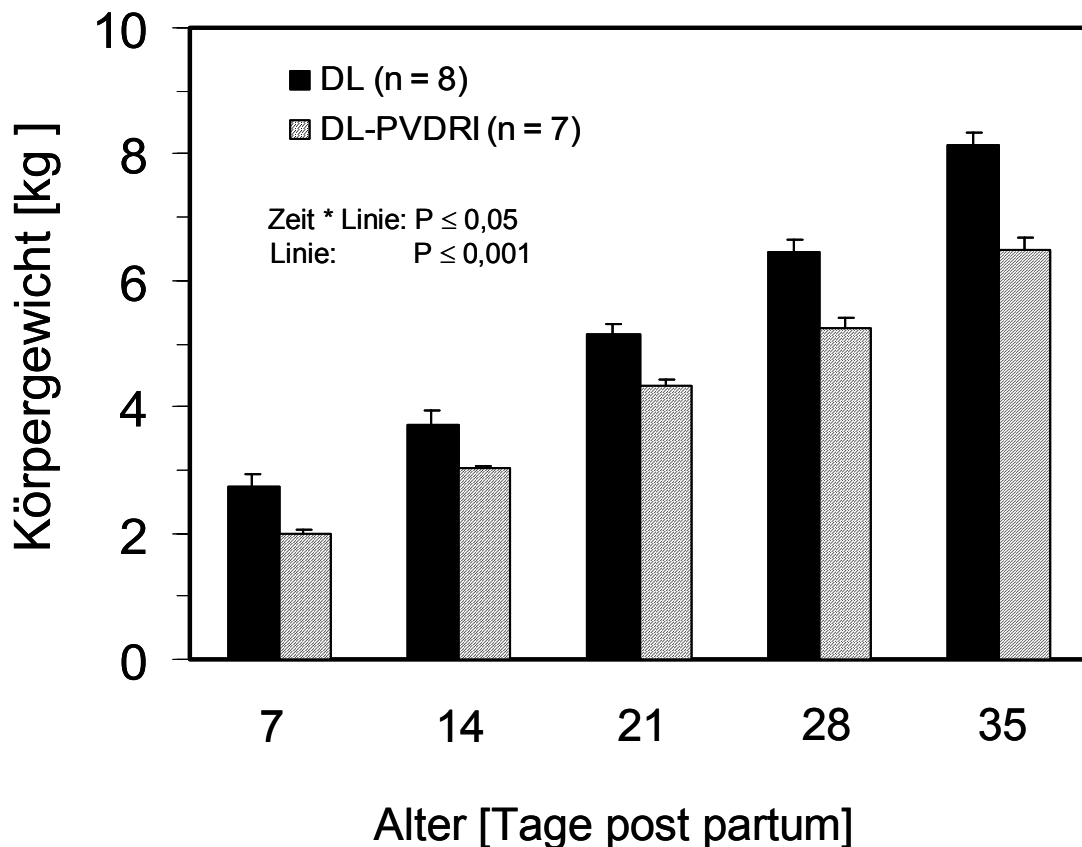


Abb. 34: Gewichtsentwicklung von Ferkeln der Linien DL und DL-PVDRI zwischen dem 7. und 35. Lebenstag ( $\pm$  SEM)



### **6.2.2. Körpergewicht und Gesamt-RNA bei 42 Tage alten Ferkeln der Linien DL und DL-PVDRI**

Auch im Alter von 42 Tagen wiesen die DL-Ferkel mit  $10,35 \pm 0,4$  kg signifikant mehr Gewicht auf ( $P \leq 0,001$ ) als die Ferkel der Linie DL-PVDRI ( $7,71 \pm 0,3$  kg). Eine signifikante Korrelation zwischen dem Körpergewicht und der GHR-mRNA-Konzentration in der Leber konnte weder bei den DL-Ferkeln ( $r = -0,603$ ) noch bei den DL-PVDRI-Ferkeln ( $r = 0,012$ ) beobachtet werden. Auffällig war die nicht signifikante ( $P = 0,11$ ) negative Beziehung zwischen dem Körpergewicht und der GHR-Genexpression bei den DL-Ferkeln. Diese war auf die Ferkel einer DL-Sau zurückzuführen, welche ein geringeres Körpergewicht bei einer höheren GHR-mRNA-Konzentration aufwies.

Die Menge der aus der Leber der untersuchten Ferkel beider Linien extrahierte Gesamt-RNA unterschied sich nicht signifikant. Die Menge der Gesamt-RNA in der Leber war bei den Tieren der Linie DL mit  $2,33 \pm 0,3$   $\mu\text{g} / \text{g}$  Gewebe allerdings geringer als bei den Ferkeln der Linie DL-PVDRI ( $2,93 \pm 0,3$   $\mu\text{g} / \text{g}$  Gewebe).

### **6.2.3. Gewichtsentwicklung und Gesamt-RNA beim Miniaturschwein**

Signifikante Unterschiede bei der Gewichtsentwicklung zwischen den Tieren der Linie MINI und MINI-PVDRI konnten nicht beobachtet werden. Die untersuchten 4 Wochen alten MINI-PVDRI-Ferkel waren mit  $3,9 \pm 0,4$  kg allerdings schwerer als die MINI-Ferkel ( $2,8 \pm 0,1$  kg). Die Gewichtsunterschiede zwischen den adulten Tieren beider Linien waren vermutlich auf die heterogene Altersstruktur dieser Gruppe zurückzuführen. Dabei waren die auch für die Reproduktion verwendeten Schweine der Gruppe MINI-PVDRI mit 399 Tagen deutlich älter als die Tiere der Gruppe MINI mit 235 Tagen (Abb. 35). Während der postnatalen Entwicklung konnten weder in der Niere noch in der Leber signifikante Unterschiede der Gesamt-RNA Konzentration zwischen den Linien MINI und MINI-PVDRI festgestellt werden. Auch zwischen den Altersgruppen einer Linie lagen keine signifikanten Unterschiede vor.

Interessanterweise war in der Niere der Altersgruppen 8 Wochen und 16 Wochen bei den Schweinen der Linie MINI-PVDRI eine deutlich höhere Variabilität der Gesamt-RNA-Konzentration gegeben. Die Abweichungen zwischen den Tieren waren in der Niere der übrigen Altersgruppen und bei den Schweinen der Linie

MINI geringer. Gleichzeitig wurde aus der Niere dieser Altersgruppen im Vergleich zu den Tieren der Linie DL mehr Gesamt-RNA extrahiert.

Auffällig war, dass die Tiere der MINI-Linie über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg in der Leber mehr Gesamt-RNA aufwiesen als die MINI-PVDRI-Schweine. Da keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen vorlagen, wurden die Werte einer jeden Linie im Folgenden vereinigt betrachtet. Die mittlere Gesamt-RNA Konzentration in der Leber betrug ohne Berücksichtigung des Alters bei den Tieren der Linie MINI  $3,26 \pm 0,1$  mg / g Gewebe und bei den Tieren der Linie MINI-PVDRI  $2,70 \pm 0,1$  mg / g Gewebe ( $P \leq 0,05$ ). In der Niere der Linie MINI lag die mittlere Gesamt-RNA Konzentration bei  $1,32 \pm 0,2$  mg / g Gewebe und in der Niere der Linie MINI-PVDRI bei  $1,56 \pm 0,2$  mg / g Gewebe ( $P = 0,68$ ).

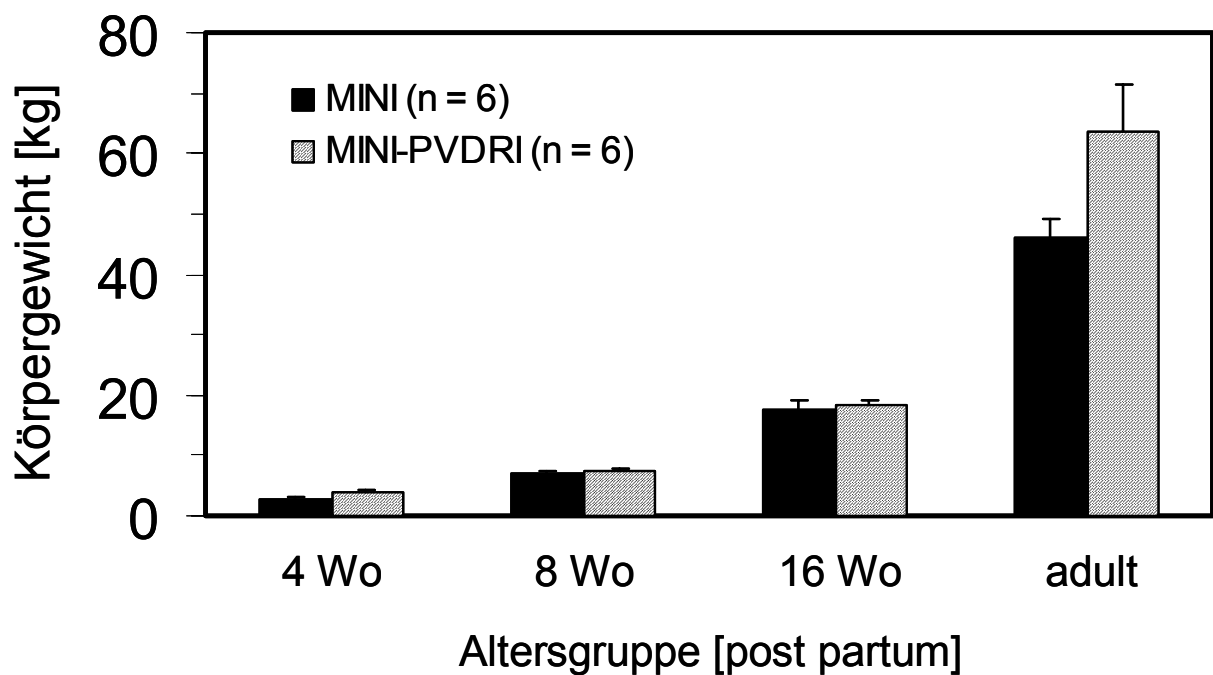


Abb. 35: Vergleich der postnatalen Gewichtsentwicklung von MINI- und MINI-PVDRI-Schweinen; Wo: Wochen ( $\pm$  SEM)

## **VI. Diskussion**

### **1. Material und Methoden**

#### **1.1. Reverse Transkription und PCR**

Die reverse Transkription wurde in der vorliegenden Studie mit Random-Hexamer-Primern durchgeführt. Diese Form des Priming ermöglichte, wie auch die Verwendung von Oligo (dT)-Primern (NOONAN et al., 1990), den Nachweis unterschiedlicher mRNA's aus einer Gesamt-RNA-Probe. Zugleich konnte die 18 S rRNA als Ladekontrolle bzw. zur Kontrolle der cDNA-Syntheseeffizienz herangezogen werden.

Die PCR wurde in der vorliegenden Studie im Gegensatz zum „Hotstart“ nach CHOU et al. (1992) mit einem „vereinfachten Hot Start“ durchgeführt (Qiagen PCR Handbook, 1996, modifiziert). Primer-Dimere und unspezifische PCR-Produkte, welche auf die gewählte Methode zurückzuführen waren, wurden nicht beobachtet. Ein negativer Effekt auf die Ausbeute an dem spezifischen PCR-Produkt wurde nicht festgestellt.

#### **1.2. Auswahl einer geeigneten internen Kontrolle**

Es ist davon auszugehen, dass in Abhängigkeit vom physiologischen Status eine hohe Variabilität der Expression der sogenannten „Haushaltsgene“ vorliegen kann. Da durch die Wahl der internen Kontrolle das Ergebnis einer Studie stark beeinflusst wird, muss die Auswahl eines geeigneten Gens zur Normierung sehr vorsichtig erfolgen (YAMADA et al., 1997; THELLIN et al., 1999).

Die GAPDH-mRNA kann in einer Vielzahl von porcinen Geweben leicht nachgewiesen werden. Dabei ist die Variabilität der GAPDH-Genexpression zwischen unterschiedlichen Geweben viel geringer als die der  $\beta$ -Aktin-mRNA (FOSS et al., 1998). Für Experimente zur Ontogenese der Genexpression in der porcinen Leber war die GAPDH-mRNA jedoch ungeeignet. Es wurde in der vorliegenden Untersuchung eine entwicklungsbedingte Regulation des GAPDH-Gens während der pränatalen Ontogenese festgestellt. Vergleichbare Beobachtungen wurden von LIU et al. (2000) beim postnatalen Schwein

gemacht. Weitere Untersuchungen belegen, dass die GAPDH-mRNA-Konzentration im Vergleich zur 18 S rRNA-Konzentration während des Gewebewachstums ansteigen kann (SCHEK et al., 1988; PERSONS et al., 1989; CALVO et al., 1997). In verschiedenen Studien wurde auf die Eignung der ribosomalen 28 S rRNA und 18 S rRNA zur Normierung hingewiesen (De LEEUW et al., 1989; BATHIA et al., 1994; THELLIN et al., 1999). Dieses bestätigte sich im Fall der 18 S rRNA auch für Untersuchungen während der porcinen Ontogenese in Leber und Niere. Ein Gen, das wie die 18 S rRNA unter so vielfältigen Bedingungen in der Lage ist eine konstante Expression aufrecht zu halten, muss sehr sensibel auf die Regulation der Zellgröße reagieren können (SCHMIDT & SCHIBLER, 1995).

### **1.3. Auswahl der geeigneten Methode zur Bestimmung der relativen GHR-Genexpression**

#### **1.3.1. Ribonuclease Protection Assay (RPA)**

Der RPA nach MELTON et al. (1984) ermöglichte den Nachweis der geschützten GHR- und GAPDH-Fragmente. Eine Linearität konnte unter den gewählten Bedingungen nicht gezeigt werden. Auf Grund der parallel erhaltenen Ergebnisse aus der PCR nach NICOLETTI & SASSY-PRIGENT (1996) war zu bezweifeln, dass die Sensitivität des RPA für die der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegenden Fragestellungen ausreichend ist. Eine Optimierung des RPA, unter Mitführung der notwendigen Kontrollen, erfolgte daher nicht.

Der Einsatz multipler Sonden erschien sinnvoll, da nur auf diese Art und Weise eine optimale Lade- und Qualitätskontrolle der verwendeten Gesamt-RNA erfolgen kann. Nur mit Hilfe von multiplen Sonden können RNA-Verluste bei der Durchführung des Assays direkt kontrolliert werden. Auch zahlreiche andere Gruppen wählten diese Vorgehensweise (HEINRICHS et al., 1994; COMBES et al., 1997 a,b; DAVIS et al., 1997; LIU et al., 2000).

Wie festgestellt wurde, war die GAPDH-mRNA für die gewählte Versuchseinstellung als interne Kontrolle ungeeignet. Daher hätte sich die Verwendung der 18 S rRNA als interne Kontrolle im RPA angeboten. Dieses Verfahren wurde erfolgreich von COMBES et al. (1997 a,b) beim Nachweis der GHR-mRNA in Leber und Muskel postnataler Schweine verwendet. In diesem Fall wird allerdings

eine große Menge an in vitro transkribierter cRNA bei entsprechend geringer spezifischer Aktivität der Sonde voraussetzt (DAVIS et al., 1997; Ambion, Technical Bulletin 151, 2001).

In Anlehnung an DUCHAMP et al. (1996) wurde eine exogene Ladekontrolle (LAMTAIL) vorbereitet. Diese stellt keinen Ersatz für eine optimale interne Kontrolle dar, da sie nicht direkt die Ladung und abweichende Qualitäten der Gesamt-RNA kontrolliert. Sie hätte aber „Tube-to-Tube“ Abweichungen bei der Durchführung des RPA aufdecken können.

### **1.3.2. Relativ quantifizierende PCR mit einer progressiven RNA-Verdünnungsreihe als Multiplex-PCR**

Die verwendete Methode der progressiven RNA-Verdünnungsreihe nach NICOLETTI & SASSY-PRIGENT (1996) wurde von RAEYMAEKERS (2000) diskutiert. Demnach muss bei dieser Methode aufmerksam überwacht werden, dass nicht in den Sättigungsbereich der PCR hinein amplifiziert wird.

Den eigenen Ergebnissen zu Folge war der dynamische Bereich dieser Methode begrenzt. Größere Unterschiede der GHR-Genexpression ließen sich deshalb nicht linear darstellen. Zugleich wäre ein hoher Probendurchsatz nicht realisierbar gewesen. Die dargestellte Methode ist allerdings sehr gut für das präzise Screening nach einer sinnvollen internen Kontrolle geeignet. Zudem lassen sich auch sehr schnell exakte Aussagen zur Expression eines Zielgens zwischen einzelnen Individuen erzielen.

Die Durchführung der Methode nach NICOLETTI & SASSY-PRIGENT (1996) als Multiplex-PCR veranschaulichte sehr eindringlich, was passiert, wenn sich das Expressionsniveau der internen Kontrolle auch nur geringfügig zwischen den Untersuchungsgruppen unterscheidet. Im Fall der GHR-Genexpression hätte man die relativen Unterschiede der GHR-mRNA-Konzentrationen zwischen dem Fetus und dem adulten Tier überschätzt.

Mit Hilfe der Multiplex-PCR kann unter Einsatz einer geeigneten internen Kontrolle die Expression eines Zielgens optimal normiert werden. Dieses ist natürlich auch ohne die Verwendung der progressiven RNA-Verdünnungsreihe der Fall. Beachtet werden muss allerdings, dass die Zuverlässigkeit dieses Systems am größten ist, wenn zwischen dem Zielgen und der internen Kontrolle

keine bedeutenden Unterschiede der initialen Kopienzahl vorliegen (RAEYMAKERS, 2000; Ambion Quantum RNA™, Manual ver. 0001).

### **1.3.3. Relative kompetitive PCR mit einem heterologen DNA-Kompetitor**

Die relative kompetitive PCR erwies sich als die ideale Methode für die Bestimmung der porcinen GHR-mRNA während der Ontogenese in Leber und Niere. Das Ziel, alle Untersuchungsgruppen erfassen zu können, wurde durch den breiten dynamischen Bereich des Systems erfüllt.

Die Normierung gegen die Expression der 18 S rRNA erfolgte in Anlehnung an GATTEI et al. (1997) und ASHWELL et al. (1999) mit einem Aliquot der cDNA, welches bereits in der kompetitiven PCR verwendet wurde. Die Quantität, Qualität und Reinheit der eingesetzten Gesamt-RNA wurden dadurch optimal kontrolliert.

Für die kompetitive PCR wurde in der vorliegenden Arbeit ein DNA-Standard gewählt. Ein Vorteil des DNA-Kompetitors besteht darin, dass er stabiler und einfacher zu handhaben ist als ein cRNA-Kompetitor (ZHANG & BYRNE, 1999). Da die Effizienz der reversen Transkription nicht erfasst wird, ist jedoch keine absolute Quantifizierung möglich (RIEDY et al., 1995). Nach RAEYMAEKERS (1993) besteht allerdings auch unter der Verwendung eines cRNA-Standards die Möglichkeit, dass stabile Unterschiede der Amplifikationseffizienz unentdeckt bleiben. In diesem Fall findet auch unter der Verwendung eines cRNA-Standards keine absolute Quantifizierung statt.

Eine große Überlegenheit der kompetitiven PCR im Vergleich zu einer nicht-kompetitiven Anwendung ist ihre Unabhängigkeit von der Zykluszahl. Unter der Bedingung einer vergleichbaren Effizienz der Amplifikation von Zielgen und Kompetitor kann sie über viele Zyklen hinweg durchgeführt werden. Sie muss nicht in der exponentiellen Phase der Reaktion abgestoppt werden (GILLILAND et al., 1990; BOUABOULA et al., 1992; zur Übersicht: ZIMMERMANN & MANNHALTER, 1996). Der Nachweis der parallelen Amplifikation der GHR-cDNA und des DNA-Kompetitors konnte in der vorliegenden Studie erbracht werden. Dementsprechend wurden identische Äquivalenzpunkte nach der Amplifikation mit 25, 28 bzw. 33 PCR-Zyklen beobachtet.

Nach Angaben der Fa. Clontech ermöglicht der gewählte Nachweis der EtBr-gefärbten PCR-Produkte die Abgrenzung von mindestens zweifachen Unterschieden der Genexpression. Dieser Anspruch wurde vollkommen erfüllt. ZIMMERMANN & MANNHALTER (1996) diskutierten einen Variationskoeffizienten, der in unterschiedlichen Arbeiten üblicherweise bei 10 - 20 % lag. CORDANO et al. (2000) stellten unter der Verwendung eines cRNA-Standards und der EtBr-Färbung der PCR-Produkte im Agarosegel einen Variationskoeffizient von 16% fest. In diesem Bereich bewegt sich auch die Zuverlässigkeit des vorliegenden Systems.

Als Fazit ist festzuhalten, dass die unterschiedlichen Methoden zur Quantifizierung einer Ziel-mRNA mit Hilfe der PCR nach HALFORD (1999) zu vergleichbaren Ergebnissen führen. Dabei war die kompetitive PCR die Methode der Wahl für die Bestimmung der GHR-Genexpression während der porcinen Ontogenese in Leber und Niere. Vermutlich wird in näherer Zukunft die „Real-time-PCR“ mehr und mehr die Kompletorsysteme mit Endpunktanalyse ablösen (NEUSSER, 2001). Durch die Verwendung dieser Technik wird ein Höchstmass an Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit gewährleistet (zur Übersicht: BUSTIN, 2000).

#### **1.4. Anmerkungen zur GHR-mRNA-Quantifizierung**

Jede einzelne mRNA unterliegt in der Zelle einem Fließgleichgewicht und wird durch eine Vielzahl von Mechanismen reguliert. Diese beziehen sich unter anderem auf die Regulation der Transkription und auf die mRNA-Stabilität. Dabei wird die Stabilität einer großen Anzahl von mRNA's durch Hormone reguliert (zur Übersicht: ALBERTS et al., 1994; DAY & TUIE, 1998; STATON et al., 2000).

In der vorliegende Studie wurde die GHR-Genexpression in Relation zur Gesamt-RNA betrachtet. Diese Vorgehensweise entsprach der Methode in vergleichbaren Studien zur Ontogenese beim Schwein (BRAMELD et al., 1995 b; DUCHAMP et al., 1996; LIU et al., 2000). Im Gegensatz zu PENG et al. (1996, 1998) wurde dabei jedoch nicht berücksichtigt, dass Unterschiede der GHR-Genexpression auch auf hyperplastisches bzw. hypertrophes Organwachstum zurückzuführen

sein können (SARKAR et al., 1977; FRIEDMAN et al., 1995; SCHMIDT & SCHIBLER, 1995).

