

Expressionsbedingte Veränderungen bei Wachstumshormon-transgenen Mäusen

Consequences of transgene expression in growth hormone-transgenic mice

E. Wolf

Zusammenfassung: Transgene Mäuse, die Genkonstrukte bestehend aus dem Metallothionein I-Promotor der Maus (mMT) und dem Strukturgen für humanes Wachstumshormon (hGH) im Genom trugen, wurden im Hinblick auf die Vererbung und Expression der Transgene sowie auf daraus resultierende Veränderungen untersucht. Als Vergleichstiere dienten NMRI-Mäuse der Ausgangspopulation (Pop) sowie Tiere einer auf hohes 8 Wochengewicht selektierten NMRI-Linie (N8). Bei Anpaarung der transgenen Mäuse an nicht-transgene Kontrolltiere lag der Anteil transgener Nachkommen in den meisten Fällen im erwarteten Bereich von 50%. Ein primär transgenes Tier mit mehreren Integrationsstellen hatte dagegen 27/30 transgene Nachkommen. Ferner war bei einigen transgenen Mäusen ein teilweises oder völliges Verschwinden der Transgene aus der Keimbahn zu beobachten. Als Ursache für dieses Phänomen werden bisher nicht näher bekannte DNA-Reparaturmechanismen diskutiert. Um ein geeignetes Meßsystem zur Quantifizierung der Transgen-Expression zu finden, wurden 3 kommerzielle hGH-Assays vergleichend untersucht. Die Wahl fiel auf den Hybritech Tandem-R® hGH Assay, da er eine spezifische Detektion von hGH im Serum mMT-hGH-transgener Mäuse ermöglichte und bis zu Konzentrationen von 10.000 ng hGH/ml Serum keine Anzeichen eines "high dose Hook Effekts" zeigte. Die hGH-Konzentrationen im Serum der mMT-hGH-transgenen Mäuse bewegten sich zwischen 3.000 und 900.000 ng/ml, wobei in einer der untersuchten Linien ein prämortaler Anstieg der hGH-Konzentration im Serum nachgewiesen werden konnte. Die Untersuchung des Verlaufs der hGH-Konzentrationen im Serum ergab kurz-, mittel- und langfristig hohe Werte, die nur geringe undulierende Schwankungen zeigten. Durch Verabreichung von 25 mmol ZnSO₄/l Trinkwasser über 1 Woche war eine Steigerung der Transgen-Expression um den Faktor 2 bis 10 zu erreichen. Die Gewichtsentwicklung der transgenen Mäuse war im Vergleich zu Pop-Kontrollen charakterisiert durch einen signifikant steileren Verlauf der Wachstumskurve in der Phase vom 30. bis 120. Tag ohne erkennbaren Geschlechtsdimorphismus, ein signifikant höheres Maximalgewicht sowie einen drastischen präfinalen Gewichtsverlust. Die maximalen Körpergewichte der transgenen und der N8-Mäuse unterschieden sich jedoch nicht signifikant. Bei den untersuchten mMT-hGH-transgenen Mäusen konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem maximal erreichten Körpergewicht und der hGH-Konzentration im Serum nachgewiesen werden. Die Vermessung der äußeren Körperproportionen und des Skeletts ergab als Ausdruck eines Gigantismus für die transgenen Mäuse i.d.R. höhere Werte als für die Pop- und meist auch höhere Werte als für die N8-Kontrolltiere. Die absoluten Gewichte von Herz, Lunge, Leber, Milz, Nieren und Magen-Darm-Trakt (MDT) lagen bei den transgenen Mäusen signifikant höher als bei den Pop-Kontrollen. Im Vergleich zu den N8-Mäusen war nur das absolute Nierengewicht der transgenen Tiere signifikant erhöht. Bezogen auf das finale Körpergewicht waren alle Organe mit Ausnahme der Milz bei den transgenen Mäusen signifikant schwerer als in beiden Kontrollgruppen. Die Nieren der transgenen Tiere waren auch in Relation zum maximalen Körpergewicht schwerer als die der Pop- und N8-Mäuse, was auf eine dysproportionale Vergrößerung dieses Organes hinwies. Die Messung der Länge des MDT ergab bei den mMT-hGH-transgenen Mäusen höhere Werte als in beiden Kontrollgruppen. Das intraabdominale Fett war bei den transgenen Mäusen absolut wie auch in Relation zum finalen Körpergewicht reduziert. Klinisch-chemische Untersuchungen ergaben bei den transgenen Tieren als Ausdruck einer Niereninsuffizienz erhöhte Kreatinin-, Harnstoff- und Kaliumkonzentrationen im Serum. Eine Erhöhung der AST-, ALT- und LDH-Aktivitäten im Serum war in Anbetracht der morphologischen Befunde als Folge eines Leberschadens zu werten. Die Messung der Blutglukosespiegel ergab bei den transgenen Mäusen keinen Hinweis auf das Vorliegen einer diabetischen Stoffwechsellage. Die Nüchtern-Insulinspiegel lagen bei den transgenen Mäusen durchschnittlich um den Faktor 1,5 höher als bei Kontrollen ($p < 0,01$). Ferner wurden bei den transgenen