Durch die Messung der GHR-mRNA-Konzentration lassen sich nur Anhaltspunkte zur Proteinexpression ableiten. Nach Ansicht von SCHWARTZBAUER & MENON (1998) ist jedoch davon auszugehen, dass die GHR-Genregulation während der Ontogenese eher über transkriptionale als über translationale Mechanismen erfolgt. Letztere können aber nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Als Beispiel ist der Nachweis der GHR-mRNA in der Lunge und im Muskel des humanen Fetus im ersten Trimester der Schwangerschaft zu nennen (ZOGOPOULOS et al., 1996 a). Ein paralleler Nachweis des GHR-Proteins ist zu dieser Zeit nicht möglich (HILL et al., 1988, 1992; SIMARD et al., 1992).

## **2. GHR-Genexpression**

Mit Hilfe der vorliegenden Studie konnten wichtige Erkenntnisse zur Ontogenese der GHR-Genexpression beim Schwein gewonnen werden. Von großer Bedeutung waren hierfür auch die Untersuchungen an homozygoten Schweinen mit einem erblichen Defekt der renalen 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -Hydroxylierung.

Um Regulationsmechanismen der GHR-Genexpression aufdecken zu können, die in Beziehung zu bestimmten Entwicklungsphasen stehen, sind Kenntnisse des Expressionsprofils wichtig. Als Beispiel ist hier der vorgeburtliche Cortisolanstieg beim Schaf zu nennen, der mit der Zunahme der GHR-Genexpression in der Leber korreliert (LI et al., 1996, 1999).

In der Regel nehmen die Regulationsmechanismen einen Einfluss auf die Expression unterschiedlicher GHR-mRNA-Varianten. Dieses erfolgt als Strategie einer entwicklungs- und gewebespezifischen GHR-Genexpression (JIANG et al., 1999). Dementsprechend werden bei den verschiedenen Spezies zeitgleich verschiedene GHR-mRNA-Transkripte koordiniert exprimiert. Allerdings sind im Gegensatz zu anderen Spezies für das Schwein erst in letzter Zeit zwei unterschiedliche Varianten während der postnatalen Entwicklung identifiziert worden (LIU et al., 2000). Die Expression dieser Varianten während der pränatalen Entwicklung ist fraglich. Die vorliegende Arbeit bezieht sich daher auf die gesamte GHR-Genexpression.



## 2.1. Pränatale Ontogenese der GHR-Genexpression

Die GHR-mRNA konnte bereits 30 Tage p.c. in diversen Geweben qualitativ nachgewiesen werden. Eine quantitative Bewertung des GHR-mRNA-Niveaus erfolgte für die Leber und für die Niere. Es wurde eine gewebe- und entwicklungsspezifische GHR-Genexpression beobachtet. Der frühzeitige ubiquitäre Nachweis der GHR-mRNA deutet beim Schwein wie auch bei anderen Spezies (KÖLLE et al., 1998; LACROIX et al., 1999) auf die große Bedeutung des GHR bei der pränatalen Ontogenese hin. Trotz der in einzelnen Studien nachgewiesenen Funktion des fetalen GHR (PANTALEON et al., 1997; BATCHELOR et al., 1998) steht eine eindeutige Zuordnung der entwicklungsrelevanten Funktionen bei den unterschiedlichen Spezies noch aus. Die GHR-mRNA wurde bereits von PENG et al. (1996) am Tag 90 p.c. in der Leber des porcinen Fetus detektiert. Erstmals konnten durch die vorliegende Studie aber Informationen zur Modulation der GHR-Genexpression in dieser Entwicklungsphase erhalten werden.

Bis zum 70. Tag p.c. erfolgte die GHR-Genexpression in der Leber der Feten auf einem konstitutiv niedrigem Niveau. Dieses erklärt vermutlich auch den fehlenden Nachweis der GHR-mRNA mittels RPA am 80. Tag p.c. beim Schwein (DUCHAMP et al. 1996). Zwischen dem 70. Tag p.c. (63 % der Trächtigkeit) und dem 90. Tag p.c. (80 % der Trächtigkeit) kann ein starker Anstieg der GHR-mRNA-Konzentration verzeichnet werden. Neben der konstitutiven Expression einzelner GHR-mRNA-Transkripte wird vermutlich die Transkription weiterer GHR-mRNA-Varianten hochreguliert. Die Expression der GHR-mRNA 1A dürfte nicht beteiligt sein, da dieses Transkript selbst 77 Tage p.p. noch nicht in der Leber eines jeden Tieres nachgewiesen werden kann. Es ist denkbar, dass neben anderen die postnatal eher konstitutiv exprimierte Variante 1B beteiligt ist. Sie ähnelt nach LIU et al. (2000) in ihrem Expressionsprofil der bovinen 1C-Variante (JIANG et al., 1999), die großen Anteil an der pränatalen GHR-Genexpression in der bovinen Leber und Niere hat.

Im Gegensatz zur Leber des porcinen Fetus beobachtet man in der Leber des ovinen Fetus schon am 51. Tag p.c. (33 % der Trächtigkeit) 13 % des 4,4 KB Haupttranskripts der maternalen Leber mit einem Trend zum Anstieg während der weiteren Entwicklung. Aus den Studien von KLEMPET et al. (1993) und

LACROIX et al. (1999) lässt sich ableiten, dass die GHR-Genexpression in der Leber des ovinen Fetus früher hochreguliert wird als in der Leber des porcinen Fetus.

Die GHR-Genexpression erfolgte in der Niere des Fetus bereits in der jüngsten Untersuchungsgruppe auf hohem Niveau. Beim Rinderfetus ist der Mesonephros das erste Organ, welches das GHR-mRNA-Transkript und parallel das GHR-Protein exprimiert (KÖLLE et al., 1998). Demnach scheint die Genregulation wie postuliert über die Mechanismen der Transkription zu erfolgen. Vergleichbare Verhältnisse beim porcinen Fetus sind sehr wahrscheinlich und sollten durch weiterführende Untersuchungen zur Proteinexpression abgesichert werden.

Auch in anderen Studien am Schwein (LEE et al., 1993) und am Schaf (KLEMPT et al., 1993) wurde pränatal ein hohes Niveau der GHR-mRNA in der Niere beobachtet. Auf Grund dessen ist nach YMER & HERINGTON (1992) von einer wichtigen Rolle des GH bei der frühen Nierenentwicklung auszugehen. Wie der Literaturübersicht zu entnehmen ist (Kap. II.2.3.1.) existiert ein GH-Signaltransduktionsweg der STAT-unabhängig über FAK und Integrin-vermittelte Entwicklungsprozesse Einfluss auf die Nephrogenese nehmen könnte. Möglicherweise kann dem fetalen GHR auf diesem Weg eine eindeutige Funktion bei der Nephrogenese zugeordnet werden.

In der Niere konnte im Gegensatz zur Leber eine kontinuierliche Zunahme der GHR-mRNA-Konzentration verzeichnet werden. Die Degeneration des funktionellen Mesonephros und dessen Übergang zum Metanephros in der ersten Hälfte der Gravidität hatte demnach keinen Einfluss auf die GHR-Genexpression. Die auf hohem Niveau erfolgende GHR-Genexpression in der Niere des porcinen Fetus steht möglicherweise in Beziehung zur frühen Funktion des Organs. Diese ist auf Grund der beobachteten Glucoseretention vermutlich bereits ab dem 50. Tag der Entwicklung des Schweins gegeben (zur Übersicht: KLEINMAN, 1975).

Vergleichende Betrachtungen zur GHR-Genexpression bei Schwein und Schaf (KLEMPT et al., 1993) weisen ein höheres Niveau der GHR-mRNA in der Niere des Schweinefetus aus. Das Niveau der GHR-Genexpression in der Niere der 70 und 90 Tage alten Feten überstieg das der 180 Tage alten weiblichen Tiere. In

einer Studie von PENG et al. (1996) waren diese Unterschiede noch viel stärker ausgeprägt. Welcher Entwicklungsprozess dieses verursacht, bedarf der Klärung.

Im zweiten Versuchsteil zur pränatalen GHR-Genexpression wurden die DL-Feten den DL-PVDRI-Feten am 90. Tag der Entwicklung gegenübergestellt. Auf Grund der Ergebnisse ist davon auszugehen, dass ein erblicher Defekt der renalen 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -Hydroxylierung einen Effekt auf die GHR-Genexpression des porcinen Fetus hat. Es ist bekannt, dass die homozygoten Feten von homozygoten Sauen dieser Linie nur niedrige Calcitriolwerte aufweisen (LACHENMAIER-CURRLE & HARMEYER, 1989). Calcitriol könnte daher ein wichtiger Modulator der GHR-Genexpression zwischen dem 70. und 90. Tag der pränatalen Entwicklung sein.

Die bei den Feten der Sau DL-PVDRI 3 beobachtete GHR-Genexpression unterschied sich grundlegend von der der übrigen DL-PVDRI- und auch der DL-Feten und muss daher kritisch betrachtet werden.

Es ist bekannt, dass akuter Calcitriolmangel bei Ferkeln und älteren Schweinen wahrscheinlich durch Schmerzen bei der Bewegung zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme führt (HARMEYER et al., 1982; WINKLER et al., 1986). Um Ernährungseffekte zu vermeiden, wurde die Behandlung mit Vitamin D<sub>3</sub> daher nicht zu Beginn der Trächtigkeit ausgesetzt. Die somatotrophe Achse des ovinen Fetus reagiert auf extreme maternale Unterernährung mit einer verringerten Gewichtszunahme und einer erhöhten GH-Sekretion. Indessen bleibt die spezifische GH-Bindung an mikrosomale Lebermembranpräparationen allerdings unverändert (BAUER et al., 1995).

Da keine Korrelation zwischen dem Gewicht und der GHR-Genexpression festgestellt wurde, sind ernährungsbedingte Effekte in der vorliegenden Studie unwahrscheinlich. Zudem wurden, wie in Kap. VI.2.2. diskutiert, keine signifikanten Unterschiede der GH-Plasmakonzentration zwischen den Feten beobachtet.

Ein individuell unterschiedlicher extrarenaler Umsatz von Vitamin D<sub>3</sub> zu Calcitriol mag eine Rolle bei den beobachteten Effekten gespielt haben. Die Aufnahme einer Vitamin-D<sub>3</sub>-Dosiswirkungskurve hätte sicherlich genauere Hinweise liefern können. Dieses Vorgehen hätte den Rahmen der vorliegenden Studie aber überschritten, sollte aber bei fortführenden Studien berücksichtigt werden. Zu

bedenken ist außerdem, dass nur eine enge therapeutische Breite bei der Behandlung des vorliegenden Defekts mit Vitamin D<sub>3</sub> besteht (PLONAIT, 1969).

Aus der Leber der DL-Feten wurde signifikant mehr Gesamt-RNA extrahiert als aus der Leber der DL-PVDRI-Feten. Demzufolge wurde in der kompetitiven PCR eine Gesamt-RNA-Masse der Leber analysiert, deren Gewebeäquivalent bei den DL-Feten geringer war. Sofern sich die DNA-Gehalte nicht unterschieden, was in der vorliegenden Studie nicht geprüft wurde, ist von einer höheren transkriptionellen Aktivität in der Leber der DL-Feten auszugehen. Ein Zusammenhang zwischen der Gesamt-RNA-Konzentrationen und dem Gewicht der Feten ist nicht wahrscheinlich. Nach Untersuchungen von LODGE et al. (1977) bewirkt Nahrungsentzug beim Saugferkel eine reduzierte Zellteilung bei einem geringeren Lebergewicht. Die Zellgröße, definiert über den RNA / DNA-Quotienten, unterscheidet sich allerdings nicht.

### **2.1.1. Postnatale Ontogenese der GHR-Genexpression**

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse ist nicht davon auszugehen, dass ein erblicher Defekt der renalen 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -Hydroxylierung einen Einfluss auf die GHR-Genexpression in der Leber des DL-Ferkels (42 p.p.) hat.

Die Ferkel wurden im Alter von 4 Wochen von der Mutter entfernt. Mögliche Effekte einer Nahrungsumstellung sollten vermieden werden. Neueren Untersuchungen zu Folge besteht aber kein Zusammenhang zwischen dem Absetzen der Ferkel und der GHR-Genexpression (MATTERI et al., 2000). Es wurde von dieser Gruppe zudem beobachtet, dass das Körpergewicht der Ferkel keinen Effekt auf die GHR-Genexpression in der Leber hat. Größere Ferkel einer Altersgruppe weisen allerdings mehr GHR-mRNA im Skelettmuskel auf. Auch in der vorliegenden Studie korrelierte das Körpergewicht nicht mit der GHR-Genexpression in der Leber der 42 Tage alten Ferkel. Wie in der vorliegenden Studie, wurde auch von SCHRÖDER et al. (1998 a,b) ein geringeres Gewicht bei saugenden- und abgesetzten homozygoten Defekträgern verzeichnet. Dabei wurde bei ihnen ein 60 % - 75 % niedrigerer Calcitriolspiegel zusammen mit einer reduzierten Calciumkonzentration im Plasma nach dem Absetzen festgestellt.

Im zweiten Versuchsteil wurde der postnatalen Ontogenese der GHR-Genexpression bei MINI- und MINI-PVDRI-Schweinen nachgegangen. Der Vergleich von Tieren einer Altersgruppe ergab weder in der Niere noch in der Leber signifikante Unterschiede der GHR-mRNA-Konzentration zwischen den Linien.

Bereits die 8 Wochen alten MINI-Schweine wiesen ein Niveau der GHR-Genexpression auf, das sich nur unwesentlich von dem der adulten Tiere unterschied. Einen Anstieg der GHR-Genexpression in der Leber des Schweins wurde während der postnatalen Entwicklung ebenfalls von BRAMELD et al. (1995 b) und PENG et al. (1996) beobachtet. Dieser ist beim Ferkel (42 p.p.) vermutlich neben anderen, auf das zunehmende Signal des GHR-mRNA-Transkripts 1B zurückzuführen (LIU et al., 2000).

Bemerkenswert war die Beobachtung, dass die Veränderung der GHR-mRNA-Konzentration in der Leber der MINI-PVDRI-Schweine nicht dem Profil der MINI-Schweine entsprach. Das Niveau der adulten Tiere wurde verzögert erreicht. Auf Grund dieser Beobachtung ist davon auszugehen, dass bei den Ferkeln der Calcitriolmangellinie eine verzögerte Entwicklung vorliegt.

Verzögert auftretende Kombinationseffekte durch förderliche Milchhaltsstoffe und dem Calcitriolmangel könnten mitverantwortlich für den hinausgeschobenen Anstieg der GHR-Genexpression sein. KLEIN (1999, 2001) konnte Effekte des Parathyroid-Hormon-related-Protein (PTHrP) -Fragments aus der Molekülmitte auf die aktive Calciumaufnahme bei Schweinen der Calcitriolmangellinie feststellen. Bei Ferkeln mit einem Calcitriolstatus im physiologischen Normbereich spielte dieser Effekt nur eine untergeordnete Rolle. Für die vorliegende Untersuchung ist diese Tatsache interessant, weil PTHrP beim milchgefütterten Kalb die hepatische IGF-I-Synthese stimuliert (COXAM et al., 1992). Auch eine parakrine Modulation der IGF-I-Expression durch PTHrP ist bekannt (SHIN et al., 1997). In diese Beobachtungen fügt sich ein, dass die Fütterung mit Kolostrum beim neonatalen Ferkel zu einer signifikanten Steigerung der IGF-I-Plasmakonzentration führt. Gleichzeitig ist die basale GH-Sekretion bei diesen Ferkeln signifikant niedriger (WESTER et al., 1998 a).

Im Unterschied zur Leber wird die GHR-Genexpression in der Niere unabhängig vom Entwicklungsstand reguliert. Daher ist von einer gewebespezifischen Regulation der GHR-Genexpression während der postnatalen Ontogenese der Miniaturschweine beider Linien auszugehen.

Im Gegensatz zur vorliegenden Untersuchung wurde von PENG et al. (1996) einen starker Abfall der GHR-mRNA-Konzentration in der Niere des Schweins zwischen dem 21. und 90. Tag der postnatalen Entwicklung festgestellt. Auch BINGHAM et al. (1994) beschrieben einen deutlichen Abfall der GHR-Genexpression in der Niere, mit niedrigsten Werten zur Zeit des Absetzens. Effekte des Absetzens auf die GHR-Expression in der Niere wurden von MATTERI et al. (2000) nicht berücksichtigt.

Die erwähnten Arbeiten weisen eine Diskrepanz zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie auf. Es stellt sich die Frage, ob die abweichenden Beobachtungen auf Rasseunterschiede zurückzuführen sind, die auch zwischen den DL- und den Miniaturschweinen festgestellt wurden. Diese betrafen allerdings nur die Leber und nicht die Niere.

Es wurde beobachtet, dass die Miniaturschweine in der Leber, nicht jedoch in der Niere mehr GHR-mRNA aufweisen als die 180 Tage alten weiblichen DL-Schweine. Die vorliegende Beobachtung steht im Gegensatz zu Untersuchungen am „Meishan Schwein“ von SCHNOEBELEN-COMBES et al. (1996). Diese Studie ließ eher ein geringeres GHR-mRNA-Niveau in der Leber des Miniaturschweins, das im Vergleich zum DL-Schwein zu den fetten Rassen gehört, vermuten. In dieser Arbeit wurde während der postnatalen Entwicklung eine Zunahme GHR-mRNA-Konzentration und der GHR-Bindung in der Leber beschrieben. Diese war beim „Large White Schwein“, einer mageren Rasse, bedeutend stärker ausgeprägt als beim „Meishan Schwein“, einer fetten Rasse. Zudem war die Dauer des GH-Pulses bei der mageren Rasse länger als bei der fetten Rasse, ohne dass sich die mittlere GH-Plasmakonzentration unterschied (LOUVEAU et al., 1991; LOUVEAU & BONNEAU, 1996). Nach Ansicht von LOUVEAU et al. (1991) ähnelt das Meishan Schwein in Bezug auf die GH- und die IGF-I-Sekretion dem „Yucatan Mini Pig“. Es unterscheidet sich aber deutlich von anderen, langsam wachsenden, fetten Schweinemodellen. Hierdurch ergibt sich möglicherweise eine Begründung für die beobachtete Diskrepanz zwischen

der vorliegenden Studie und der Arbeit von SCHNOEBELEN-COMBES et al. (1996).

Von SAUERWEIN et al. (1992) wurden vergleichende Untersuchungen zur Regulation des GHR / BP beim Göttinger Miniaturschwein und beim DL-Schwein durchgeführt. Die Ergebnisse lassen im Zusammenhang mit der vorliegenden Studie in der Leber des Miniaturschweins eine GHR-Genregulation auf posttranskriptionaler Ebene annehmen. Es scheint eine bedeutende Diskrepanz zwischen dem hohen GHR-mRNA-Niveau und dem resultierenden GHR-Protein im Vergleich zum DL-Schwein vorzuliegen.

## **2.2. GH-Plasmakonzentration während der pränatalen und postnatalen Ontogenese bei DL- und DL-PVDRI-Schweinen**

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass ein erblicher Defekt der renalen 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -Hydroxylierung beim Ferkel, nicht jedoch beim Fetus, zu Unterschieden bei der basalen GH-Plasmakonzentration führt. Die abweichenden Effekte auf die GH-Plasmawerte beim Fetus und beim Ferkel weisen eine entwicklungsbedingte Regulation in Abhängigkeit vom genetischen Status aus. Erstmals wurde eine Modulation der GH-Sekretion *in vivo* nachgewiesen, die möglicherweise auf Calcitriol zurückzuführen ist.

Die GH-Sekretion der Feten erfolgte wie zu erwarten im Vergleich zu den postnatalen Tieren auf einem hohen Niveau. (KLINDT & STONE, 1984; RETTMER, 1995; BAUER & PARVIZI, 1996).

Geschlechtsunterschiede wurden in der vorliegenden Untersuchung nicht berücksichtigt. Nach BUONOMO & KLINDT (1993) ist beim männlichen Ferkel vergleichbaren Alters von einer höheren GH-Plasmakonzentrationen auszugehen. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu Untersuchungen von LOUVEAU et al. (1991), OWENS et al. (1991) und RETTMER (1995), die keinen Geschlechtsdimorphismus bei Ferkeln vergleichbaren Alters feststellten.

Da es in Folge des Absetzens zu einem kurzfristigen Anstieg der GH-Sekretion kommt (CARROLL et al., 1998), wurden die Ferkel 9 Tage vor der ersten Blutentnahme von der Mutter entfernt.

Trotz der signifikant höheren GH-Plasmawerte wurde bei den untersuchten DL-PVDRI-Ferkeln während des gesamten Beobachtungszeitraums ein geringeres Körpergewicht verzeichnet. Nach SCANES et al. (1987) hat das Körpergewicht bei Ferkeln diesen Alters allerdings keinen Einfluss auf die GH-Sekretion.

Es ist anzunehmen, dass bei den DL-PVDRI-Ferkeln wie auch bei den MINI-PVDRI-Ferkeln ein Entwicklungsrückstand vorliegt. Dieser offenbarte sich bei den untersuchten DL-PVDRI-Ferkeln durch eine signifikant unterschiedliche Entwicklung des Körpergewichts. Allerdings resultierte er nicht in einer veränderten GHR-Genexpression in der Leber zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme. Vermutlich führt der Entwicklungsrückstand zu einer verzögerten Ausreifung der GH-Regelmechanismen. Durch eine verzögerte Entwicklung fällt die GH-Sekretion bei den DL-PVDRI-Ferkeln möglicherweise erst später wieder ab. Ein verringerter SRIF-Tonus ist denkbar.

Unterschiede der stimulierten GH-Sekretion sind für die DL-PVDRI-Ferkel nicht anzunehmen. Sie reagierten auf die Behandlung mit GRF und SRIF wie Ferkel vergleichbaren Alters in einer Studie von RETTMER (1995). In der vorliegenden Arbeit wurden irreguläre Reaktionen der episodischen GH-Sekretion auf die Stimulation mit GRF festgestellt. Entsprechenden Beobachtungen am Schwein liegen auch von anderen Gruppen vor (KRAFT et al., 1985; DUBREUIL et al., 1987; PETITCLERE et al., 1987; ELSAESSER & DRATH, 1995). Die unterschiedlichen Effekte auf die Behandlung mit GRF wurden auf refraktäre Perioden, hervorgerufen durch SRIF, zurückgeführt.

Ein Abfall der GH-Sekretion nach der Behandlung mit SRIF wurde wie auch von RETTMER (1995) beschrieben nicht verzeichnet. Der verzögerte Anstieg der GH-Sekretion nach der Behandlung mit SRIF deutet nach RETTMER (1995) auf einen „Rebound Effekt“ beim Ferkel hin. TORRONTERAS et al. (1997) konnten einen inhibitorischen Effekt von SRIF nur auf die durch GRF stimulierte GH-Sekretion beim neonatalen Ferkel, nicht jedoch auf die basalen GH-Werte *in vitro* feststellen. Vergleichbare Beobachtungen liegen von RAMIREZ et al. (1998) vor. Demnach kann nicht von einer zu geringen Dosis des verwendeten SRIF ausgegangen werden.



### 3. Abschließende Betrachtungen

Entgegen früherer Annahmen gibt es nach BAUER et al. (1998) mittlerweile mehr und mehr Beweise dafür, dass der somatotrophen Achse des Fetus eine wichtige Rolle beim Wachstum zukommt. Die pränatalen und postnatalen GH-Effekte wurden auf Grund der Somatomedin-Hypothese in der Vergangenheit insbesondere über die Stimulation der IGF-I-mRNA und über die IGF-I-Sekretion der Leber definiert. Wie der Literaturübersicht (Kap. II.1.) und der vorliegenden Studie zu entnehmen ist sind jedoch auch parakrine bzw. autokrine Effekte des GH während der pränatalen und postnatalen Entwicklung des Schweins zu vermuten. Neuen Untersuchungen zufolge ist zudem von IGF-I-independenten GH-Effekten auf das somatische Wachstum auszugehen (LU et al., 2001). Nach Ansicht dieser Gruppe könnten die IGF-I- und GH-Effekte additiv, bei einer unabhängigen Signalweiterleitung sein. Auch am Knochen sind die GH-Effekte nicht in jedem Fall IGF-I-abhängig und werden vor allem STAT5-unabhängig bewirkt (ISAKSSON et al., 1982; SIMS et al., 2000). STAT5b ist für die Stimulation der IGF-I-Sekretion notwendig, hat aber keinen Effekt auf die GHR-Genexpression in der Mäuseleber (DAVEY et al., 2001).

Die IGF-I-mRNA in der Leber der Ratte reagiert im Gegensatz zur GHR-mRNA sehr sensitiv auf Änderungen der GH-Serumkonzentration (DOMENÉ et al., 1993). Beim neonatalen Ferkel können jedoch keine GH-Effekte auf die IGF-I-Plasmakonzentration und das Körpergewicht festgestellt werden (DUNSHEA et al., 1999). Zudem ist eine funktionelle Verbindung zwischen der GHR- und der IGF-I Genexpression beim 18 Tage alten Ferkel nicht gesichert (MATTERI et al., 2000). Auch in der vorliegenden Studie wurden keine Effekte einer höheren GH-Plasmakonzentration auf das Gewicht und das GHR-mRNA-Niveau in der Leber des Ferkels beobachtet. Trotzdem ist die Feststellung von WESTER et al. (1998 a), dass GH beim neonatalen Ferkel keine signifikante physiologische Rolle spielt, mit Vorsicht zu betrachten. Möglicherweise sind die Signaltransduktionswege, die eine Steigerung der IGF-I- und der GHR-Genexpression nach einer Stimulation mit GH bewirken, während der Ontogenese des Schweins nicht voll ausgereift. Trotzdem können GH-Effekte über die Modulation anderer Wachstumsfaktoren bzw. Hormonsysteme nicht ausgeschlossen werden. Beim Schwein werden ebenfalls keine GH-Effekte auf die GHR-mRNA im

Skelettmuskel beobachtet, obwohl die positiven Effekte einer GH-Behandlung auf das Muskelwachstum hinlänglich bekannt sind (COMBES et al., 1997 b).

Bei den DL-PVDRI-Ferkeln wurden signifikant höhere GH-Plasmakonzentrationen beobachtet, ohne dass Unterschiede der GHR-mRNA-Konzentration in der Leber vorlagen. Sofern eine Verbindung zwischen diesen Beobachtungen existiert, steht sie möglicherweise in Beziehung zum Alter der Tiere. Das veränderte GH-Profil könnte einen prägenden Einfluss auf den Verlauf der GHR-mRNA-Genexpression während der Ontogenese ausüben. Ein verzögerter Anstieg der GHR-mRNA-Genexpression, wie auch beim MINI-PVDRI-Ferkel beobachtet, wäre denkbar, wurde in der vorliegenden Untersuchung allerdings nicht erfasst. Auch wenn die GH-Effekte beim Ferkel kontrovers diskutiert werden, so sind doch altersabhängige GH-Effekte auf die GHR-Bindung in der Leber des Schweins bekannt. Demnach bewirkt die täglich wiederholte GH-Gabe beim Ferkel (19 - 20 Tage p.p.) einen stärkeren Anstieg der hepatischen GH-Bindungskapazität als beim puberalen Schwein (AMBLER et al., 1992).

In der vorliegenden Studie wurde festgestellt, dass ein erblicher Defekt der renalen 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -Hydroxylierung altersabhängig einen gewebe-spezifischen Einfluss auf die GHR-Genexpression haben kann. Gleichzeitig wurden altersabhängige Einflüsse auf die GH-Plasmakonzentration *in vivo* beobachtet.

Bekannt ist, dass Calcitriol in der Lage ist die GH-Synthese indirekt über das T<sub>3</sub> *in vitro* zu modulieren (KAJI & HINKLE, 1989). Dabei ist Calcitriol ein negativer Regulator der über den T<sub>3</sub>-Rezeptor und den Retinoid (RA) -Rezeptor medierten Transaktivierung des GH-Promotors (GARCIA-VILLALBA et al., 1996).

Beobachtungen zur Beteiligung des Schilddrüsenhormonsystem bei der GH-Sekretion während der Ontogenese der Ratte fügen sich in die eigenen Ergebnisse zur GH-Sekretion ein. Primäre Hypophysenzellen der fetalen Ratte reagieren weder auf T<sub>3</sub> noch auf Retinsäure mit einer geänderten GH-Sekretion *in vitro*. Hypophysenzellen neonataler, wie auch adulter Tiere zeigen hingegen einen Anstieg der GH-Sekretion nach einer Stimulation mit T<sub>3</sub> (EZZAT et al., 1991). *In vivo* weisen hypothyreoide Rattenfeten kurz vor der Geburt eine verringerte GH-Sekretion auf (MORREALE DE ESCOBAR et al., 1993).

Zudem ist bekannt, dass die GHR-Genexpression des porcinen Fetus gewebe-spezifisch- und entwicklungsspezifisch durch den Schilddrüsenhormonstatus moduliert wird (DUCHAMP et al., 1996). Der T<sub>3</sub>-Rezeptor ist in der Leber des porcinen Fetus bereits vor dem 80. Entwicklungstag nachweisbar. Zugleich ist von einer differentiellen Expression der T<sub>3</sub>-Rezeptor-Isoformen während der Entwicklung auszugehen (DUCHAMP et al., 1994).

Auf der Basis der nur andeutungsweise dargestellten Zusammenhänge lässt sich eine Verbindung zu der beobachteten Modulation der GHR-Genexpression und der GH-Sekretion während der Ontogenese herstellen.

Die beobachteten, zum Teil gegensätzlichen Effekte, die ein erblicher Defekt der renalen 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -Hydroxylierung auf die GHR-Genexpression und die GH-Plasmakonzentration bewirkt, sind möglicherweise auf das Calcitriol zurückzuführen. Sie stehen vermutlich im Zusammenhang mit einem entwicklungsbedingt differentiell regulierten Schilddrüsenhormonsystem. Dabei existieren vielfältige Möglichkeiten zur Modulation der GHR-Genexpression und der GH-Sekretion durch die Superfamilie der nukleären Rezeptoren.

Die Existenz des Vitamin-D-Rezeptors in der Niere und insbesondere in der Leber der ausgewählten porcinen Untersuchungsgruppen wäre zu beweisen.

## **VII. Zusammenfassung**

Die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag zur Erweiterung der Kenntnisse um die pränatale und postnatale Ontogenese der porcinen GHR-Genexpression sowie der GH-Sekretion leisten. Es wurden Untersuchungen an DL-Schweinen und Göttinger Miniaturschweinen durchgeführt. Für vergleichende Untersuchungen standen im Weiteren Schweine mit einem hereditären Defekt der renalen 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -Hydroxylierung zur Verfügung.

Die GHR-Genexpression konnte mittels RT-PCR in allen untersuchten Geweben wie Leber, Niere und Herz der jüngsten pränatalen Untersuchungsgruppe (30 Tage p.c.) beobachtet werden. Mit Hilfe der kompetitiven PCR wurde die GHR-Genexpression in der Leber und der Niere des Schweins relativ quantifiziert. Da ein heterologer DNA-Kompetitor verwendet wurde, war es notwendig, die Effizienz der reversen Transkription zu kontrollieren. Das Ergebnis der kompetitiven PCR wurde daher über die PCR-Amplifikation der 18 S rRNA normiert.

Die Untersuchungen zur GH-Sekretion beim Fetus und beim Ferkel erfolgten am chronisch katheterisierten Tier.

Zur pränatalen Ontogenese der GHR-Genexpression in Leber und Niere sowie der GH-Plasmakonzentration wurden folgende Beobachtungen gemacht:

- Die Ontogenese der GHR-Genexpression erfolgte in der Leber von Feten der Altersgruppen 30 p.c. bis 70 p.c. auf einem konstitutiv niedrigem Niveau. Dieses betrug weniger als 1 % des Wertes, der bei weiblichen DL-Schweinen (180 Tage p.p.) beobachtet wurde.
- Im Alter von 70 Tagen p.c. bis 90 Tagen p.c. fand ein deutlicher Anstieg der GHR-Genexpression in der Leber des Fetus statt.
- Die GHR-Genexpression in der Niere von Feten der Altersgruppe 30 p.c. erreichte bereits 77 % der Werte, die in der Niere von 180 Tage alten DL-Schweinen festgestellt wurden.
- Die GHR-Genexpression in der Niere von Feten der Altersgruppen 70 p.c. (106 %) und 90 p.c. (122 %) überstieg das bei weiblichen DL-Schweinen (180 Tage p.p.) beobachtete Niveau.

- Vergleichende Untersuchungen zur GHR-Genexpression zwischen DL-Feten und Feten der DL-Calcitriolmangellinie im Alter von 90 Tagen p.c. ergaben insbesondere in der Leber aber auch in der Niere signifikante Unterschiede zwischen den Linien. Die Abweichungen in der Leber von den Feten der DL-Calcitriolmangellinie unterschieden sich in Abhängigkeit vom Muttertier zum Teil gegensätzlich von den DL-Feten.
- Es wurden keine signifikanten Unterschiede der basalen GH-Plasmakonzentration zwischen den Feten beider DL-Linien festgestellt.

Zur postnatalen Ontogenese der GHR-Genexpression in Leber und Niere sowie der GH-Plasmakonzentration wurde folgendes ermittelt:

- Vergleichende Untersuchungen zur GHR-Genexpression zwischen Göttinger Miniaturschweinen und Miniaturschweinen der Calcitriolmangellinie ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen.
- Die GHR-Genexpression in der Leber der Göttinger Miniaturschweine erreichte in der Altersgruppe 8 Wochen bereits ein Niveau, das dem der adulten Leber entsprach.
- Die Miniaturschweine der Calcitriolmangellinie wiesen im Vergleich zu den Göttinger Miniaturschweinen einen verzögerten Anstieg der GHR-Genexpression in der Leber auf.
- Die GHR-Genexpression in der Niere der Miniaturschweine beider Linien erfolgte auf einem konstant hohen Niveau. Während der postnatalen Ontogenese konnten keine Unterschiede zu den adulten Schweinen festgestellt werden.
- Vergleichende Untersuchungen zur GHR-Genexpression in der Leber von 42 Tage alten Ferkeln beider DL-Linien ergaben keine signifikanten Unterschiede.
- Die basale GH-Plasmakonzentration war bei den Ferkeln der DL-Calcitriolmangellinie signifikant höher als bei den Ferkeln der DL-Linie. Keine Besonderheiten der GH-Sekretion ergaben sich hingegen nach einer Behandlung mit GRF oder SRIF.
- Die GHR-Genexpression in der Leber, nicht aber in der Niere der beiden Miniaturschweinelinien, erfolgte auf einem signifikant höheren Niveau als bei den DL-Schweinen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die GHR-Genexpression beim DL-Schwein und beim Göttinger Miniaturschwein entwicklungs- und gewebespezifisch erfolgt. Ein erblicher Defekt der renalen 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -Hydroxylierung hat einen entwicklungsbedingten Einfluss auf die GHR-Genexpression in der Niere und insbesondere in der Leber.

Der vorliegende Defekt der renalen Calcitriolsynthese übt zudem in Abhängigkeit vom Alter einen Einfluss auf die GH-Sekretion beim Schwein aus.

Möglicherweise ist Calcitriol ein Modulator der GHR-Genexpression und der GH-Sekretion während der porcinen Ontogenese.

**VIII. Literaturverzeichnis**

- ADAMS, T.E., BAKER, L., FIDDES, R.J., BRANDON, M.R. (1990):  
The sheep growth hormone receptor: molecular cloning and ontogeny of mRNA expression in the liver. *Mol. Cell. Endocrinol.* 73, 135-145.
- ADAMS, T.E. (1995):  
Differential expression of growth hormone receptor messenger RNA from a second promoter. *Mol Cell. Endocrinol.* 108, 23-33.
- ADAMS, T.E. (1999):  
Transcription from the P2 promoter of the growth hormone receptor gene involves members of the Sp transcription factor family. *Biochem. J.*, 344, 867-872.
- AGARWAL, S.K., COGBURN, L.A., BURNSIDE, J. (1994):  
Dysfunctional growth hormone receptor in a strain of sex-linked dwarf chicken: evidence for a mutation in the intracellular domain. *J. Endocrinol.* 142, 427-434.
- ALBERTS, B., BRAY, C., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. (1994):  
*Molecular biology of the cell.* Garland Publishing Inc., New York, 3<sup>rd</sup> ed..
- ALLAN, G.J., FLINT, D.J., PATEL, K. (2001) :  
Insulin-like growth factor axis during embryonic development. *Reprod.* 122, 31-39.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN D.J. (1990):  
Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- AMBLER, G.R., BREIER, B.H., SURUS, A., BLAIR, H.T., MCCUTCHEON, S.N., SILBERGELD, A., GLUCKMAN, P.D. (1992):  
The interrelationship between and the regulation of hepatic growth hormone receptors and circulating GH binding protein in the pig. *Acta Endocrinol. (Coph)*, 126, 155-161.
- AMIT, T., BERGMAN, T., DASTOT, F., YODIM, M.B., AMSELEM, S., HOCHBERG, Z. (1997):  
A membrane-fixed truncated isoform of the human growth hormone receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 82, 3813-3817.
- ARGETSINGER, L.S. & CARTER-SU, C. (1996):  
Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol. Rev.*, 76, 1089-1107.
- ARGETSINGER, L.S., CAMPBELL, G.S., YANG, X., WITTHUHN, B.A., SILVENNOINEN, O., IHLE, J.N., CARTER-SU, C. (1993):  
Identification fo JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 74, 237-244.

- ARMSTRONG, J.D., ESBENSHADE, K.L., COFFEY, M.T., HEIMER, E., CAMPBELL, R., MOWLES, T., FELIX, A. (1990):  
Opioid control of growth hormone in the suckled sow is primarily mediated through growth hormone releasing factor. *Dom. Anim. Endocrinol.* 7, 191-198.
- ASHWELL, C.M., MCMURTRY, J.P., WANG, X.-H., ZHOU, Y., VASILATOS-YOUNKEN, R. (1999):  
Effects of growth hormone and pair-feeding on leptin mRNA expression in liver and adipose tissue. *Dom. Anim. Endocrinol.*, 17, 77-84.
- AUSUEBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K., Eds., GUEST Eds.: ALBRIGHT, L.M., COEN, D.M., VARKI, A., Series Eds.: BENSON CHANDA. *Current protocols in molecular biology* (1997). Greene publishing associates & Wiley-Interscience, John Wiley & son. Vol.1, 4.9.15, (suppl., 37).
- AXÉN, E. (1995):  
Purification from pig kidney of a microsomal cytochrome P<sub>450</sub> catalyzing 1 $\alpha$ -hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> *FEBS Letters* 375, 277-279.
- BALLAGI-PORDÁNY, ANDREA, BALLAGI-PORDÁNY, ANDRÁS, FUNA, K. (1991):  
Quantitative determination of mRNA phenotypes by the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 196, 89-94.
- BASSETT, N.S. & GLUCKMAN, P.D. (1986):  
Pulsatile growth hormone secretion in the ovine fetus and neonatal lamb. *J. Endocrinol.* 109, 307-312.
- BATCHELOR D.C., LEWIS, R.M., BREIER, B.H., GLUCKMAN, P.D., SKINNER, S.J.M. (1998):  
Fetal rat lung epithelium has functional growth hormone receptor coupled to tyrosine kinase activity and insulin-like growth factor binding protein-2 production. *J. Mol. Endocrinol.* 21, 73-84.
- BATHIA, P., TAYLOR, W.R., GREENBERG, A.H., WRIGHT, J.A. (1994):  
Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28s-Ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Anal. Biochem.* 216, 223-226.
- BAUER, M.K., BREIER, B.H., HARDING, J.E., VELDHUIS, J.D., GLUCKMAN, P.D. (1995):  
The fetal somatotrophic axis during long term maternal undernutrition in sheep: evidence for nutritional regulation in utero. *Endocrinol.* 136, 1250-1257.
- BAUER, M. & PARVIZI, N. (1996):  
Pulsatile and diurnal secretion of GH and IGF-I in the chronically catheterized pig fetus. *J. Endocrinol.* 149, 125-133.



- BAUER, M.K., HARDING, J.E., BASSETT, N.S., BREIER, B.H., OLIVER, M.H., GALLAHER, B.H., EVANS, P.C., WOODWALL, S.M., GLUCKMAN, P.D. (1998):  
Fetal growth and placental function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 140, 115-120.
- BAUER, M.K., BREIER, B.H., BLOOMFIELD, F.H., JENSEN, E.C., GLUCKMAN, P.D., HARDING, J.E. (1999):  
GH treatment of fetal sheep with placental insufficiency restores fetal IGF-I plasma concentrations, but has different actions on selected organs; *Growth hormone & IGF Research* 9, abstract OC13.3
- BAUER, M.K., HARDING, J.E., BREIER, B.H., GLUCKMAN, P.D. (2000):  
Exogenous GH infusion to late-gestational fetal sheep does not alter fetal growth and metabolism. *J. Endocrinol.* 166, 591-597.
- BAUMANN, G. (1995):  
Growth hormone binding to a circulating receptor fragment - the concept of receptor shedding and receptor splicing. *Exp. Clin. Endocrinol.* 103, 2-6.
- BAUMBACH, W.R. & BINGHAM, B. (1995):  
One class of the growth hormone (GH) receptor and binding protein messenger nucleic acid in rat liver, GHR1, is sexually dimorphic and regulated by GH. *Endocrinol.* 136, 749-760.
- BAUMBACH, W.R., HORNER, D.L., LOGAN, J.S. (1989):  
The growth hormone-binding protein in rat serum is an alternatively spliced form of the rat growth hormone receptor. *Genes and Development* 3, 1199-1205.
- BAZAN, J.F. (1990):  
Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6934-6938.
- BENNETT, P., LEVY, A., CARMIGNAC, D.F., ROBINSON, C.A. F., LIGHTMAN, S.L. (1996):  
Differential regulation of the growth hormone receptor gene: effects of dexamethasone and estradiol. *Endocrinol.* 137, 3891-3896.
- BIANDA, T., HUSSAIN, M.A., BOUILLON, R., FROESCH, E.R., SCHMID, C. (1997):  
Effects of short-term insulin-like growth factor-I or growth hormone treatment on bone turnover, renal phosphate reabsorption and 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> production in healthy man. *J. Int. Med.* 241, 143-150.
- BIANDA T., GLATZ, Y., BOUILLON, R., FROESCH, E.R., SCHMID, C. (1998):  
Effects of short-term insulin-like growth factor-I (IGF-I) or growth hormone (GH) treatment on bone metabolism and on production of 1,25-dihydroxycholecalciferol in GH-deficient adults. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 83, 81-87.