Tieren um den Faktor 2,9 höhere IGF I-Konzentrationen im Serum gemessen als bei Kontrollen. Die weiblichen mMT-hGH-transgenen Mäuse waren bis auf wenige Ausnahmen unfruchtbar, aber auch die männlichen Tiere ließen Fertilitätsstörungen erkennen. Eine unabhängig vom Geschlecht drastisch verkürzte Lebenserwartung der transgenen Mäuse war durch schwere pathomorphologische Befunde der Nieren und der Lebern dieser Tiere zu erklären. Die Nieren der transgenen Mäuse waren i.d.R. vergrößert, zeigten einen gelb-braunen Farbton und ließen häufig multiple Zysten der Rinde erkennen. Im histologischen Bild herrschten 2 Arten von in aller Regel diffusen glomerulären Veränderungen vor, einerseits eine segmentale bis totale Glomerulosklerose und andererseits eine segmentale oder globale Glomerulohyalinose. Damit vergesellschaftet trat i.d.R. eine hochgradige Atrophie von Nephronen in Verbindung mit einer massiven zystischen Dilatation von Tubuluslumina in Erscheinung. Das Niereninterstitium war in diesen Fällen kleinherdig fibrotisiert und zeigte mononukleäre Zellinfiltrate. Das Spektrum der Leberveränderungen reichte von einer zentrolobulären bis diffusen Hypertrophie der Hepatozyten und Leberzellkerne in Verbindung mit Einzelzellnekrosen bis hin zu bereits makroskopisch faßbaren Alterationen in Form eines nodulären Umbaus der Leber mit Gruppen- und Massenzellnekrosen sowie postnekrotischen Fibrosierungen. Die geschilderten Ergebnisse lassen GH-transgene Mäuse in besonderem Maße geeignet erscheinen zur Untersuchung grundlegender molekulargenetischer Probleme sowie der Physiologie und Pathologie des Wachstums. Aufgrund der bei diesen Tieren beobachteten Nierenveränderungen stellen sie ein wertvolles Modell zum Studium der Pathogenese der renalen Glomerulosklerose dar.