- BICK, T., AMIT, T., BARKEY, R.J., HERTZ, P., YODIM, M.B.H., HOCHBERG, Z. (1990):  
The interrelationship of growth hormone (GH), liver membrane GH receptor, serum GH-binding protein activity, and insulin-like growth factor 1 in the male rat. *Endocrinol.* 126, 1914-1920.
- BICK, T., YODIM, M.B.H., HOCHBERG, Z. (1989 a):  
Adaptation of liver membrane somatogenic and lactogenic growth hormone (GH) binding to the spontaneous pulsation of GH secretion in the male rat. *Endocrinol.* 125, 1711-1717.
- BICK, T., YODIM, M.B.H., HOCHBERG, Z. (1989 b):  
The dynamics of somatogenic and lactogenic growth hormone binding: internalization to golgi fractions in the male rat. *Endocrinol.* 125, 1718-1722.
- BILLESTRUP, N., ALLEVATO, G., NORSTEDT, G., MOLDRUP, A., NIELSEN, J.H. (1994):  
Identification of intracellular domains in the growth hormone receptor involved in signal transduction. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 206, 205-209.
- BINGHAM, B., OLDHAM, E.R., BAUMBACH, W.R. (1994):  
Regulation of growth hormone receptor and binding protein expression in domestic species. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 206, 195-199.
- BONINI, J.A. & HOFMANN, C. (1991):  
A rapid, accurate, nonradioactive method for quantitating RNA on agarose gels. *Biotechniques* 11, 708-710.
- BORTZ, J.D., ROTWEIN, P., DEVOL, D., BECHTEL, P.J., HANSEN, V.A., HAMMERMAN, M.R. (1988):  
Focal expression of insulin-like growth factor-I in rat kidney collecting duct. *J. Cell Biol.* 107, 811-819.
- BOUABOULA, M., LEGOUX P., PESSÉGUÉS, B., DELPECH, B., DUMONT, X., PIECHACZYK, M., CASELLAS, P.L., SHIRE, D. (1992):  
Standardization of mRNA titration using a polymerase chain reaction method involving co-amplification with a multispecific internal control. *J. Biol. Chem.* 267, 21830-21838.
- BOUILLON, R., OKAMURA, W.H., NORMAN, A.W. (1995):  
Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr. Rev.* 16, 200-257.
- BRAMELD, J. M., WELLER, P.A., SAUNDERS, J.C., BUTTERY, P.J. GILMOUR, R.S. (1995 a):  
Hormonal control of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor mRNA expression by porcine hepatocytes in culture; *J. Endocrinol.* 146, 239-245

- BRAMELD, J.M., WELLER, P.A., PELL, J.M., BUTTERY, P.J., GIMOUR, R.S. (1995 b):  
Ontogenic study of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor mRNA expression in porcine liver and skeletal muscle. *Anim. Sci.* 61, 333-339.
- BRAMELD, J.M., ATKINSON, J.L., SAUNDERS, J.C., PELL, J.M., BUTTERY, P.J., GILMOUR, R. S. (1996):  
Effects of growth hormone administration and dietary protein intake on insulin-like growth factor I and growth hormone receptor mRNA expression in porcine liver, skeletal muscle, and adipose tissue. *J. Anim. Sci.* 74, 1832-1841.
- BRAMELD, J.M., MOSTYN, A., DANDREA, J., STEPHENSON, T.J., DAWSON, J.M., BUTTERY, P.J., SYMONDS, M.E. (2000):  
Maternal nutrition alters the expression of insulin-like growth factors in fetal sheep liver and skeletal muscle. *J. Endocrinol.* 167, 429-437.
- BRANDSTETTER, A.M., PFAFFL, M.W., HOCQUETTE, J.F., GERRARD, D.E., PICARD, B., GEAY, Y., SAUERWEIN, H. (2000):  
Effects of muscle type, castration, age and compensatory growth rate on androgen receptor mRNA expression in bovine skeletal muscle. *J Anim. Sci.* 78, 629-637.
- BREIER, B.H., GLUCKMAN, P.D., BASS, J.J. (1988):  
The somatotrophic axis in young steers: influence of nutritional status and oestradiol-17 $\beta$  on hepatic high- and low-affinity somatotrophic binding sites. *J. Endocrinol.* 116, 169-177.
- BREIER, B. H., GLUCKMAN, P. D., BLAIR, H. T., McCUTCHEON, S. N. (1989):  
Somatotrophic receptors in hepatic tissue of the developing male pig. *J. Endocrinol.* 123, 25-31.
- BRIXEN, K., NIELSEN, H.K., BOUILLON, R., FLYVBJERG, A., MSEKILDE, L. (1992):  
Effects of short-term growth hormone treatment on PTH, calcitriol, thyroid hormones, insulin and glucagon. *Acta Endocrinol.* 127, 331-336.
- BROWN, A.J., DUSSO, A., SLATOPOLSKY, E. (1999):  
Vitamin D. *Am. J. Physiol.* 277, F157-F175.
- BRUNS, M.E.H., VOLLMER, S.S., BRUNS, D.E., OVERPECK, J. G. (1983):  
Human growth hormone increases intestinal vitamin D-dependent calcium-binding protein in hypophysectomized rats. *Endocrinol.* 113, 1387-1392.
- BUONOMO, F.C. & KLINDT, J. (1993):  
Ontogeny of growth hormone (GH), insulin-like growth factors (IGF-I) and IGF-II and IGF binding protein-II (IGFBP-II) in genetically lean and obese swine. *Dom. Anim. Endocrinol.* 10, 257-265.

- BURNSIDE, J., LIOU, S.S., COGBURN, L.A. (1991):  
Molecular cloning of the chicken growth hormone receptor complementary deoxyribonucleic acid: mutation of the gene in sex-linked dwarf chickens. *Endocrinol.* 128, 3183-3192.
- BURSTEIN, S., CHEN, I.-W., TSANG, R.C. (1983):  
Effects of growth hormone replacement therapy on 1,25-dihydroxyvitamin D and calcium metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 56, 1246-1251.
- BUSTIN, S.A. (2000):  
Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169-193.
- CALVO, E.L., BOUCHER, C., COULOMBE, Z., MORISSET, J. (1997):  
Pancreatic GAPDH gene expression during ontogeny and acute pancreatitis induced by caerulein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 636-640.
- CAMPBELL, G.S., CHRISTIAN, L.J., CARTER-SU, C.J. (1993):  
Evidence for involvement of the growth hormone receptor-associated tyrosine kinase in actions of growth hormone. *Biol. Chem.* 1993, 268, 7427-7434.
- CARE, A.D., ROSS, R., PICKARD, D.W., WEATHERBY, A.D., GAREL, J.M., MANNING, R.M., ALGROVE, J., PAPAPOULOS, S., O'RHIORDAN, R. (1982):  
Calcium homeostasis in the fetal pig. *J. Dev. Physiol.* 4, 85-106.
- CARLBERG, C. (1995):  
Mechanisms of nuclear signalling by vitamin D<sub>3</sub> - Interplay with retinoid and thyroid hormone signalling. *Eur. J. Biochem.* 231., 517-527.
- CARMIGNAC, D. F., GABRIELSSON, B. G., & ROBINSON, I.C. A. (1993):  
Growth hormone binding protein in the rat: effects of gonadal steroids. *Endocrinol.* 133, 2445-2452.
- CARROLL, J.A., VEUM, T.L., MATTERI, R.L. (1998):  
Endocrine responses to weaning and changes in post-weaning diet in the young pig. *Dom Anim Endocrinol.* 15, 183-194.
- CARTER-SU, C., ARGETSINGER, L.S., CAMPBELL, G.S., WANG, X., IHLE, J., WITTHUHN, B. (1994):  
The identification of JAK2 tyrosine kinase as a signaling molecule for growth hormone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 206, 210-215.
- CARTER-SU, C., RUI, L., HERRINGTON, J. (2000):  
Role of the tyrosine Kinase JAK2 in signal transduction by growth hormone. *Pediatr. Nephrol.* 14, 550-557.
- CAVERZASIO, J., MONTESSUIT, C., BONJOUR, J.P. (1990):  
Stimulatory effect of insulin-like growth factor-I on renal Pi transport and plasma 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Endocrinol.* 127, 453-459.

- CHALON, S. & GAREL, J.M. (1985):  
Plasma calcium control in the rat fetus. II. Influence of fetal hormones. *Biol. Neonate* 48, 323-328.
- CHAMBERLIN, M. & RING, J. (1973):  
Characterization of T7-specific ribonucleic acid polymerase-I. general properties of the enzymatic reactin and the template specificity of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 248, 2235-2244.
- CHAVEZ, L., HARMEYER, J., CHOE, S., OMDAHL, J. (2000).  
Molecular basis of pseudo vitamin D-deficiency rickets (PDDR) in the hannover pig model. In: *Vitamin D endocrine system. Structural, biological, genetic and clinical aspects*, 175-178, Norman, A.W., Bouillon, R., Thomasset, M. (eds.) Proceedings of the eleventh workshop on vitamin D, Nashville, Tennessee, USA.
- CHELLY, J., KAPLAN, J.-C., MAIRE, P., GAUTRON, S., KAHN, A. (1988):  
Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature*, 333, 858-860
- CHEN, H.-T., SCHULER, L.A., SCHULTZ, R.D. (1998):  
Growth hormone receptor and regulation of gene expression in fetal lymphoid cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 137, 21-29.
- CHEN, N.-Y., CHEN, W.Y., KOPCHICK, J.J. (1997):  
Liver and kidney growth hormone (GH) receptors are regulated differently in diabetic GH and GH antagonist transgenic mice. *Endocrinol.* 138, 1988-1994.
- CHERNAUSEK, S.D., UNDERWOOD, L.E., VAN WYK, J.J. (1982):  
Influence of hypothyroidism on growth hormone binding in rat liver. *Endocrinol.* 111, 1534-1538.
- CHIN, E. & BONDY, C. (1992):  
Insulin-like growth factor system gene expression in the human kidney. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 75, 962-968.
- CHIN, E., ZHOU, J., BONDY, C.A. (1992 a):  
Anatomical relationships in the patterns of insulin-like growth factor (IGF)- I, IGF binding protein-1, and IGF-I receptor gene expression in the rat kidney. *Endocrinol.* 130, 3237-3245.
- CHIN, E., ZHOU, J., BONDY, C.A. (1992 b):  
Renal growth hormone receptor gene expression: relationship to renal insulin-like growth factor system. *Endocrinol.* 131, 3061-3066.
- CHIPMAN, J.J., ZERWEKH, J., NICAR, M., MARKS, J., PAK, C.Y.C. (1980):  
Effect of growth hormone administration: reciprocal changes in serum  $1\alpha,25$  Dihydroxyvitamin D and intestinal calcium absorption. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51, 321-324.

- CHIRGWIN, J.M., PRZYBYLA, A.E., MACDONALD, R.J., RUTTER, W.J. (1979):  
Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in  
ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299.
- CHOI, H.K. & WAXMAN, D.J. (2000):  
Plasma growth hormone pulse activation of hepatic JAK-STAT5 signaling:  
developmental regulation and role in male-specific liver gene expression.  
*Endocrinol.* 141, 3245-3255.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (1987):  
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-  
chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- CHOU, Q., RUSSELL, M., BIRCH, D.E., RAYMOND, J., BLOCH, W. (1992):  
Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-  
number amplifications. *Nucl. Acids. Res.* 20, 1717-1723.
- CHOWHARY, B.P., ELLEGREN, H., HOHANSSON, M., ANDERSSON, L.,  
GUSTAVSSON, I. (1994):  
In situ hybridization mapping of the growth hormone receptor (GHR) gene  
assigns a linkage group (C9, FSA, GHR, and S0105) to chromosome 16 in pigs.  
*Mammalian Genome* 5, 160-162.
- CHUNG, C.S. & ETHEERTON, T. D. (1986):  
characterization of porcine growth hormone (pGH) binding to porcine liver  
microsomes: chronic administration of pGH induces pGH binding. *Endocrinol.*  
119, 780-786.
- CIOFFI, J.A., WANG, X., KOPCHICK, J.J. (1990):  
Porcine growth hormone receptor cDNA sequence. *Nucleic Acids Res.* 18,  
6451.
- COMBES, S., LOUVEAU, I., BONNEAU, M. (1997 a):  
Moderate food restriction affects skeletal muscle and liver growth hormone  
receptors differently in pigs. *J. Nutrition* 127, 1944-1949.
- COMBES, S., LOUVEAU, I., BONNEAU, M. (1997 b):  
Effect of GH administration on GH and IGF-I receptors in porcine skeletal  
muscle and liver in relation to plasma GH-binding protein. *J. of Endocrinol.* 155,  
19-26.
- CORDANO, P., HAMMON, H.M., MOREL, C., ZURBRIGGEN, A., BLUM, J.W.  
(2000):  
mRNA of insulin-like growth factor (IGF) quantification and presence of IGF  
binding proteins, and receptors for growth hormone, IGF-I and insulin,  
determined by reverse transcribed polymerase chain reaction, in the liver of  
growing and mature male cattle. *Dom. Anim. Endocrinol.* 19, 191-208.

- CORVILAIN, J. & ABRAMOW, M. (1962):  
Some effects of human growth hormone on renal hemodynamics and on tubular phosphate transport in man. *J. Clin. Invest.* 41, 1230-1235.
- COXAM, V., DAVICCO, M.J., DURAND, D., BAUCHART, D., LEFAIVRE, J., BARLET, J.P. (1992). The influence of parathyroid hormone-related protein on hepatic IGF-I production. *Acta Endocrinol (Copenh.)* 126, 430-433.
- CRAMER, S.C., BARNARD, R., ENGBERS, C., OGREN, L., TALAMANTES, F. (1992):  
Expression of the growth hormone receptor and growth hormone-binding protein during pregnancy in the mouse. *Endocrinol.* 131, 876-882.
- CUNNINGHAM, B. C., ULTSCH, M., DE VOS, A. M., MULKERRIN, M. G., CLAUSER, K. R., WELLS, J. A. (1991):  
Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science*, 254, 821-825.
- DARDENNE, O., PRUD'HOMME, J., ARABIAN, A., GLORIEUX, F.H., ST-ARNAUD, R. (2001):  
Targeted inactivation of the 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP27B1) creates an animal model of pseudovitamin D-deficiency rickets. *Endocrinol.* 142, 3135-3141.
- DASTOT, F., SOBRIER, M.L., DUQUESNOY, P., DURIEZ, B., GOOSSENS, M., AMSELEM, SA. (1996):  
Alternatively spliced forms in the cytoplasmic domain of the human growth hormone (GH) receptor regulate its ability to generate a soluble GH-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 10723-10728.
- DAUGHADAY, W.H. (2000):  
Growth hormone axis overview - somatomedin hypothesis. *Pediatr. Nephrol.* 14, 537-540.
- DAUGHADAY, W.H., ROTWEIN, P. (1989):  
Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr. Rev.* 10, 68-91.
- DAUNCEY, M.J., BURTON, K.A., WHITE, P., HARRISON, A.P., GILMOUR, R.S., DUCHAMP, C., CATTANEO, D. (1994):  
Nutritional regulation of growth hormone receptor gene expression. *FASEB J.* 8, 81-88.
- DAVEY, H.W., PARKS, S.-H., GRATTAN, D.R., MCLACHLAN, M.J., WAXMAN, D.J. (1999 a):  
STAT5b-deficient mice are growth hormone pulse-resistant. *J. Biol. Chem.* 274, 35331-35336.

- DAVEY, H.W., MCLACHLAN, M.J., WILKINS, R.J., HILTON, D.J., ADAMS, T.E. (1999 b):  
STAT5b mediates the GH-induced expression of SOCS-2 and SOCS-3 mRNA in liver. *Mol. Cell. Endocrinol.* 158, 111-116.
- DAVEY, H.W., XIE, T., MCLACZLAN, M.J., WILKINS, R.J., WAXMAN, D.J., GRATTAN, D.R. (2001):  
Stat 5b is required for GH-induced liver IGF-I gene expression. *Endocrinol.* 142, 3836-3841.
- DAVIS, M.J.J., BAILEY, C.S., SMITH II, C.K. (1997):  
Use of internal controls to increase quantitative capabilities of the ribonuclease protection assay. *Biotechniques* 23, 280-285.
- DAY, D.A. & TUIITE, M.F. (1998):  
Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *J. Endocrinol.* 157, 361-371.
- DE LEEUW, W.J.F., SLAGBOOM, P.E., VIJG, J. (1989). Quantitative comparison of mRNA levels in mammalian tissues: 28S ribosomal RNA level as an accurate internal control. *Nucleic Acid Res.* 17, 10137-10138.
- D'ERCOLE, A.J., STILES, A.D., UNDERWOOD, L.E. (1984):  
Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 935-939.
- DE VOS, A.M., ULTSCH, M., & KOSSIAKOFF, A.A. (1992):  
Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255, 306-312.
- DELUCA, H.F. (1984):  
The metabolism, physiology, and function of vitamin D. In R. Kumar (Eds.), *Vitamin D, basic and clinical aspects* (pp. 1-68). Boston/ The Hague/ Dordrecht/ Lancaster: Martinus Niihof Publishing.
- DELUCA, H.F., KRISINGER, J., DARWISH, H. (1990):  
The vitamin D system: 1990. *Kindeg Int.* 38 (suppl. 29), S-2-S-8.
- DELVIN, E.E., GILBERT, M., PERE, M.C., GAREL. J.M. (1988):  
In vivo metabolism of calcitriol in the pregnant rabbit doe. *J. Dev. Physiol.* 10, 451-459.
- DENIS, I., THOMASSET, M., POINTILLART, A. (1994):  
Influence of exogenous porcine growth hormone on vitamin D metabolism and calcium and phosphorus absorption in intact pigs. *Calcif. Tissue Int.* 54, 489-492.



- DOMENÉ, H., KRISHNAMURTHI, K., ESHET, R., GILAD, I., LARON, Z., KOCH, I., STANNARD, B., CASSORLA, F., ROBERTS JR., C.T., LEROITH, D. (1993): Growth hormone (GH) stimulates insulin-like growth-factor I (IGFI) and IGF-I-binding Protein-3, but not GH receptor gene expression in livers of juvenile rats. *Endocrinol.* 133, 675-682.
- DOMENÉ, H.M., CASSORLA, F., WERNER, H., ROBERTS, C.T., LEROITH, D. (1995): Rat growth hormone receptor / growth hormone-binding protein mRNAs with divergent 5' -untranslated regions are expressed in a tissue-specific manner. *DNA Cell Biol.* 14, 195-204.
- DUBREUIL, P., PELLETIER, G., PETITCLERC, D., LAPIERRE, H., COUTURE, Y., BRAZEAU, P., GAUDREAU, P., MORISSET, J. (1987): Influence of age and sex on basal secretion of growth hormone (GH) and on GH-induced release by porcine GH-releasing factor pGHR(1-29NH<sub>2</sub>) in growing pigs. *Dom. Anim. Endocrinol.* 4, 299-307.
- DUCHAMP, C., BURTON, K.A., HERPIN, P., DAUNCEY, M.J. (1994): Perinatal ontogeny of porcine nuclear thyroid hormone receptors and its modulation by thyroid status. *Am. J. Physiol.*, 267, E687-E693.
- DUCHAMP, C., BURTON, K.A., DAUNCEY, M.J. (1996): Perinatal ontogeny of porcine growth hormone receptor gene expression is modulated by thyroid status. *Eur. J. Endocrinol.* 134, 524-531.
- DUFVA, M., SVENNINGSSON, A., HANSSON, G.K. (1995): Differential regulation of macrophage scavenger receptor isoforms: mRNA quantification using the polymerase chain reaction. *J. Lipid Res.* 36, 2282-2290.
- DUNSHEA, F.R., KING, R.H., OWENS, P.C., WALTON, P.E. (1999): Moderate doses of porcine somatotropin do not increase plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) or IGF binding protein-3. *Dom. Anim. Endocrinol.* 16, 149-157.
- EDENS, A., SOUTHARD, J.N., TALAMANTES, F. (1994): Mouse growth hormone-binding protein and growth hormone receptor transcripts are produced from a single gene by alternative splicing. *Endocrinol.* 135, 2802-2805.
- EDENS, A. & TALAMANTES, F. (1998): Alternative processing of growth hormone receptor transcripts. *Endocr. Rev.* 19, 559-582.
- EDMONDSON, S.R., WERTHER, G.A., RUSSELL, A., LEROITH, D., ROBERTS JR, C.T., BECK, F. (1995): Localization of growth hormone receptor/binding protein messenger ribonucleic acid (mRNA) during rat fetal development: relationship to insulin-like growth factor-I mRNA. *Endocrinol.* 136, 4602-4609.

- ELLENDORFF, F., PARVIZI, N., ELSAESSER, F., SMIDT, D. (1977):  
The miniature pig as an animal model in endocrine and neuroendocrine studies of reproduction. *Lab. Anim. Sci.* 27, 822-830.
- ELSAESSER, F., DRATH, S. (1995):  
The potential of immuno-neutralization of somatostation for improving pig performance. *Livestock prod. sci.* 42, 255-263.
- ELSAESSER, F. (2001):  
Stimulation of porcine pituitary luteinizing hormone release by galanin: putative auto/paracrine regulation. *Neuroendocrinol.* 74, 288-298.
- EZZAT, S., LAKS, D., OSTER, J., MELMED, S. (1991):  
Growth hormone regulation in primary fetal and neonatal rat pituitary cell cultures: the role of thyroid hormone. *Endocrinol.* 128, 937-943.
- FELD, S. & HIRSCHBERG, R. (1996):  
Growth hormone, the insulin-like growth factor system, and the kidney. *Endocr. Rev.* 17, 423-480.
- FLEET, J.C., BRUNS, M.E., HOCK, J.M., WOOD, R.J. (1994):  
Growth hormone and parathyroid hormone stimulate intestinal calcium absorption in aged female rats. *Endocrinol.* 134, 1755-1760.
- FLYVBJERG, A., BENNETT, W.F., RASCH, R., KOPCHICK, J.J. (1999):  
Inhibitory effect of a growth hormone receptor antagonist (G120K-PEG) on renal enlargement, glomerular hypertrophy, and urinary albumin excretion in experimental diabetes in mice. *Diabetes* 48, 377-382.
- FOSS, D.L., BAARSCH, ;M.J., MURTAUGH, M.P. (1998):  
Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and  $\beta$ -actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Anim. Biotechnol.* 9, 67-78.
- FRANK, S.J., MESSINA, J.L., BAUMANN, G., BLACK, R.A., BERTICS, P.J. (2000):  
Insights into modulation of (and by) growth hormone signaling. *J. Lab. Clin. Med.* 136, 14-20.
- FREEMAN, W.M., WALKER, S.J., VRANA, K.E. (1999):  
Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential. *Biotechniques*, 26, 112-125.
- FRIEDMAN, L., GAINES, D.W., NEWELL, R.F., SMITH, M.C., BRAUNBERG, R.C., FLYNN, T.J., O'DONNELL, JR., M.W. (1995):  
Growth patterns in selected organs of the miniature swine as determined by gross macromolecular composition. *J. Anim. Sci.* 73, 1340-1350.
- FRIEDMAN, P.A. & GESEK, F.A. (1993):  
Vitamin D<sub>3</sub> accelerates PTH-dependent calcium transport in distal convoluted tubule cells. *Am. J. Physiol.* 265, F300-F308.

- GABRIELSSON, B.G., CARMIGNAC, D.F., FLAVELL, D.M., ROBINSON, A.F. (1995):  
Steroid regulation of growth hormone (GH) receptor and GH-binding protein messenger ribonucleic acids in the rat. *Endocrinol.* 136, 209-217.
- GARCÍA-ARAGÓN, J., LOBIE, P.E., MUSCAT, G.E.O., GOBIUS, K.S., NORSTEDT, G., WATERS, M.J. (1992):  
Prenatal expression of the growth hormone (GH) receptor/binding protein in the rat: a role for GH in embryonic and fetal development?. *Development* 114, 869-876.
- GARCIA-VILLALBA, P., JIMENEZ-LARA, A.M., ARANDA, A. (1996):  
Vitamin D interferes with transactivation of the growth hormone gene by thyroid hormone and retinoic acid. *Mol. Cell. Biol.*, 16, 318-327.
- GATTEI, V., CELETTI, A., CERRATO, A., DEGAN, M., DE IULIIS, A., ROSSI, M., CHIAPPETTA, G., CONSALES, C., IMPROTA, S., ZAGONEL, V., ALDINUCCI, D., AGOSTI, V., SANTORO, M., VECCHIO, G., PINTO, A., GRIECO, M. (1997):  
Expression of the RET receptor tyrosine kinase and GDNFR- $\alpha$  in normal and leukemic human hematopoietic cells and stromal cells of the bone marrow microenvironment. *Blood* 89, 2925-2937.
- GERARD, G.F. & GRANDGENETT, D.P. (1975):  
Purification and characterization of the DNA polymerase and RNase H activities in moloney murine sarcoma-leukemia virus. *J. Virol.* 15, 785-797.
- GERTLER, A., GROSCLAUDE, J., STRASBURGER, C.J., NIR, S., DJIANE, J. (1996):  
Real-time kinetic measurements of the interactions between lactogenic hormones and prolactin-receptor extracellular domains from several species support the model of hormone-induced transient receptor dimerization. *J. Biol. Chem.* 271, 24482-24491.
- GERTNER, J.M., HORST, R.L., BROADUS, A.E., RASMUSSEN, H., GENEL, M. (1979):  
Parathyroid function and vitamin D metabolism during human growth hormone replacement. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 49, 185-188.
- GILLILAND, G., PERRIN, S., BLANCHARD, K., BUNN, H.F. (1990):  
Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantification by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 2725-2729.
- GIUDICE, L.C. (1992):  
Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr. Rev.* 13, 641-669.
- GIUSTINA, A. & VELDHUIS, J.D. (1998):  
Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr. Rev.* 19, 717-779.

- GLASEL, J.A. (1995):  
Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm / 280 nm absorbance ratios. *Biotechniques* 18, 62-63.
- GLASS, C.K. (1994):  
Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heteromers. *Endocr. Rev.* 15, 391-407.
- GLUCKMAN, P.D., GRUMBACH, M.M., KAPLAN, S.L. (1981):  
The neuroendocrine regulation and function of growth hormone and prolactin in the mammalian fetus. *Endocr. Rev.* 2, 363-395.
- GLUCKMAN, P.D., BUTLER, J.H., ELLIOTT, T.B. (1983):  
The ontogeny of somatotrophic binding sites in ovine hepatic membrane. *Endocrinol.* 112, 1607-1612.
- GODOWSKI, P.J., LEUNG, D.W., MEACHAM, L.R., GALGANI, J.P., HELLMISS, R., KERET, R., ROTWEIN, P.S., PARKS, J.S., LARON, Z., WOOD, W.I. (1989):  
Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 8083-8087.
- GOFF, J.P., CAPERNA, T.J., STEELE, N.C. (1990):  
Effects of growth hormone administration on vitamin D Metabolism and vitamin D receptors in the pig. *Dom. Anim. Endocrinol.* 7, 425-435.
- GRANZ, S., ELLENDORFF, F., GROSSMANN, R., KATO, Y., MÜHLBAUER, E., ELSAESSER, F. (1997):  
Ontogeny of growth hormone and LH  $\beta$ - and alpha-subunit mRNA levels in the porcine fetal and neonatal anterior pituitary. *J Neuroendocrinol.* 9, 439-449.
- GRAY, R.W., GARTHWAITE, T.L., PHILLIPS, L.S. (1983):  
Growth hormone and triiodothyronine permit an increase in plasma 1,25(OH)<sub>2</sub>D concentration in response to dietary phosphate deprivation in hypophysectomized rats. *Calcif. Tissue Int.* 35, 100-106.
- GRAY, R.W. (1987):  
Evidence that somatomedins mediate the effect of hypophosphatemia to increase serum 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> levels in rats. *Endocrinol.* 121, 504-512.
- HADDAD JR., J.G., BOISSEAU, V., AVIOLI, L.V. (1971):  
Placental transfer of vitamin D<sub>3</sub> and 25-hydroxycholecalciferol in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* 77, 908-915.
- HALFORD, W.P. (1999):  
The essential prerequisites for quantitative RT-PCR. *Nature Biotechnol.*, 17, 835.

- HALLORAN, B.P. & DELUCA, H.F. (1980):  
Calcium transport in small intestine during early development: role of vitamin D. *Am. J. Physiol.* 239, G473-G479.
- HAN, V.K.M., ÉRCOLE, A.J., LUND, P.K. (1987):  
Cellular location of somatomedin (insulin-like growth factor) messenger RNA in the human fetus. *Science* 236, 193-197.
- HAN, V. K.M., LUND, P.K., LEE, D.C., D'ERCOLE, A.J. (1988):  
Expression of somatomedin/ insulin-like growth factor messenger ribonucleic acids in the human fetus: identification, characterization, and tissue distribution. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 66, 422-429.
- HARBISON, M.D. & GERTNER, J.M. (1990):  
Permissive action of growth hormone on the renal response to dietary phosphorus deprivation. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 70, 1035-1040.
- HARMEYER, J., VON GRABE, C., WINKLER, I. (1982):  
Pseudovitamin D deficiency rickets in pigs. *Expl. Biol. Med.*, 7, 117-125.
- HARMEYER, J. (1991).  
Die Bedeutung von Tiermodellen bei der Erforschung menschlicher Krankheiten; drei Beispiele von Erkrankungen des Skeletts. In *Qualitätskriterien der Versuchstierforschung*, Gärtner, K. (Hrsg.), 307-374., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland.
- HARRELL, R.J., THOMAS, M.J., BOYD, R.D., CZERWINSKI, S.M., STEELE, N.C., BAUMANN, D.E. (1999):  
Ontogenic maturation of the somatotropin/ insulin-like growth factor axis. *J. Anim. Sci.* 77, 2934-2941.
- HARVEY, S. & HULL, K.L. (1997):  
Growth hormone. A paracrine growth factor?. *Endocrine* 7, 267-279.
- HARVEY, S., JOHNSON, C.D.M., SHARMA, P., SANDERS, E.J., HULL, K.L. (1998):  
Growth hormone: a paracrine growth factor in embryonic development?. *Comp. Biochem. Physiol. part C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 119, 305-315.
- HARVEY, S., JOHNSON, C.D.M., SANDERS, E.J. (2000):  
Extra-pituitary growth hormone in peripheral tissues of early chick embryos. *J. Endocrinol.* 166, 489-502.
- HARVEY, S., JOHNSON, C.D., SANDERS, E.J. (2001):  
Growth hormone in neural tissues of the chick embryo. *J. Endocrinol.* 169, 487-498.
- HAUSER, S.D., MCGRATH, M.F., COLLIER, R.J., KRIVI, G.G. (1990):  
Cloning and in vivo expression of bovine growth hormone receptor mRNA. *Mol. Cell. Endocrinol.* 72, 187-200.

- HAUSMAN, G.J., CAMPION, D.R., MCNAMARA, J.P., RICHARDSON, R.L., MARTIN, R.J. (1981):  
Adipose tissue development in the fetal pig after decapitation. *J. Anim. Sci.* 53, 1634-44.
- HAUSMAN, G.J. (1989):  
Histochemical studies of muscle development in decapitated and hypophysectomized pig fetuses: blood vessel development. *J. Anim. Sci.*, 67, 1367-74.
- HAUSMAN, D. B., HAUSMAN, G. J., MARTIN, R. J. (1993):  
Influence of the pituitary on lipolysis and lipogenesis in fetal pig adipose tissue. *Horm. Metab. Res.* 25, 17-20.
- HE, Q., MARJAMÄKI, M., SOINI, H., MERTSOLA, J., VIIJANEN, M.K. (1994):  
Primers are decisive for sensitivity of PCR. *Biotechniques* 17, 82-87.
- HEAP, D., LUCY, M.C., COLLIER, R.J., BOYD, C.K., WARREN, W.C. (1995):  
Rapid communication: nucleotide sequence of the promoter and first exon of the somatotropin receptor gene in cattle. *J. Anim. Sci.* 73, 1529.
- HEAP, D., COLLIER, R.J., BOYD, C.K., LUCY, M.C. (1996):  
Expression of alternate growth hormone receptor messenger RNA in ovary and uterus of cattle. *Dom. Anim. Endocrinol.* 13, 421-430.
- HEINRICHS, C., YANOVSKI, J.A., ROTH, A.H., YU, Y.M., DOMENÉ, H.M., YANO, K., CUTLER, G.B.J., BARON, J. (1994):  
Dexamethasone increases growth hormone receptor messenger ribonucleic acid levels in liver and growth plate. *Endocrinol.* 135, 1113-1118.
- HENEGARIU, O., HIRSCHMANN, P., KILIAN, K., KIRSCH, S., LENGAUER, C., MAIWALD, R., MIELKE, K., VOGT, P. (1994):  
Rapid screening of the Y chromosome in idiopathic sterile men, diagnostic for deletions in AZF, a genetic Y factor expressed during spermatogenesis. *Andrologia* 26, 97-106.
- HENEGARIU, O., HEEREMA, N.A., DLOUHY, S.R., VANCE, G.H., VOGT, P.H. (1997):  
Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *Biotechniques* 23, 504-511.
- HENNEMAN, P.H., FORBES, A.P., MOLDAWER, M., DEMPSEY, E.F., CARROLL, E.L. (1960):  
Effects of human growth hormone in man. *J. Clin. Invest.* 39, 1223-1238.
- HENRY, H.L., (1992):  
Vitamin D hydroxylases. *J. Cell. Biochem.* 49, 4-9.

- HEWISON, M., ZEHNDER, D., BLAND, R., STEWART, P.M. (2000):  
1 $\alpha$ -hydroxylase and the action of vitamin D. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 141-148.
- HILL, D.J., FREEMARK, M., STRAIN, A.J., HANDWERGER, S., MILNER, R.D.G. (1988):  
Placental lactogen and growth hormone receptor in human fetal tissues: relationship to fetal plasma human placental lactogen concentrations and fetal growth. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66, 1283-1290.
- HILL, D.J., CLEMMONS, D.R., WILSON, S., HAN, V.K.M., STRAIN, A.J., MILNER, R.D.G. (1989):  
Immunological distribution of one form of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein and IGF peptides in human fetal tissues. *J. Mol. Endocrinol.* 2, 31-38.
- HILL, D.J., RILEY, S.C., BASSETT, N.S., WATERS, M.J. (1992):  
Localization of the growth hormone receptor, identified by immunocytochemistry, in second trimester human fetal tissues and in placenta throughout gestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75, 646-650.
- HILL, D. J. (1992):  
What is the role of growth hormone and related peptides in implantation and development of the embryo and fetus. *Horm. Res.*, 38 (suppl. 1), 28-34.
- HOCHBERG, Z., BICK, T., HAREL, Z. (1990):  
Alterations of human growth hormone binding by rat liver membranes during hypo- and hyperthyroidism. *Endocrinol.* 126, 325-329.
- HOCHBERG, Z., BOROCHOWITZ, Z., BENDERLI, A., VARDI, P., OREN, S., SPIRER, Z., HEYMAN, I., WEISMAN, Y. J. (1985):  
Does 1,25-Dihydroxyvitamin D participate in the regulation of hormone release from endocrine glands?. *Clin. Endocrinol. Metab.* 60, 57-61.
- HOOGENBOEZEM, T., DEGENHART, H.J., DE MUINICK KEIZER-SCHRAMA, S.M.P.F., BOUILLON, R., GROSE, W.F.A., HACKENENG, W.H.L., VISSER, H.K.A. (1989):  
Vitamin D metabolism in breast-fed infants and their mothers. *Pediatric Res.* 25, 623-628.
- HU, A.-L.W., D'ALESSIO, J.M., GERARD, G.F., KULLAMAN, J. (1991):  
RT-catalyzed first-strand synthesis and the amplification of beta-actin mRNA using the polymerase chain reaction. *Focus* 13, 26-29.
- HULL, K.L. & HARVEY, S. (2000):  
Growth hormone: a reproductive endocrine-paracrine regulator?. *Rev. Reprod.* 120, 175-182.
- HWA, V., OH, Y. & ROSENFELD, R.G. (1999):  
The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr. Rev.* 20, 761-787.

- IDA, K., SHINKI, T., YAMAGUCHI, A., DELUCA, H.F., KUROKAWA, D., SUDA, T. (1995):  
A possible role of vitamin D receptors in regulating vitamin D activation in the kidney. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 92, 6112-6116.
- ILKBAHAR, Y.N., WU, K., THORDARSON, G., TALAMANTES, F. (1995):  
Expression and distribution of messenger ribonucleic acids for growth hormone (GH) receptor and GH-binding protein in mice during pregnancy. *Endocrinol.* 136, 386-392.
- INNIS, M.A. & GELFAND, D.H. (1990):  
Optimization of PCRs. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J..PCR protocols: a guide to methods and applications. 3-12. Academic Press Inc., San Diego, California.
- ISAKSSON, O.G., JANSSON, J.O., GAUSE, I.A. (1982):  
Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* 216, 1459-1464.
- ISAKSSON, O.G., EDEN, S., JANSSON, J.O. (1985):  
Mode of action of pituitary growth hormone on target cells. *Ann. Rev. Physiol.* 47, 483-499.
- IVELL, R. (1998):  
A question of faith - or the philosophy of RNA controls. *J. Endocrinol.* 159, 197-200.
- JACOBSON, J.D., CROFFORD, L.J., SUN, L., WILDER, R.L. (1998):  
Cyclical expression of GnRH and GnRH receptor mRNA in lymphoid organs. *Neuroendocrinol.* 67, 117-125.
- JAINUDEEN, M.R., HAFEZ, E.S.E. (1993):  
Gestation, prenatal physiology and parturition. In: Hafez, E.S.E.(editor). *Reproduction in farm animals*. Lea & Febiger, Malvern, Pennsylvania, USA.
- JANSSON, J.-O., EKBERG, S., ISAKSSON, O. (1985):  
Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocr. Rev.* 6, 128-150.
- JEFFRAY, T.M., MATTEWS, S.G., HAMMOND, G.L., CHALLIS, J.R.G. (1998):  
Divergent changes in plasma ACTH and pituitary POMC mRNA after cortisol administration to late-gestation ovine fetus. *Am J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* 37, E417-E425.
- JI, S., GUAN, R., FRANK, S.T., MESSINA, J.L. (1999):  
Insulin inhibits growth hormone signaling via the growth hormone receptor / JAK2/ STAT5B pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 13434-13442.
- JIANG, H., OKAMURA, C.S., LUCY, M.C. (1999):  
Isolation and characterization of a novel promoter for the bovine growth hormone receptor gene. *J. Biol. Chem.* 274, 7893-7900.



- JIANG, H., OKAMURA, C.S., BOYD, C.K., LUCY, M.C. (2000).: Identification of Sp1 as the transcription factor for the alternative promotor P2 of the bovine growth hormone receptor gene. *J. Mol. Endocrinol.* 24, 203-214.
- JIANG, H. & LUCY, M.C. (2001): Variants of the 5'-untranslated region of the bovine growth hormone receptor mRNA: isolation, expression and effects on translational efficiency. *Gene* 265, 45-53.
- JONES, J.I. & CLEMMONS, D.R. (1995): Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 16. 3-34.
- KAJI, H. & HINKLE, P. (1989): Attenuation of thyroid hormone action by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in pituitary cells. *Endocrinol.* 124, 930-936.
- KAPLAN, S.L., GRUMBACH, M.M., SHEPHERD, T.H. (1972): The ontogenesis of human fetal hormones: I. Growth hormone and insulin. *J. Clin. Invest.* 51, 3080-3091.
- KATO, S. (2001): Editorial: Vitamin D 1 $\alpha$ -hydroxylase knockout mice as a hereditary rickets animal model. *Endocrinol.* 142, 2734-2735.
- KLEIN, C. (1999): Einfluß von PTHrP (Parathyroid Hormone-related peptide) in der Milch auf den intestinalen Calciumtransport bei Saugferkeln. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, 1999.
- KLEIN, C. (2001): PTHrP und Milch stimulieren einen Vitamin D-unabhängigen aktiven Calciumtransport im Darm von Saugferkeln. Ph.D-These, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- KLEINMAN, L.I. (1975): Fetal renal function and water and electrolyte balance. In: Hafez, E.S.E.(editor). *The mammalian fetus: comparative biology and methodology.* Charls C. Thomas, Springfield, Illinois, USA.
- KLEMPT, M., BINGHAM, B., BREIER, B.H., BAUMBACH, W.R., GLUCKMAN, P.D. (1993): Tissue distribution and ontogeny of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and ligand binding to hepatic tissue in the midgestation sheep fetus. *Endocrinol.* 132, 1071-1077.
- KLINDT, J. & STONE, R.T. (1984): Porcine growth hormone and prolactin: Concentrations in the fetus and secretory patterns in the growing pig. *Growth* 48, 1-15.

- KNABEL, M., KÖLLE, S., SINOWATZ, F. (1998):  
Expression of growth hormone receptor in the bovine mammary gland during prenatal development. *Anat. Embryol.* 198, 163-169.
- KOBAYASHI, Y., BOYD, C.K., BRACKEN, C.J., LAMBERSON, W.R., KEISLER, D.H., LUCY, M.C. (1999):  
Reduced growth hormone receptor (GHR) messenger ribonucleic acid in liver of periparturient cattle is caused by a specific down-regulation of GHR 1A that is associated with decreased insulin-like growth factor I. *Endocrinol.* 140, 3947-3954.
- KÖLLE, S., SINOWATZ, F., BOIE, G., LINCOLN, D., PALMA, G., STOJKOVIC, M., WOLF, E. (1998):  
Topography of growth hormone receptor expression in the bovine embryo. *Histochem. Cell Biol.* 109, 417-419.
- KÖLLE, S., STOJKOVIC, M., PRELLE, K., WATERS, M., WOLF, E., SINOWATZ, F. (2001):  
Growth hormone (GH)/GH receptor expression and GH-mediated effects during early bovine embryogenesis. *Biol. Reprod.* 64, 1826-1834.
- KOTEWICZ, M.L., SAMPSON, C.M., D'ALESSIO, J.M., GERARD, G.F. (1988):  
Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity. *Nucl. Acids Res.* 16, 265-277.
- KOVACS, C.S. & KRONENBERG, H.M. (1997):  
Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puberperium and lactation. *Endocr. Rev.* 18, 832-872.
- KRAFT, L.A., BAKER, P.K., RICKS, C.A., LANCE, V.A., MURPHY, W.A., COY, D.H. (1985):  
Stimulation of growth hormone release in anesthetized and conscious pigs by synthetic human pancreatic growth hormone-releasing factor [hpGRF(1-29)-NH<sub>2</sub>]. *Dom. Anim. Endocrinol.* 2, 133-139.
- KRATZSCH, J., WU, Z., KIESS, W., DEHMEL, B., BOSSE-HENCK, A., REUTER, W., PFLAUM, C.D., STRASBURGER, C.J. (2001):  
The exon 3-retaining and the exon 3-deleted forms of the growth hormone-binding protein (GHBP) in human serum are regulated differently. *Clin. Endocrinol.* 54, 61-68.
- KUES, W.A., ANGER, M., CARNWATH, J.W., PAUL, D., MOTLIK, J., NIEMANN, H. (2000). Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. *Biol. Reprod.* 62, 412-419.
- KUMAR, R., COHEN, W.R., SILVA, P., EPSTEIN, F. H. (1979):  
Elevated 1,25-dihydroxyvitamin D plasma levels in normal human pregnancy and lactation. *J. Clin. Invest.* 63, 342-344.

- KURIHARA, N., ISHIZUKA, S., KIYOKI, M., HAKETA, Y., IKEDA, K., KUMEGAWA, M. (1986):  
Effects of 1,25dihydroxyvitamin D3 on osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Endocrinol.* 118, 940-947.
- LACHENMAIER-CURRLE, U. & HARMEYER, J. (1988):  
Intestinal absorption of calcium in newborn piglets. *Biol. Neonate*, 53, 327-335.
- LACHENMAIER-CURRLE, U. & HARMEYER, J. (1989):  
Placental transport of calcium and phosphorus in pigs. *J. Perinat. Med.* 17, 127-136.
- LACROIX, M.-C., DEVINOY, E., CASSY, S., SERVELY, J.-L., VIDAUD, M., KANN, G. (1999):  
Expression of growth hormone and its receptor in the placental and fetomaternal environment during early pregnancy in sheep. *Endocrinol.*, 140, 5587-5597.
- LANTINGA-VAN LEEUWEN, I.S., OUDSHOORN, M, MOL J.A. (1999):  
Canine mammary growth hormone gene transcription initiates at the pituitary-specific start site in the absence of Pit-1. *Mol. Cell. Endocrinol.* 150, 121-128.
- LAZAR, M.A. (2000):  
Editorial: A Sweetheart deal for thyroid hormone. *Endocrinol.* 141, 3055-3056.
- LE ROITH, D., WERNER, H., BEITNER-JOHNSON, D., ROBERTS JR., C.T. (1995):  
Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr. Rev.* 16, 143-163.
- LE ROITH, D., BONDY, C., YAKAR, S., LIU, J.-L., BUTLER, A. (2001):  
The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr. Rev.* 22, 53-74.
- LEE, C. Y., CHUNG, C. S., SIMMEN, F. A. (1993):  
Ontogeny of the porcine insulin-like growth factor system. *Mol. Cell. Endocrinol.* 93, 71-80.
- LEUNG, D.W., SPENCER, S.A., CACHIANES, G., HAMMONDS, R.G., COLLINS, C., HENZEL, W.J., BARNARD, R., WATERS, M.J., WOOD, W.I. (1987):  
Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature* 330, 537-543.
- LEUNG, K.-C., RAJKOVIC, I.A., PETERS, E., MARKUS, I., VAN WYK, J.J., HO, K.K.Y. (1996):  
Insulin-like growth factor 1 and insulin down-regulate growth hormone (GH) receptors in rat osteoblasts: evidence for a peripheral feedback loop regulating GH action. *Endocrinol.* 137, 2694-2702.