Summary: Transgenic mice harbouring mouse metallothionein I-human growth hormone (mMT-hGH) fusion genes were examined regarding the transmission and expression of the transgenes as well as alterations due to transgene expression. Transgenic animals were compared with NMRI mice of the basic population (Pop) and with mice belonging to a line of NMRI mice selected for high 8-week body weight. In most cases, mating transgenic mice with non-transgenic controls resulted in 50% transgenic offspring as expected. However, one transgenic founder animal had 27/30 transgenic progeny, which was explained by several integration sites for the transgene in the founder animal. Furthermore in some transgenic mice a partial or complete loss of transgenes from the germ line was observed. Unknown DNA repair mechanisms are discussed as a possible reason for this phenomenon. In order to find a suitable system for quantifying transgene expression, 3 commercial hGH-assays were compared. Hybritech Tandem-R® hGH was selected, because this assay was able to specifically detect hGH in the serum of mMT-hGH-transgenic mice and did not show any sign of a "high dose Hook effect" up to concentrations of 10,000 ng hGH/ml serum. The concentration of hGH in the serum of mMT-hGH-transgenic mice ranged from 3,000 to 900,000 ng/ml. In one of the investigated lines a rise of the serum hGH concentrations was found prior to death. The serum hGH concentrations were high both on a long and short term basis, showing only small fluctuations. Application of 25 mmol ZnSO₄/l drinking water for one week resulted in a 2- to 10-fold increase in serum hGH concentrations. The body weight gain of transgenic mice in comparison with Pop-controls was characterized by a significantly steeper slope of the growth curve from day 30 to 120 without any sex-related differences, a significantly higher maximum body weight, and a drastic weight loss at the end of their life. However, maximum body weights of transgenic and N8-mice did not differ significantly. In the mMT-hGH-transgenic mice examined, a significant correlation between the maximum body weights and the serum hGH concentrations could not be proven. External body proportions and skeletal dimensions of transgenic mice as a rule exceeded those of Pop-controls and often those of N8-mice, indicative of gigantism. Absolute weights of heart, lungs, liver, spleen, kidneys, and gastroenteric tract were significantly higher in transgenic mice than in Pop-controls. However, when compared to N8-mice, only the absolute weight of the kidneys was increased. Relative to final body weight, all organs except for the spleen were significantly heavier in transgenic mice than in both control groups. The kidney weight/maximum body weight ratio was also higher in transgenic than in Pop- and N8-mice, implying a disproportionate enlargement of this organ. The gastroenteric tract of transgenic animals was longer than those of both control groups. In transgenic mice intraabdominal fat was reduced both absolutely and in relation to final body weight. Clinico-chemical

investigations revealed an increase in creatinine, urea, and potassium concentrations in the serum of transgenic mice as a consequence of renal insufficiency. AST, ALT, and LDH activities were higher in transgenic mice than in controls. When taken together with the pathomorphological findings, this was considered to be due to hepatic damage. Measurement of blood glucose levels did not indicate a diabetic metabolic condition in transgenic mice. Average fasting insulin levels in the serum of transgenic mice were 1.5-fold higher than in controls. Serum IGF I concentrations of transgenic mice exceeded those of controls by 2.9-fold. With a few exceptions, mMT-hGH-transgenic females were infertile and male fertility was also impaired. The life expectancy of both male and female transgenic mice was reduced drastically. This was explained by severe pathomorphological alterations in the livers and kidneys of these animals. The kidneys of transgenic mice were as a rule enlarged, yellow-brown in colour, and often showed multiple cysts of the renal cortex. Histological examination of the kidneys revealed 2 types of mostly diffuse glomerular alterations; one was a segmental or total glomerulosclerosis and the other consisted of segmental or global hyalinosis lesions. These findings were usually accompanied by a marked atrophy of nephrons in conjunction with massive cystic dilation of the tubules. In such cases a focal interstitial fibrosis and infiltration with mononuclear cells was seen. The spectrum of alterations of the livers ranged from centrilobular or diffuse hypertrophy of hepatocytes and nuclei with necrosis of individual hepatocytes to macroscopic nodular changes with necrosis of liver cell groups and postnecrotic fibrosis. These results underline the suitability of GH-transgenic mice for investigations on basic problems of molecular biology as well as on the physiology and pathology of growth. The renal lesions observed in GH-transgenic mice make them an ideal model for studies on the pathogenesis of renal glomerulosclerosis.