- LEUNG, K.-C., WATERS, M.J., MARKUS, I., BAUMBACH, W.R., HO, K.K.Y. (1997):  
Insulin and insulin-like growth factor-I acutely inhibit surface translocation of growth hormone receptors in osteoblasts: A novel mechanism of growth hormone receptor regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 11381-11386.
- LEWIS, A.J., WESTER, T.J., GURRIN, D.G., DAUNCEY, M.J. (2000):  
Exogenous growth hormone induces somatotrophic gene expression in neonatal liver and skeletal muscle. *Am J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 278, R838-R844.
- LI, J., OWENS, J.A., OWENS, P.C., SAUNDERS, J.C., FOWDEN, A.L., GILMOUR, R.S. (1996):  
The ontogeny of hepatic growth hormone receptor and insulin-like growth factor I gene expression in the sheep fetus during late gestation: developmental regulation by cortisol. *Endocrinol.* 137, 1650-1657.
- LI, J., GILMOUR, R.S., SAUNDERS, J.C., DAUNCEY, M.J., FOWDEN, A.L. (1999):  
Activation of the adult mode of ovine growth hormone receptor gene expression by cortisol during late fetal development. *FASEB J.* 13, 545-552.
- LIMA M.S., KALLFELZ F., KROOK L., NATHANIELSZ P.W. (1993):  
Humeral skeletal development and plasma constituent changes in fetuses of ewes maintained on a low calcium diet from 60 days of gestation. *Calcif. Tissue Int.* 52, 283-290.
- LIU, J., CARROLL, J.A., MATTERI, R.L., LUCY, M.C. (2000):  
Expression of two variants of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid in porcine liver. *J. Anim. Sci.*, 78, 306-317.
- LIU, N., MERTANI, H. C., NORSTEDT, G., TÖRNELL, J., LOBIE, P. E. (1997):  
Mode of the autocrine/paracrine mechanism of growth hormone action. *Experimental Cell Res.* 237, 196-206.
- LODGE, G.A., SARKAR, N.K., FRIEND, D.W. (1977):  
Hyperplastic and hypertrophic growth in brain, liver and muscle of undernourished suckled pigs. *J. Anim. Sci.* 45, 1346-1352.
- LOUVEAU, I., BONNEAU, M., SALTER, D.N. (1991).  
Age-related changes in plasma porcine growth hormone (GH) profiles and insulin-like growth factor-I (IGF-I) concentrations in large white and meishan pigs. *Reprod. Nutr. Dev.* 31, 205-216.
- LOUVEAU, I. & BONNEAU, M. (1996).  
Effect of growth hormone infusion on plasma insulin-like growth factor-I in meishan and large white pigs. *Reprod. Nutr. Dev.*, 36, 301-310.

- LU, C., SCHARTZBAUER, G., SPERLING, M.A., DEVASKAR, S.U., THAMOTHARAN, S., ROBBINS, P.D., MCTIERNAN, C.F., LIUI, J.-L., JIANG, J., FRANK, S.J., MENON, R.K. (2001).  
Demonstration of direct effects of growth hormone on neonatal Cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 276, 22892-22900.
- LUCY, M.C., BOYD, C.K., KOENIGSFELD, A.T., OKAMURA, C.S. (1998).  
Expression of somatotropin receptor messenger ribonucleic acid in bovine tissues. *J. Dairy Sci.* 81, 1889-1895.
- MA, E., KLEMPF, N., GROSSMANN, R., IVELL, R., KATO, Y., ELLENDORFF, F. (1996):  
Expression of GH, TSH $\beta$ , LH $\beta$ , and FSH $\beta$  genes during fetal pituitary development in the pig. *Exp. Clin. Endocr. Diab.* 104, 464-472.
- MAES, M., UNDERWOOD, L.E., KETELSLEGERS, J.M. (1986):  
Low serum somatomedin-C in insulin-dependent diabetes: evidence for a postreceptor mechanism. *Endocrinol.* 118, 377-382.
- MAIA, A.L., HARNEY, J.W., LARSEN, P.R. (1995):  
Pituitary cells respond to thyroid hormone by discrete gene specific pathways. *Endocrinol.*, 136, 1488-1494.
- MAITER, D., UNDERWOOD, L.E., MAES, M., DAVENPORT, M.L. (1988):  
Different effects of intermittent and continuous growth hormone (GH) administration on serum somatomedin-C / insulin-like growth factor I and liver GH receptors in hypophysectomized rats. *Endocrinol.* 123, 1053-1059.
- MALLOY, P.J., PIKE, J.W., FELDMAN, D. (1999):  
The vitamin D receptor and the syndrome of hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets. *Endocr. Rev.* 20, 156-188.
- MANO, H., MORI, R., OZAWA, T., TAKEYAMA, K., YOSHIZAWA, Y., KOJIMA, R., ARAO, Y., MASUSHIGE, S., KATO, S. (1994):  
Positive and negative regulation of retinoid X receptor gene expression by thyroid hormone in the rat. *J. Biol. Chem.* 269, 1591-1594.
- MAO, J.N., BURNSIDE, J., POSTEL-VINAY, M.C., PESEK, J.D., CHAMBERS, J.R., COGBURN, L.A. (1998):  
Ontogeny of growth hormone receptor gene expression in tissue of growth-selected strains of broiler chickens. *J. Endocrinol.* 156, 67-75.
- MARTINI, J.-F., PEZET, A., GUEZENNEC, C.Y., EDERY, M., POSTEL-VINAY, M.-C., KELLY, P.A. (1997):  
Monkey growth hormone (GH) receptor gene expression. *J. Biol. Chem.* 272, 18951-18958.
- MARTINI, J.-F., VILLARES, S.M., NAGANO, M., DELEHAYE-ZERVAS, M.-C., EYMARD, B., KELLY, P.A., POSTEL-VINAY, M.-C. (1995):  
Quantitative analysis by polymerase chain reaction of growth hormone receptor gene expression in human liver and muscle. *Endocrinol.* 136, 1355-1360.

- MASSA, G., MULUMBA, N., KETELSLEGERS, J.-M., MAES, M. (1990):  
Initial characterization and sexual dimorphism of serum growth hormone-binding protein in adult rats. *Endocrinol.* 126, 1976-1980.
- MATEJKA, G.L., ERIKSSON, P.S., CARLSSON, B., JENNISCHE, E. (1992):  
Distribution of IGF-I mRNA and IGF-I binding sites in the rat kidney. *Histochem.* 97, 173-180.
- MATHEWS, L.S., ENBERG, B., NORSTEDT, G. (1989):  
Regulation of rat growth hormone receptor gene expression. *J. Biol. Chem.* 264, 9905-9910.
- MATTERI, R.L. & CARROLL, J.A. (1997):  
Somatotroph function in the neonatal pig. *Dom. Anim. Endocrinol.* 14, 241-249.
- MATTERI, R.L., DYER, C.J., TOUCHETTE, K.J., CARROLL, J.A., ALLEE, G.L. (2000):  
Effects of weaning on somatotrophic gene expression and circulating levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II in pigs. *Dom. Anim. Endocrinol.* 19, 247-259.
- MAUNDER, E.M.W., PILLAY, A.V., CARE, A.D. (1987):  
Endocrine control of plasma concentrations of calcium-binding protein in the pig. *J. Endocrinol.* 115, 121-128.
- McALISTER, W.T., KÜPPER, H., BAUTZ, E.K.F. (1973):  
Kinetics of transcription by the bacteriophage T3 RNA polymerase in vitro. *Eur. J. Biochem.* 34, 489-501.
- McLEOD, A.R., KARN, J., BRENNER, S. (1981):  
Molecular analysis of the unc-54 myosin heavy-chain gene of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 291, 368-390.
- MELTON, D.A., KRIEG, P.A., REBAGLIATI, M.R., MANIATIS, T., ZINN, K., GREEN, M.R. (1984):  
Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nuc. Acids Res.* 12, 7035-7056.
- MENAA, C., VRTOVSNIK, F., FRIEDLANDER, G., CORVOL, M., GARABÉDIAN, M. (1995):  
Insulin-like growth factor I, a unique calcium-dependent stimulator of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> production. *J. Biol. Chem.* 270, 25461-25467.
- MENARD, D., LEVY, E., DELVIN, E.E. (1995):  
Effects of calcitriol on proliferation and differentiation of human fetal jejunum. *Biol. Neonate* 68, 157-62.

- MENON, R.K., STEPHAN, D.A., SINGH, M., MORRIS, S.M., ZOU, L. (1995):  
Cloning of the promoter-regulatory region of the murine growth hormone receptor gene. Identification of a developmentally regulated enhancer element. *J. Biol. Chem.* 270, 8851-8859.
- MENON, R.K., SHAUFL, A., YU, J.H., STEPHAN, D.A., FRIDAY, R.P. (2001):  
Identification and characterization of a novel transcript of the murine growth hormone receptor gene exhibiting development- and tissue-specific expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 172, 135-146.
- MENZO, S., BANNARELLI, P., GIACCA, M., MANZIN, A., VARALDO, P.E., CLEMENTI, M. (1992):  
Absolute quantitation of viremia in human immunodeficiency virus infection by competitive reverse transcription and polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1752-1757.
- MERCADO, M., DÁVILA, N., MCLEOD, J.F., BAUMANN, G. (1994):  
Distribution of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid containing and lacking exon 3 in human tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78, 731-735.
- MESIANO, S.I.R., YOUNG, I.R., BAXTER, R.C., HINTZ, R.L., BROWNE, C.A., THORBURN, G.D. (1987):  
Effect of hypophysectomy with and without thyrosine replacement on growth and circulating concentrations of insulin-like growth factors I and II in the fetal lamb. *Endocrinol.* 120, 1821-1830.
- MOFFAT, J.G., DAO, H., TALAMANTES, F. (2000):  
Alternative 5'-untranslated regions of mouse GH receptor/binding protein messenger RNA are derived from sequences adjacent to the major L2 promoter. *J. Endocrinol.* 167, 145-152.
- MOL, J.A., LANTINGA-VAN LEEUWEN, I., VAN GARDEREN, E., SELMAN, P., OOSTERLAKEN-DIJKSTERHUIS, M., SCHALKEN, J., RIJNBERK, A. (1999):  
Pituitary and extrapituitary growth hormone. *Veterinary Quarterly* 21, 111-115.
- MORIWAKE, T., TANAKA, H., KANAZAKI, S., HIGUCHI, J., SEINO, Y. (1992):  
1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> stimulates the secretion of insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) by cultured human osteosarcoma cells. *Endocrinol.* 130, 1071-1073.
- MORREALE DE ESCOBAR, CALVO, R., ESCOBAR DEL REY, F., OBREGON, M.J. (1993):  
Differential effects of thyroid hormones on growth and thyrotropic hormones in rat fetuses near term. *Endocrinol.* 132, 2056-2064.
- MÜLLER, E.E., LOCATELLI, V., COCCHI, D. (1999):  
Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol. Rev.* 79, 511-607.

- MULLIS, K.B. & FALCOONA, F.A. (1987):  
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction.  
Methods in Enzymology 155, 335-350.
- MULLIS, P.E., EBLÉ, A., MARTI, U., BÜRGI, U., POSTEL-VINAY, M.-C. (1999):  
Regulation of human growth hormone receptor gene transcription by  
triiodothyrodine (T<sub>3</sub>). Mol. Cell. Endocrinol., 147, 17-25.
- MURAYAMA, A., TAKEYAMA, K.-I., KITANAKA, S., KODERA, Y., KAWAGUCHI,  
Y., HOSOYA, T., KATO, S. (1999):  
Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -  
hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> in  
intact rats. Encorinol. 140, 2224-2231.
- NAGANO, M. & KELLY, P.A. (1994):  
Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression.  
Quantitative analysis by polymerase chain reaction. J. Biol. Chem. 269. 13337-  
13345.
- NATHAN, M., MERTZ, L.M., FOX, D.K. (1995):  
Optimizing long RT-PCR. Focus 17, 78-80.
- NESBITT, T. & DREZNER, M.K. (1993):  
Insulin-like growth factor-I regulation of renal 25-hydroxyvitamin D-1-  
hydroxylase activity. Endocrinol. 132, 133-138.
- NEUSSER, M. (2001):  
Schnelles Verfahren der PCR-Optimierung mit "Real-Time"-PCR. BIOSpektrum  
6/01, 539-541.
- NGUYEN AP, CHANDORKAR A, GUPTA C. (1996):  
The role of growth hormone in fetal mouse reproductive tract differentiation.  
Endocrinol. 137. 3659-3666.
- NICOLETTI, A. & SASSY-PRIGENT, C. (1996):  
An alternative polymerase chain reaction method. Anal. Biochem. 236; 229-241.
- NOFF, D. & EDELSTEIN, S. (1978):  
Vitamin D and its hydroxylated metbolites in the rat. Placental and lacteal  
transport, subsequent metabolic pathways and tissue distribution. Horm. Res. 9,  
292-300.
- NOONAN, K.E., BECK, C., HOLZMAYER, T.A., CHIN, J.E., WUNDER, J.S.,  
ANDRULIS, I.L., GAZDAR, A.F., WILLMAN, C.L., GRIFFITH, B., VON HOFF,  
D.D., RONINSON, I.B. (1990):  
Quantittative analysis of MDRI (multidruge resistance) gene expression in  
human tumors by polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87.  
7160-7164.



- NORMAN, A.W. (1980):  
Vitamin D-deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *science*, 209, 823-825.
- OGLE, G.D., ROSENBERG, A.R., CALLIGEROS, D., KAINER, G. (1994):  
Effects of growth hormone treatment for short stature on calcium homeostasis bone mineralisation and body composition. *Horm. Res.* 41, 16-20.
- OGLE, G.D., ROSENBERG, A.R., KAINER, G. (1992):  
Renal effects of growth hormone. II. Electrolyte homeostasis and body composition. *Pediatr. Nephrol.* 6, 483-489.
- OHLSSON, C., LÖVSTEDT, K., HOLMES, P.V., NILSSON, A., CARLSSON, L., TÖRNELL, J. (1993):  
Embryonic stem cells express growth hormone receptors: regulation by retinoic acid. *Endocrinol.* 133, 2897-2903.
- OKAMOTO, T. & OKABE, S. (2000):  
Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution. *Int. J. Med.* 5, 657-659.
- OLDHAM, E.R., BINGHAM, B., BAUMBACH, W.R. (1993):  
A functional polyadenylation signal is embedded in the coding region of chicken growth hormone receptor RNA. *Mol. Endocrinol.* 7, 1379-1390.
- O'MAHONEY, J.V., BRANDON, M.R., ADAMS, T.E. (1994):  
Identification of a liver specific promoter for the ovine growth hormone receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 101, 129-139.
- OWENS, P.C., CONLON, M.A., CAMPBELL, R.G., JOHNSON, R.J., KING, R., BALLARD, F.J. (1991):  
Developmental changes in growth hormone, insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) and IGF-binding proteins in plasma of young growing pigs. *J. Endocrinol.* 128, 439-447.
- PANTALEON, M., WHITESIDE, E.J., HARVEY, M.B., BARNARD, R.T., WATERS, M.J., KAYE, P.L. (1997):  
Functional growth hormone (GH) receptors and GH are expressed by preimplantation mouse embryos: a role for GH in early embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 5125-5130.
- PAULSON, S.K. & DELUCA, H.F. (1985):  
Subcellular location and properties of rat renal 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1α-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 260, 11488-11492.
- PEKHLETSKY, R.I., CHERNOV, B.K., RUBTSOV, P.M. (1992):  
Variants of the 5' -untranslated sequence of human growth hormone receptor mRNA. *Mol. Cell. Endocrinol.* 90, 103-109.
- PENG, M., PELLETIER, G., PALIN, M.-F., VÉRONNEAU, S., LEBEL, D., ABRIBAT, T. (1996):

- Ontogeny of IGFs and IGFBPs mRNA levels and tissue concentrations in liver, kidney and skeletal muscle of pig. *Growth, Develop. & Aging* 60, 171-187.
- PENG, M., ABRIBAT, T., CALVO, E., LEBEL, D., PALIN, M.-F., BERNATCHEZ, G., MORISSET, J., PELLETIER, G. (1998):  
Ontogeny of insulin-like growth factors (IGF), IGF-binding proteins, IGF receptors, and growth hormone receptor mRNA levels in porcine pancreas. *J. Anim. Sci.* 76, 1178-1188.
- PERSONS, D.A., SCHEK, N., HALL, B.L., FINN, O.J. (1989):  
Increased expression of glycolysis-associated genes in oncogene-transformed and growth-accelerated states. *Mol. Carcinog.* 2, 88-94.
- PETITCLERE, D., PELLETIER, G., LAPIERRE, H., GAUDREAU, P., COUTURE, Y., DUBREUIL, P., MORISSET, J., BRAZEAU, P. (1987):  
Dose response of two synthetic human growth hormone-releasing factors on growth hormone release in heifers and pigs. *J. Anim. Sci.* 65, 996-1005.
- PFAFFL, M., MEYER, H.H.D., SAUERWEIN, H. (1998):  
Quantification of insulin-like growth factor-I (IGF-I) mRNA: Development and validation of an internally standardised competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *Exp. Clin. Endocrinol. Diab.* 106, 506-513.
- PFEILSCHIFTER, J. (1997):  
GH and bone metabolism: the role of the vitamin D system. *Eur. J. Endocrinol.* 136, 30-32.
- PHORNPHUTKUL, C., FRICK, G.P., GOODMAN, H.M., BERRY, S.A., GRUPPSO, P.A. (2000):  
Hepatic growth hormone signalling in the late gestation fetal rat. *Endocrinol.* 141, 3527-3533.
- PINTO, H., LERARIO, A.C., TORRES DETOLEDO E SOUZA, I., WAJCHENBERG, B.L., MATTAR, E., PIERONI, R.R. (1977):  
Preparation of high-quality iodine-125-labelled pituitary human follicle-stimulation hormone (hFSH) for radioimmunoassay: comparison of enzymatic and chloramine-T iodination. *Clin. Chim. Acta*, 76, 25-34.
- PLATH, A., PETERS, F., EINSPANIER, R. (1996):  
Detection and quantitation of specific mRNAs by ribonuclease protection assay using denaturing horizontal polyacrylamide gel electrophoresis: A radioactive and nonradioactive approach. *Electrophoresis* 17, 471-472.
- PLONAIT, H. (1969):  
Erbliche Rachitis der Saugferkel. *Pathogenese und Therapie. Zbl. Vet. Med. A.* 16, 271-316.
- PRATT, S.L. & ANTHONY, R.V. (1995):  
The growth hormone receptor messenger ribonucleic acid present in ovine fetal liver is a variant form. *Endocrinol.* 136, 2150-2155.

- RAEYMAEKERS, L. (1993):  
Quantitative PCR: theoretical considerations with practical implications. *Anal. Biochem.* 13, 106-113.
- RAEYMAEKERS, L. (2000):  
Basic principles of quantitative PCR. *Mol. Biotechnol.* 15, 115-122.
- RAISZ, L.G., TRUMMEL, C.L., HOLLICK, M.F., DELUCA, H. F. (1972):  
1,25-dihydroxycholecalciferol: a potent stimulator of bone resorption in tissue culture. *Science* 175, 768-769.
- RAJARAM, S., BAYLINK, D.J., MOHAN, S. (1997):  
Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr. Rev.* 18, 801-831.
- RAM, P. A., WAXMAN, D.J. (1999):  
SOCS/CIS protein inhibition of growth hormone-stimulated STAT5 signaling by multiple mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274, 35553-35561.
- RAMIREZ, J.L., CASTANO, J.P., GRACIA-NAVARRO, F. (1998):  
Somatostatin at low doses stimulates growth hormone release from intact cultures of porcine pituitary cells. *Horm. Metab. Res.* 30, 175-177.
- RAPPOLEE, D.A. (1990)  
Optimizing the sensitivity of the RT-PCR. *Amplifications* 5, 5-7.
- RAVAL-PANDYA, M., FREEDMAN, L.P., LI, H., CHRISTIAKOS, S. (1998):  
Thyroid hormone receptor does not heterodimerize with the vitamin D receptor but represses vitamin D receptor-mediated transactivation. *Mol. Endocrinol.* 12, 1376-1379.
- REDDY, G.S., NORMAN, A.W., WILLIS, D.M., GOLTZMAN, D., GUYDA, H., SOLOMON, S., PHILIPS, D.R., BISHOP, J.E., MAYER, E. (1983):  
Regulation of vitamin D metabolism in normal human pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 56, 363-370.
- REEBEN, M. (1992):  
bionet - molbio.methods-reagents archives 27.07
- REICHEL, H., KOEFFLER, H.P., NORMAN, A.W. (1989):  
The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *The New England J. Med.* 320, 980-991.
- RETTMER, I. (1995):  
Studien zur Ontogenese der neuroendokrinen Regulation der GH-Sekretion beim fetalen und neonatalen Schwein. Dissertation, Universität Göttingen.
- RETTMER, I. & PARVIZI, N. (1994):  
Ontogenetic regulation of growth hormone secretion in the fetal and neonatal pig. *Endocrinol. Metabol.*, 1(suppl. B), P.086.

- RICHMOND, E.J., UZRI, A., ROGOL, A.D. (2001):  
The insulin-like growth factor system in kidney disease. *Nephron* 89, 5-9.
- RIDYARD, M.S. & SANDERS, E.J. (1999):  
Potential roles for focal adhesion kinase in development. *Anat. Embryol.* 199, 1-7.
- RIEDY, M.C., TIMM, JR., ELA., STEWART, C.C. (1995):  
Quantitative RT-PCR for measuring gene expression. *Biotechniques* 1, 70-74, 76.
- RINDERKNECHT, E. & HUMBEL, R.E. (1978 a):  
The amino acid sequence of human insulin-like growth factor 1 and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem.* 253, 2769-2776.
- RINDERKNECHT, E.C. & HUMBEL, R.E. (1978 b):  
Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett.* 89, 283-286.
- RIVERS, C.A. & NORMAN, M.R. (2000):  
The human growth hormone receptor gene - characterisation of the liver-specific promoter. *Mol. Cell. Endocrinol.* 160, 51-59.
- RIZIVI, S.S.R. & ALTAF, S. (2000):  
Differential effects of N-methyl-D-aspartate receptor stimulation on growth hormone secretion at specific stages of postnatal development of the male rhesus monkey. *Life Sci.* 67, 783-797.
- RNeasy Mini Handbook, Qiagen, 2. Aufl. (1997).
- ROGERS, S.A., MILLER, S.B., HAMMERMAN, M.R. (1990):  
Growth hormone stimulates IGF I gene expression in isolated rat renal collecting duct. *Am. J. Physiol.* 259, F474-F479.
- ROMERO, G.S., STEPHAN, D.A., SPERLING, M.A., MENON, R.K. (1996):  
Distinct sexual dimorphism in the effect of hypothyroidism on the expression of the growth hormone receptor and growth hormone-binding protein gene in rat liver. *Horm. Res.* 45, 273-278.
- ROSS, R., CARE, A.S., ROBINSON, J.S. PICKARD, D.W., WEATHERLEY, A.J. (1980):  
Perinatal 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in the sheep and its role in the maintenance of transplacental calcium gradient. *J. Endocrinol.* 87, 17P-18P.
- ROSS, R.J., ESPOSITO, N., SHEN, X.Y., VON LAUE, S., CHEW, S.L., DOBSON, P.R., POSTEL-VINAY, M.C., FINIDORI, J. (1997):  
A short isoform of the human growth hormone receptor functions as a dominant negative inhibitor of the full-length receptor and generates large amounts of binding protein. *Mol. Endocrinol.* 11, 265-273.

- ROTHER, K.I. & ACCILI, D. (2000):  
Role of insulin receptors and IGF receptors in growth and development. *Pediatr. Nephrol.* 14, 558-561.
- SAGGESE, G., BARONCELLI, G.I., FEDERICO, G., BERTELLONI, S. (1995):  
Effects of growth hormone on phosphocalcium homeostasis and bone metabolism. *Horm. Res.* 44 (suppl. 3), 55-63.
- SAIKI, R.K., SCHARF S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A, ARNHEIM, N. (1985):  
Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230,1350-1354.
- Salle, B.L., Berthezene, F., Glorieux, F.H., Delvin, E.E., Berland, M., David, L., Varenne, J.P. (1980):  
Hypoparathyroidism during pregnancy: treatment with calcitriol. *J. Clin. Encorinol. Metab.* 52, 810-813.
- SALLE, B.L., DELVIN, E.E., LAPILLONNE, A., BISHOP, N.J., GLORIEUX, F.H. (2000):  
Perinatal metabolism of vitamin D. *Am J. Clin. Nutr.* 71, 1317S-1324S.
- SALMON JR, W.D., DAUGHADAY, W.H. (1957):  
A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J. Lab. Clin. Med.* 49, 825-836.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T.  
Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 2.Aufl., 1989.
- SANCHEZ-PACHECO, A., PALOMINO, T., ARANDA, A. (1995):  
Negative regulation of expression of the pituitary-specific transcription factor GHF/Pit-1 by thyroid hormones through interference with promoter enhancer elements. *Mol. Cell. Endocrinol.* 15, 6322-6330.
- SARKAR, N.K., LODGE, G.A., FRIEND, D.W. (1977):  
Hyperplasic and hypertrophic growth in organs and tissues of the neonatal pig. *J. Anim. Sci.* 46, 722-728.
- SAUERWEIN, H., BREIER, B.H., BASS, J.J., GLUCKMAN, P. D. (1991):  
Chronic treatment with bovine growth hormone upregulates high-affinity hepatic somatotropic receptors in sheep. *Acta Endocrinol. (Copenh)*, 124, 307-313.
- SAUERWEIN, H., HONOLD, C.-U., SERPEK, B., HENNING, M., MEYER, H.H. D., ELSAESSER, F. (1992):  
Exogenous porcine growth hormone upregulates hepatic GH binding but not serum GH binding protein in two different genotypes of pigs: Evidence for a seperate regulation of the GH binding protein. *J. Endocrinol. Inves.*, 15 (Suppl. 4), nr. 64.

- SCANES, C.G., LAZARUS, D., BOWEN, S., BUONOMO, C., GILBREATH, R.L. (1987):  
Postnatal changes in circulating concentrations of growth hormone, somatomedin C and thyroid hormones in pigs. *Dom Anim. Endocrinol.* 4, 253-257.
- SCHEK, N., HALL, B.L., FINN, O.J. (1988):  
Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 48, 6354-6359.
- SCHMIDT, E.E. & SCHIBLER, U. (1995):  
Cell size regulation, a mechanism that controls cellular RNA accumulation: consequences on regulation of the ubiquitous transcription factors Oct1 and NF-Y, and the liver-enriches transcription factor DBP. *J. Cell Biol.* 128, 467-483.
- SCHNOEBELEN-COMBES, S., LOUVEAU, I., POSTEL-VINAY, M.-C. (1996):  
Ontogeny of GH receptor and GH-binding protein in the pig. *J. Endocrinol.* 148, 249-255.
- SCHRÄGER, M., MÜLLER, K.M., CARLBERG, C. (1994):  
Specificity and flexibility of vitamin D signalling. *J. Biol. Chem.* 269, 5501-5504.
- SCHROEDER, B., DAHL, M.R., BREVES, G. (1998 a):  
Duodenal Ca<sup>2+</sup> absorption is not stimulated by calcitriol during early postnatal development of pigs. *Am. J. Physiol.* 275, G305-G313.
- SCHRÖDER, B., HATTENHAUER, O., BREVES, G. (1998 b):  
Phosphate Transport in pig proximal small intestines during postnatal development: lack of modulation by calcitriol. *Endocrinol.* 139, 1500-1507.
- SCHWARTZ, J. (2000):  
Intercellular communication in the anterior pituitary. *Endocr. Rev.* 21, 488-513.
- SCHWARTZBAUER, G. & MENON, R.K. (1998):  
Regulation of growth hormone receptor gene expression. *Mol. Gen. Metab.* 63, 243-253.
- SCHWARTZBAUER, G., YU, J.H., CENG, H., MENON, R.K. (1998):  
Transcription factor msy-1 regulates expression of the murine growth hormone receptor gene. *J. Biol. Chem.* 273, 24760-24769.
- SENARÍS, R.M., LAGO, F., COYA, R., PINEDAM J., DIÉGUEZ, C. (1996):  
Regulation of hypothalamic somatostatin, growth hormone-releasing hormone, and growth hormone receptor messenger ribonucleic acid by glucocorticoids. *Endocrinol.* 137, 5236-5241.
- SHEN, X.Y., HOLT, R.I.G., MIELL, J.P., JUSTICE, S., PORTMANN, B., POSTEL-VINAY, M.-C., ROSS, J. M. (1998):  
Cirrhotic liver expresses low levels of the full-length and truncated growth hormone receptors. *J. Clin. Endocrinol.* 83, 2532-2538.

- SHEPERD, B.S., SAKAMOTO, T., NISHIOKA, R.S., RICHMAN III N.H., MORI, I., MADSEN, S.S., CHEN, T.T., HIRANO, T.H., BERN, H.A., GRAU, G. (1997): Somatotropic actions of the homologous growth hormone and prolactins in the euryhaline teleost, the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2068-2072.
- SHIN, J.H., CHANGHUA, J., CASINGHINO, S., MCCARTHY, T.L., CENTRELLA, M. (1997): Parathyroid hormone-related protein enhances insulin-like growth factor-I expression by fetal rat dermal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 272, 23498-23502.
- SHOBA, L., AN, M.R., FRANK, S.J., LOWE JR., W.L. (1999): Developmental regulation of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 152, 125-136.
- SIEBERT, P.D. & LARRICK, J.W. (1992): Competitive PCR. *Nature* 359, 557-558.
- SIEBERT, P.D. & LARRICK, J.W. (1993): PCR MIMICS: competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. *Biotechniques* 14, 244-249.
- SILVER, J. & NAVEH-MANY, T. (1993): Calcitonin gene regulation in vivo. *Horm. Metab. Res.* 25, 470-472.
- SILVER, J., NAVEH-MANY, T., MAYER, H., SCHMELZER, H.J., POPOVTZER, M.M. (1986): Regulation by vitamin D metabolites of parathyroid hormone gene transcription in vivo in the rat. *J. Clin. Invest.* 78, 1296-1301.
- SIMARD, M., MANTHOS, H., GIAID, A., LEFÈBVRE, Y., GOODYER, C.G. (1996): Ontogeny of growth hormone receptors in human tissues: an immunohistochemical study. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 81, 3097-3102.
- SIMS, N.A., CLEMENT-LACROIX, P., DA PONTE, F., BOUALI, Y., BINART, N., MORIGGL, R., GOFFIN, V., COSCHIGANO, K., GAILLARD-KELLY, M., KOPCHICK, J., BARON, R., KELLY, P.A. (2000): Bone homeostasis in growth hormone receptor-null mice is restored by IGF-I but independent of Stat5. *J. Clin. Invest.* 106, 1095-1103.
- SORENSEN, C.M. & SHEIBANI, N. (1999): Focal adhesion kinase, paxillin, and bcl-2: analysis of expression, phosphorylation, and association during morphogenesis. *Dev. Dynamics* 215, 371-382.
- SOUAZÉ, F., NTODOU-THOMÉ, A., TRAN, C.Y., ROSTÈNE, W., FORGEZ, P. (1996): Quantitative RT-PCR: Limits and accuracy. *Biotechniques*, 21, 280-285.

- SOUTHARD, J.N., BARRETT, B.A., BIKBULATOVA, L., ILKBAHAR, Y., WU, K., TALAMANTES, F. (1995):  
Growth hormone receptor and growth hormone-binding protein mRNAs with alternative 5' untranslated regions are differentially expressed in mouse liver and placenta. *Endocrinol.* 136, 2913-2921.
- SPANOS, E., BARRETT, D., MACINTYRE, I., PIKE, J.W., SAFILIAN, E.F., HAUSSLER, M.R. (1978):  
Effect of growth hormone on vitamin D metabolism. *Nature* 273, 246-247.
- STAHL, N., FARRUGGELLA, T.J., BOULTON, T.G., ZHONG, Z., DARNELL, J.E. JR, YANCOPOULOS, G.D. (1995):  
Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267, 1349-1353.
- STALLINGS-MANN, M.L., LUDWICZAK, R.L., KLINGER, K.W., ROTTMAN, F. (1996):  
Alternative splicing of exon 3 of the human growth hormone receptor is the result of an unusual genetic polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 12394-12399.
- STATON, J.M., THOMSON, A.M., LEEDMAN, P.J. (2000):  
Hormonal regulation of mRNA stability and RNA-protein interactions in the pituitary. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 17-34.
- STEPHAN, D.A., MENON, R.K., FRANZ, B., SPERLING, M.A. (1993):  
Thyroid hormone status correlates inversely with expression of the growth hormone receptor gene in rats immediately after birth. *J. Dev. Physiol.* 19, 241-246.
- STRAIN, A.J., HILL, D.J., SWENNE, I., MILNER, R.D.G. (1987):  
Regulation of DNA synthesis in human fetal hepatocytes by placental lactogen, growth hormone, growth factor I / somatomedin-C. *J. Cell. Physiol.* 132, 33-40.
- STROUS, G.J., KERKHOF, P., GOVERS, R., CIECHANOVER, A., SCHWARTZ, A. L. (1996):  
The ubiquitin conjugation system is required for ligand-induced endocytosis and degradation of the growth hormone receptor. *EMBO J.* 15, 3806-3812.
- SWENNE, I., HILL, D.J., STRAIN, A.J., MILNER, R.D.G. (1987):  
Growth hormone regulation of somatomedin C/ insulin-like growth factor I production and DNA replication in fetal rat islets in tissue culture. *Diabetes* 36, 288-294.
- TAKEUCHI, A., OKANO, T., SEKIMOTO, H., KOBAYASHI, T. (1994):  
The enzymatic formation of  $1\alpha,25$ dihydroxyvitamin  $D_3$  from 25-hydroxyvitamin  $D_3$  in the liver of fetal rats. *Comp. Biochem. Physiol.* 109C, 1-7.
- TANAKA, Y., HALLORAN, B., SCHNOES, H.K., DELUCA, H.F. (1979):  
In vitro production of  $1,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$  by rat placental tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5033-5035.



- TANNENBAUM, G.S., PAINSON, J.C., LAPOINTE, M., GURD, W., McCARTHY (1990):  
Pituitary-hypothalamic somatostatin. Interplay of somatostatin and growth hormone-releasing hormone in genesis of episodic growth hormone secretion. *Metabolism* 39 (suppl. 2), 35-39.
- TERADA, Y., FUKAYA, T., TAKAHASHI, M., YAJIMA, A. (1996):  
Expression of growth hormone receptor in mouse preimplantation embryos. *Mol. Hum. Reprod.* 11, 879-881.
- THELLIN, O., ZORZI, W., LYKAYE, B., DE BORMAN, B., COUMANS, B., HENNEN, G., GRISAR, T., IGOUT, A., HEINEN, E. (1999):  
Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.* 75, 291-295.
- TORRONTERAS, R., GRACIA-NAVARRO, F., ELSAESSER, F. (1997):  
Control of growth hormone secretion from porcine fetal and neonatal pituitary tissue in vitro by growth hormone-releasing hormone, somatostatin, and insulin-like growth factor. *Neuroendocrinol.* 65, 117-128.
- TSUKADA, A., OHKUBO, T., SAKAGUCHI, K., TANAKA, M., NAKASHIMA, K., HAYASHIDA, Y., WAKITA, M., HOSHINO, S. (1998):  
Thyroid hormones are involved in insulin-like growth factor-I (IGF-I) production by stimulating hepatic growth hormone receptor (GHR) gene expression in the chicken. *Growth Horm. IGF Res.* 8, 235-42.
- UDY, G.B., TOWERS, R.P., SNELL, R.G., WILKINS, R.J., PARK, S.-H., RAM, P.A., WAXMAN, D.J., DAVEY, H.W. (1997):  
Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 7239-7244.
- URBANEK, M., MACLEOD, J.N., COOKE, N.E., LIEBHABER, S.A. (1992):  
Expression of a human growth hormone (hGH) receptor isoform is predicted by tissue-specific alternative splicing of exon 3 of the hGH receptor gene transcript. *Mol. Endocrinol.* 6, 279-287.
- VERES, G., GIBBS, R.A., SCHERER, S.E., CASKEY, C.T. (1987):  
The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science* 237, 415-417.
- VERMA, I.M. (1975):  
Studies on reverse transcriptase of RNA tumor viruses III. Properties of purified molony murine leukemia virus DNA polymerase and associated RNase H. *J. Virol.* 15, 843-854.
- VILLA, P., VALLE, D., DE MARINIS, L., MANCINI, A., BIANCHI, A., FULGHESU, A.M., CARUSO, A., MANCUSO, S., LANZONE, A. (1997):  
Influence of chronic naltrexone treatment on growth hormone secretion in normal subjects. *Eur. J. Endocrinol.* 137, 631-634.

- VLEURICK, L., KUHN, E.R., DECUYPERE, E., BURNSIDE, J., PEZET, A., EDERY, M. (1999):  
Generation of chicken growth hormone-binding proteins by proteolysis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113, 283-289.
- VOLKENHANDT, M., DICKER, A.P., BANERJEE, D., FANIN, R., SCHWEITZER, B., HORIKOSHI, T., DANENBERG, K., DANENBERG, P., BERTINO, J.R. (1992):  
Quantitation of gene copy number and mRNA using the polymerase chain reaction. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200, 1-6.
- WALKER, J.L., MOATS-STAATS, B.M., STILES, A.D., UNDERWOOD, L. E. (1992):  
Tissue-specific developmental regulation of the messenger ribonucleic acids encoding the growth hormone receptor and the growth hormone binding protein in rat fetal and postnatal tissues. *Pediatric Res.* 31, 335-339.
- WANG, A.M., DOYLE, M.V., MARK, D.F. (1989):  
Quantification of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 9717-9721.
- WANG, X., MOLLER, C., NORSTEDT, G., CARTER-SU, C. (1993):  
Growth hormone-promoted tyrosyl phosphorylation of a 121-kDa growth hormone receptor-associated protein. *J. Biol. Chem.* 268, 3573-3579.
- WANG, X., SOUZA, S.C., KELDER, B., CIOFFI, J.A., & KOPCHICK, J.J. (1995):  
A 40-amino acid segment of the growth hormone receptor cytoplasmic domain is essential for GH-induced tyrosine-phosphorylated cytosolic proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 6261-6266.
- WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. (1941):  
Isolation and crystallization of enolase. *Biochem. Z.* 310, 384-421.
- WATERS, M.J. (1999):  
Growth hormone and development: from the two cell embryo to birth. *Growth hormone & IGF research* 9, 330, abstract OC17.4.
- WATERS, M.J., SHANG, C.A., BEHNECKEN, S.N., TAM, S.-P., LI, H., SHEN, B., LOBIE, P.E. (1999):  
Growth hormone as a cytokine. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26, 760-764.
- WAXMAN, D.J., RAM, P.A., PARK, S.-H., CHOI, H.K. (1995):  
Intermittent plasma growth hormone triggers tyrosine phosphorylation and nuclear translocation of a liver-expressed, STAT5-related DNA binding. *J. Biol. Chem.* 270, 13262-13270.
- WEBER, M.M., MELMED, S., ROSENBLOOM, J., YAMASAKI, H., PRAGER, D. (1992):  
Rat somatotroph insulin-like growth factor-II (IGF-II) signalling: role of the IGF-I receptor. *Endocrinol.* 131, 2147-2153.

- WEI, S., TANAKA, H., KUBO, T., ONO, T., KANZAKI, S., SEINO, Y. (1997):  
Growth hormone increases serum 1,25-dihydroxyvitamin D levels and decreases 24,25-dihydroxyvitamin D levels in children with growth hormone deficiency. *Eur. J. Endocrinol.* 136, 45-51.
- WEI, S., TANAKA, H., SEINO, Y. (1998):  
Local action of exogenous growth hormone and insulin-like growth factor on dihydroxyvitamin D production in LLC-PK1 cells. *Eur. J. Endocrinol.* 139, 454-460.
- WEISMAN, Y., HARELL, A., EDELSTEIN, S., DAVID, M., SPIRER, Z., GOLANDER, A. (1979):  
 $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 24,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> *in vitro* synthesis by human decidua and placenta. *Nature* 281, 317-319.
- WELLER, P.A., DAUNCEY, M.J., BATES, P.C., BRAMELD, J.M., BUTTERY, P.J., GILMOUR, R.S. (1994):  
Regulation of porcine insulin-like growth factor I and growth hormone receptor mRNA expression by energy status. *Am. J. Physiol.* 266, E776-E785.
- WELLS, J.A. (1996):  
Binding in the growth hormone receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1-6.
- WELLS, J.A., CUNNINGHAM, B.C., FUH, G., LOWMAN, H.B., BASS, S.H., MULKERRIN, M.G., ULTSCH, M., DE VOS, A.M. (1993):  
The molecular basis for growth hormone-receptor interactions. *Recent Progress Horm. Res.* 48, 253-275.
- WERTHER, GA., HAYNES, K., WATERS, M.J. (1993):  
Growth hormone (GH) receptors are expressed on human fetal mesenchymal tissues - identification of messenger ribonucleic acid and GH-binding protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76, 1638-1646.
- WESTER, T.J., FIOROTTO, M.L., KLINDT, J., BURRIN, D.G. (1998 a):  
Feeding colostrum increases circulating insulin-like growth factor I in newborn pigs independent of endogenous growth hormone secretion. *J. Anim. Sci.* 76, 3003-3009.
- WESTER, T.J., DAVIS, T.A., FIOROTTO, M.L., BURRIN, D.G. (1998 b):  
Exogenous growth hormone stimulates somatotrophic axis function and growth in neonatal pigs. *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 274, E29-E37.
- WICKELGREN, R.B., LANDIN, K.L., OHLSSON, C., CARLSSON, L.M. (1995):  
Expression of exon 3-retaining and exon 3-excluding isoforms of the human growth hormone-receptor is regulated in an interindividual, rather than a tissue-specific manner. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 80, 154-157.

- WIELAND, P., FISCHER, J.A., TRECHSEL, U., ROTH, H.R., VETTER, K., SCHNEIDER, H., HUCH, A. (1980):  
Perinatal parathyroid hormone, vitamin D metabolites, and calcitonin in man, *Am. J. Physiol.* 239, E385-E390.
- WILFINGER, W.W., MACKEY, K., CHOMCZYNSKI, P. (1997):  
Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 22, 471-476, 478-481.
- WINKLER, I., SCHREINER, F., HARMMEYER, J. (1986):  
Absence of renal 25-hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase activity in a pig strain with vitamin D-dependent rickets. *Calcif. Tissue Int.* 38, 87-94.
- WOLF, E., LAHM, H., WU, M., WANKE, R., HOEFLICHE, A. (2000):  
Effects of IGFBP-2 overexpression *in vitro* and *in vivo*. *Pediatr. Nephrol.* 14, 572-578.
- WONGSURAWAT, N., ARMBRECHT, H.J., ZENSER, T.V., FORTE, L.R., DAVID, B.B. (1984):  
Effects of hypophysectomy and growth hormone treatment on renal hydroxylation of 25-hydroxycholecalciferol in rats. *J. Endocrinol.* 101, 333-338.
- WRIGHT, N.M., PAPADEA, N., WENTZ, B., HOLLIS, B., WILLI, S., BELL, N.H. (1997):  
Increased serum 1,25-dihydroxyvitamin D after growth hormone administration is not parathyroid hormone-mediated. *Calcif. Tissue Int.* 61, 101-103.
- YAKAR, S., LIU, J.-L., LE ROITH, D. (2000):  
The growth hormone/insulin-like growth factor-I system: implications for organ growth and development. *Pediatr. Nephrol.* 14, 544-549.
- YAMADA, H., CHEN, D., MONSTEIN, H.-J., HAKANSON, R. (1997):  
Effects of fasting on the expression of gastrin, cholecystokinin, and somatostatin genes and of various housekeeping genes in the pancreas and upper digestive tract of rats. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 231, 835-838.
- YAMAGATA, M., KIMOTO, A., MICHIGAMI, T., NAKAYAMA, M., OZONO, K. (2001):  
Hydroxylases involved in Vitamin D metabolism are differentially expressed in murine embryonic kidney: application of whole mount *in situ* hybridization. *Endocrinol.* 142, 3223-3230.
- YANAKA, N., AKATSUKA, H., KAWAI, E., OMORI, K. (1998):  
1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> upregulates natriuretic peptide receptor-C expression in mouse osteoblasts. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 275, E965-E973.
- YANG, B.Y., GREENE, M., CHEN, T.T. (1999):  
Early embryonic expression of the growth hormone family protein genes in the developing rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Mol. Reprod. Dev.* 53, 127-34.

- YEH, J.K. & ALOIA, J.F. (1984):  
Effect of hypophysectomy and 1,25-dihydroxyvitamin D on duodenal calcium absorption. *Endocrinol.* 114, 1711-1717.
- YMER, S.I. & HERINGTON, A.C. (1992):  
Developmental expression of the growth hormone receptor gene in rabbit tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.* 83, 39-49.
- YU, Y.M., DOMENÉ, H.M., SZTEIN, J., COUNTS, D.R., CASSORLA, F. (1996):  
Developmental changes and differential regulation by testosterone and estradiol of growth hormone receptor expression in the rabbit. *Eur. J. Endocrinol.* 135, 583-590.
- YU, J.H., SCHWARTZBAUER, G., KAZLMAN, A., MENON, R.K. (1999):  
Role of the Sp family of transcription factors in the ontogeny of growth hormone receptor gene expression. *J. Biol. Chem.* 274, 34327-34336.
- ZHANG, J. & BYRNE, C.D. (1999):  
Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy and reproducibility of quantitative competitive reverse-transcriptase PCR. *Biochem. J.* 337, 231-241.
- ZHOU, Y., HE, L. & KOPCHICK, J.J. (1994):  
An exon encoding the mouse growth hormone binding protein (mGHBP) carboxy terminus is located between exon 7 and 8 of the mouse growth hormone receptor gene. *Receptor* 4, 223-227.
- ZHU, T., GOH, E.L.K., LOBIE, P.E. (1998):  
Growth hormone stimulates the tyrosine phosphorylation and association of p125 focal adhesion kinase (FAK) with JAK2. *J. Biol. Chem.* 273, 10682-10689.
- ZIMMERMANN, K. & MANNHALTER, J. W. (1996):  
Technical aspects of quantitative competitive PCR. *Biotechniques*, 21, 268-279.
- ZISWILER, V. (1976):  
Die Wirbeltiere Band 2. Georg Thieme Verlag Stuttgart, Deutschland
- ZOGOPOULOS, G., FIGUEIREDO, R., JENAB, A., ALI, Z. LEFÈBVRE, Y., GOODYER, C. G. (1996 a):  
Expression of Exon 3- retaining and-deleted human growth hormone receptor messenger ribonucleic acid isoforms during development; *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 775-782
- ZOGOPOULOS, G., ALBRECHT, S., PIETSCH, T., ALPERT, L., VON SCHWEINITZ, D., LEFÈBVRE, Y., GOODYER, C.G. (1996 b):  
Fetal- and tumor-specific regulation of growth hormone receptor messenger RNA expression in human liver. *Cancer Res.* 56, 2949-2953.

ZOGOPOULOS, G., NATHANIELS, P., HENDY, GN., GOODYER, C.G. (1999):  
The baboon: a model for the study of primate growth hormone receptor gene  
expression during development. *J. Mol. Endocrinol.* 23, 67-75.

ZOU, L., BURMEISTER, L.A., SPERLING, M.A. (1997 a):  
Isolation of a liver-specific promoter for human growth hormone receptor gene.  
*Endocrinol.* 138, 1771-1774.

ZOU, L., MENON, R.K., SPERLING, M. A. (1997 b):  
Induction of mRNAs for the growth hormone receptor gene during mouse 3T3-  
L1 preadipocyte differentiation. *Metabolism* 46, 114-118.

## IX. Anhang

### 1. wichtige Protokolle, Puffer und Lösungen

#### 1.1. RNA-Extraktion und RNA-Gelelektrophorese

##### Protokoll RNA-Extraktion:

Sofern nicht anders vermerkt, werden alle Schritte auf Eis durchgeführt.

Gewebe unter flüssigem Stickstoff zerkleinern, in 10 ml / g Gewebe GTC überführen, bei RT auftauen, mit dem Potter 30 - 60 sec. homogenisieren

⇓

Zugabe: 1 ml Phenol / ml GTC, gut mixen

Zugabe: Chloroform / Isoamylalkohol 49:1 (0,8 ml / ml GTC), gut mixen

Zugabe: 2 M Na-Acetatlösung, pH 4,0 (0,2 ml / ml GTC) mindestens 1 min mixen, 15 min Inkubation auf Eis

⇓

Zentrifugation bei 4°C, 10000 g, 20 min (5000 g, 30 min)

obere wässrige Phase mit RNA sorgfältig in neues Röhrchen überführen

Zugabe 100% Isopropanol (1 vol / vol wässrige Phase), gut mixen

⇓

Inkubation  $\geq$  1h bei -20°C, Zentrifugation 10000 g, 20 min (5000 g, 30 min), Überstand abnehmen, RNA-Pellet mit 1 ml GTC + 0,1 ml Na-Acetat / g Gewebe versetzen, mixen, Inkubation 20 min bei RT zum Lösen des RNA-Pellets, Zugabe 100% Isopropanol (1 vol / vol), Inkubation  $\geq$  1h bei -20°C

⇓

Zentrifugation 10000 g, 20 min (5000 g, 30 min), Überstand abnehmen,

RNA-Pellet waschen mit 1 ml 70 % Ethanol, gut mixen

Zentrifugation 10000 g, 5 min (5000 g, 15 min), Ethanolüberstand abnehmen

Waschschritt wiederholen, Inkubation bei RT für 15 min, gut mixen

⇓

Zentrifugation 10000 g, 15 min (5000 g, 20 min), Ethanol abnehmen, RNA-Pellet bei RT ca. 10 min trocknen und in DEPC-H<sub>2</sub>O aufnehmen, Lagerung bei -80°C

## Guanidinthiocyanat-Lösung (GTC):

Guanidinthiocyanat	4 M
Na-Citrat, pH 7,0	25 mM
Na-Lauroylsarcosin (Sarcosyl)	0,5 %
$\beta$ -Mercaptoethanol	0,1 M

Haltbarkeit ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol: 3 Monate;  
nach Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol: 1 Monat

## 10X MOPS:

MOPS	0,2 M
Na- Acetat	50 mM
EDTA	1 mM
NaOH ad pH 7,0	

## Stammlösung 10X MOPS / 1 l

MOPS 41,8g

NaOH ad pH 7,0

16,6 ml 3 M Na-Acetat Lösung

20 ml 0,5 M EDTA, pH 8

sterilfiltrieren

MOPS- Lösung dunkel bei RT aufbewahren

## 5X denaturierender RNA-Ladepuffer:

(Quiagen, RNeasy Mini Handbook 1997, modifiziert)

gesättigte Bromphenol- blaulösung	226 $\mu$ l
500 mM EDTA, pH 8	20 $\mu$ l
EtBr (10 mg / ml)	15 $\mu$ l
37 % Formaldehyd (pH > 4)	180 $\mu$ l
100% Glycerin	500 ml
deionisiertes Formamid	771 $\mu$ l
10X MOPS	1000 $\mu$ l

Haltbarkeit: 3 Monate bei 4°C

## 1,2 % tiges Agarosegel für die denaturierende RNA-Gelelektrophorese:

Agarose	1,4 g
H <sub>2</sub> O	101,5 ml
10X MOPS	11,7 ml
37 % Formaldehyd (pH > 4)	3,5 ml



## 1.2. DNA-Gelelektrophorese

1X TAE-Puffer:

Tris-Acetat	0,04 M
EDTA, pH 8	0,001 M

Stammlösung 50X TAE / 1 l:

Tris Base	242 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA, pH 8	100 ml

10X Ladepuffer DNA: Orange Mix (REEBEN, 1992)

20 %	Ficoll
0,25 %	Orange G
20 mM	EDTA, pH 8,0

6X Ladepuffer DNA: Bromphenol Blau

Bromphenolblau	0,25 %
EDTA	100 mM
Glycerin in H <sub>2</sub> O	30 %

EDTA 0,5 M pH 8,0 / 1 l:

EDTA	186,1 g
H <sub>2</sub> O	800 ml

NaOH ad pH 8, ungefähr 20 g NaOH-Pellets

(pH <8,0 - keine Lösung)

TE Puffer speziell für die Glycogenlösung zur Verdünnung des DNA-Kompetitors:

Tris-HCl, pH 7,5	10 mM
EDTA, pH 8,0	0,1 mM

Standardprotokoll: 1 mM EDTA

### 1.3. Bakterienkultur

Stamm: Epicurian Coli XL 1-Blue Mrf<sup>+</sup> Kan

Genotyp: (mrcA) 183  $\Delta$  (mrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 sup E44 thi-1 recA1  
gyrA96 relA1 lac [F<sup>+</sup> proAB lacI<sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn5 (Kan<sup>r</sup>)]

LB-Medium:

Bacto-Trypton	10 % (w / v) (Difco, Detroit, USA)
Hefeextrakt	5 % (w / v) (Difco, Detroit, USA)
NaCl	10 % (w / v)
NaOH ad pH 7,4	

LB-Agar: Zugabe 20 % (w / v) Agar (Difco, Detroit, USA) zum LB-Medium

LB-Ampicillin (LB Amp)-Platten: Zugabe von 50 mg / l sterilfiltrierter

Ampicillinlösung zum 55°C warmen LB-Agar

LB-Amp-Medium: Zugabe von 50 mg / l Filter sterilisierter Ampicillinlösung

Blau-weiß Screening mit IPTG und X-Gal:

Ansatz IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid):

0,1 M Lösung sterilfiltrieren, Aliquote bei -20°C lagern

Ansatz X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid):

10 % (w / v) in Dimethylformamid, Lagerung bei -20°C

40  $\mu$ l - 100  $\mu$ l LB-Amp-Medium auf der Agarplatte zusammen mit 40  $\mu$ l IPTG-Lösung mit dem Drigalskyspatel auf der LB-Amp-Agarplatte gleichmäßig verteilen, antrocknen lassen und Vorgang mit 20  $\mu$ l X-Gal Lösung wiederholen

Herstellung von Dauerkulturen zur Lagerung bei -80°C:

1. Weichagar DMSO (Dimethylsulfoxid) Stichkultur

77  $\mu$ l DMSO mischen mit 1 ml LB-Weichagar (7 g Agar / l LB-Medium), erstarren lassen und mit der in die Zellsuspension getauchten Impfnadel 3 Stichkanäle in den Weichagar setzen

2. Glycerinkultur

300  $\mu$ l 80% Glycerin mit 500  $\mu$ l Zellsuspension mischen

### 1.4. Häufig verwendete Chemikalien, Enzyme und Kits

Material	Firma, Artikelnummer	Firmensitz
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] UTP	Amersham-Pharmacia Biotech, PB20383	Freiburg, Deutschland
Acrylamid 30% 4K	Applichem, A1154	Darmstadt, Deutschland
Agarose Ultra pure electrophoresis grad	Life Technologies, 15510-027	Gaithersburg, MD, USA
Ampicillin	Applichem, A0839	Deisenhofen, Deutschland
Bisacrylamid 2% 4K	Applichem, A1574	Darmstadt, Deutschland
Blotting Papier	Schleicher & Schuell, GB0003 Ref No 426 426 890	Dassel, Deutschland
Bsp120 I	MBI Fermentas, ER0131	Vilnius, Litauen
Chloroform	Applichem, A3691	Darmstadt, Germany
Citronensäure	Serva - Boehringer Ingelheim, 38642	Heidelberg, Deutschland
Cloned Pfu DNA-Polymerase	Stratagene, 600153	La Jolla, Kanada
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Applichem, A0881	Darmstadt, Deutschland
N,N-Dimethylformamid	Sigma Aldrich, D-4254	Deisenhofen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, 8.02912	Darmstadt, Deutschland
DNA silver staining Kit	Amersham-Pharmacia Biotech, 17-600-30	Freiburg, Deutschland
dNTP Mix 10mM each	MBI Fermentas, R0192	Vilnius, Litauen
Dynawax™	Finnzymes OY, 100-780	Espoo, Finnland, Vertrieb Biometra, Deutschland
Dynazyme II™ DNA-Polymerase	Finnzymes OY, 100-756	Espoo, Finnland, Vertrieb Biometra, Deutschland
EDTA (Dinatriumsalz (Titriplex III))	Merck, 1.08421	Darmstadt, Deutschland
EcoR I	Boehringer Mannheim, 220310	Mannheim, Deutschland
Entwickler	Kodak GBX, 1900943	Vertrieb Amersham-Pharmacia Biotech, Deutschland
Ethanol	Merck, 1.00986	Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, E1510	Deisenhofen, Deutschland
Ficoll Typ 400	Sigma Aldrich, F4375	Deisenhofen, Deutschland
Fixierer	Kodak GBX, 1901875	Vertrieb Amersham-Pharmacia Biotech, Deutschland
Formaldehyd	Merck, 4002	Darmstadt, Deutschland
Formamid	Fluka 47670	Fluka, Neu Ulm, Vertrieb Sigma Aldrich, Deisenhofen
Gelbond® PAGE Film	Amersham - Pharmacia Biotech, 80-1129-36	Freiburg, Deutschland

Genclean II Kit	Bio 101, Dianova, 3106	Hamburg, Deutschland
Guanidinthiocyanat	Carl Roth, 0017.2	Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff	Merck, A568633	Darmstadt, Deutschland
Hind III	Boehringer Mannheim, 798983	Mannheim, Deutschland
Hyperfilm™ MP Autoradiographiefilm	Amersham-Pharmacia Biotech, RPN6K	Freiburg, Deutschland
IPTG	Applichem, A1008	Darmstadt, Deutschland
Isoamylalkohol	Applichem, A0875	Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, 1.09634	Darmstadt, Deutschland
Low DNA mass ladder	Life Technologies, 10068-013	Gaithersburg, MD, USA
MAXIscript in vitro transcription Kit	Ambion, 1326	Austin, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, M3148	Deisenhofen, Deutschland
MOPS	Applichem, A2947	Darmstadt, Deutschland
MW-Marker Phi X 174 RF HaeIII (BsuRI)	MBI Fermentas, SM0251	Vilnius, Litauen
Natriumchlorid	Applichem, A1149	Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat	Serva - Boehringer Ingelheim, 20763	Heidelberg, Deutschland
N-Lauroylsarcosin Na- Salz	Sigma Aldrich, L-9150	Deisenhofen, Deutschland
Not I	New England Biolabs, R0189S	Beverly, USA
Orange G (Certistein)	Merck, 15925	Darmstadt, Deutschland
PCR MIMIC™ Construction Kit	Clontech, K1700-1	Palo Alto, USA
pCR Script™ Amp SK(+) Cloning Kit	Stratagene, 211190	La Jolla, Kanada
Phenol, wassergesättigt, nicht stabilisiert	Applichem, A1578	Darmstadt, Germany
Primer	Life Technologies	Gaithersburg, MD, USA
Pvu II	Boehringer Mannheim, 642690	Mannheim, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, 27104	Hilden, Deutschland
QIAquick PCR purification Kit	QIAGEN, 28104	Hilden, Deutschland
QuantumRNA™18 S internal standards	Ambion, 1716	Austin, USA
Random Hexamer Primer	Perkin Elmer, Applied Biosystems, N808-0127	Foster City, USA
Ribonuclease Inhibitor	MBI Fermentas, E00312	Vilnius, Litauen
RNA MW-Marker	Ambion, 7140	Austin, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, 74104	Hilden, Deutschland
RPA II Ribonuclease Protection Assay Kit	Ambion, 1410	Austin, USA

Sac II	New England Biolabs, R0157S	Beverly, USA
Sample Application Pieces 10 X 5 mm	Serva, 42880	Heidelberg, Deutschland
Silanisierlösung II, Repel Silan	Fluka, 85127	Fluka, Neu Ulm, Vertrieb Sigma Aldrich, Deisen- hofen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, M3148	Deisenhofen, Deutschland
Superscript II™ RNase H <sup>-</sup> Reverse Transcriptase, DTT	Life Technologies, 18064-014	Gaithersburg, MD, USA
Tricin	Applichem, A1085	Darmstadt, Deutschland
Tris	Merck, 8382; Applichem, A1086	Darmstadt, Deutschland; Darmstadt, Deutschland;
Trypton	Sigma Aldrich T9410	Deisenhofen, Deutschland
X-Gal	Applichem, A1007	Darmstadt, Deutschland

## 2. Häufig verwendete Geräte

Laborgeräte:

- $\gamma$ -counter Modell 1277 (LKB, Wallac, München, Deutschland)
- Autoklav Modell GVA 570 (Gössner, Hamburg, Deutschland)
- $\beta$ -counter Modell 1410 (LKB, Wallac, München, Deutschland)
- Blutgasanalysator Modell 280 Blood Gas System (Ciba Corning Diagnostics, Fernwald, Deutschland)
- Cauter, Modell Force 40 Valley Lab., (Vertrieb: Pfitzer, Karlsruhe, Deutschland)
- CCD Kamera Modell CF 8/1 FMC (Kappa, Gleichen, Deutschland)
- Folienschweißgerät Modell Polysealer 210 (Yamazen, Osaka, Japan)
- Homogenisator (Braun, Melsungen, Deutschland)
- Laminar Air Flow (ICN Biomedicals, Meckenheim, Deutschland)
- Leuchttisch Modell prolite 5000S (Kaiser, Buchen, Deutschland)
- Magnetrührer mit Heizplatte (Heidolph, Kehlheim, Deutschland)
- Mikrowelle Modell Micromat (AEG, Deutschland)
- Milli-Q-Water-System F3N 166 86H, (Millipore, Eschborn, Deutschland)
- pH-Meter (Knick, Berlin, Deutschland)
- Photometer Modell Ultrospec 2000 (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)

- Pipetten der Firmen Gilson, (F-Viliers-Le-Bel, Vertrieb: Abimed, Langenfeld, Deutschland)
- Schüttler GFL 3015 (GFL, Burgwedel, Deutschland)
- Stativ für Kamera Modell RS1 (Kaiser, Buchen, Deutschland, Deutschland)
- Thermocycler Modell PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, USA, Vertrieb Biometra, Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- Thermomixer Eppendorff 5436 (Eppendorff, Hamburg, Deutschland)
- Transiliminator Modell T/1 (Biometra, Göttingen, Deutschland)
- Umlaufkühlwasserbad Modell Haake K20/DC1 (Karlsruhe, Deutschland)
- Vortex Modell Reax 2000 (Heidolph, Kehlheim, Deutschland)
- Vortex™ Genie–2 (Scientific industries, Bohemia, NY, USA)
- Analysenwaage Modell 3716 (Sartorius, Göttingen, Deutschland)

#### Elektrophorese:

- Horizontale Gelapparatur für PAGE: Multiphor® II (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)

#### Flachbettkammer für Agarosegele:

- Modell GNA-100 (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland),
- Eigenbau der Werkstatt des Instituts für Tierzucht und Tierverhalten, Trennstrecke 17 cm

#### Stromversorgung für die Elektrophorese:

- MultiDrive™ XL (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)
- PowerPack PP2-79 (Uldum, Dänemark)

#### Spezielle Software:

- Bildaufzeichnungssoftware: Movie Machine II, (Fast Multimedia, München, Deutschland)
- Primerdesign: OLIGO 4.0 Primer analysis software (National Biosciences, Plymouth, MN, USA)
- Statistiksoftware: SigmaStat (ver. 2.03, Jandel Scientific, Jandel, CA, USA); SAS (SAS, ver. 6.12, SAS Institute, Carry, NY, USA)
- Software zur Geldokumentation: Image Master 1D Elite, ver. 3.00 (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)

Bakterienkultur:

- Brutschrank, Modell function line (Hereaus, Hanau, Deutschland)
- Schüttelinkubator, Modell Thermoshaker (Gerhardt, Vertrieb: Jürgens, Omnilab, Gehrden, Deutschland)

Zentrifugen:

- Kühlzentrifuge Modell Minifuge T, Biofuge 28 RS und Megafuge 1.0R
  - Tischkühlzentrifuge Modell Biofuge fresco
  - Tischzentrifuge Modell Biofuge A
- alle Zentrifugen von der Firma Hereaus (Hanau, Deutschland)

Sonstiges:

Nicht aufgeführte Substanzen und Lösungen werden im Text beschrieben. Das im Text als H<sub>2</sub>O bezeichnete Wasser wurde durch das Milli-Q-Water-System aufgereinigt.

## Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. Dr. N. Parvizi für die Überlassung des Themas, die stets gewährte Unterstützung und Diskussionsbereitschaft sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und den damit verbundenen Arbeitsmöglichkeiten möchte ich mich bei dem Leiter des Instituts für Tierzucht und Tierverhalten der FAL in Mariensee Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. F. Ellendorff bedanken.

Herrn Prof. Dr. J. Harmeyer danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ich möchte mich bei Herrn Dr. F. Elsaesser für die interessanten und informativen Diskussionen bedanken.

Herrn Dr. G. Marx danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Tierzucht und Tierverhalten bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme.

Mein Dank gilt insbesondere den Mitarbeitern des Forschungsbereichs Funktionelle Genetik und Bioregulation. Vermissen werde ich die aufschlussreichen und spannenden Pausengespräche.

Für die Zusammenarbeit im OP bzw. im Labor danke ich insbesondere Frau U. Beermann, Frau M. Stünkel und Herrn R. Wittig.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn J. Carnwath, Ph.D. und Frau D. Herrmann aus dem Forschungsbereich Biotechnologie, die stets meinen Fragen offen gegenüber standen.

Herrn Dr. M. Pfaffl und Frau Prof. Dr. Dr. H. Sauerwein danke ich für die ersten Einblicke in die Welt der PCR, am Institut für Physiologie des Forschungszentrums für Milch und Lebensmittel der TU München in Freising.

Frau Dr. C Klein, Ph.D. und Frau Dr. C. Schlumbohm, Institut für Physiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover, möchte ich meinen Dank aussprechen für ihre Hilfe bei den PVDRI-Schweinen.

Mein besonderer Dank gilt Birgit und meinen Eltern für ihre ausdauernde Geduld und Unterstützung.

*Der Weg des Aiki ist natürlich und einfach.*

ROLF BRAND