

# **Darstellung von Wachstumshormon-mRNA und Wachstumshormon mittels nichtradioaktiver In-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie: Untersuchungen zur Transgenexpression bei Wachstumshormon-transgenen Mäusen**

## **Detection of growth hormone mRNA and growth hormone by non-radioactive in situ hybridization and immunohistochemistry: Studies on transgene expression in growth hormone-transgenic mice**

**J. Ehrlein**

**Zusammenfassung:** Ein Verfahren zur nichtradioaktiven In-situ-Hybridisierung von Wachstumshormon(GH)-mRNA wurde etabliert und zur histologischen Lokalisation der Transgenexpression bei GH-transgenen Mäusen eingesetzt. In Ergänzung dazu wurde Wachstumshormon immunhistochemisch nachgewiesen. Untersucht wurden mMT-hGH-, mMT-bGH- und PEPCK-bGH-transgene Mäuse, die Genkonstrukte im Genom integriert haben, welche aus der Promotorregion des Gens für das Metallothionein I der Maus (mMT) bzw. des Gens für die zytosolische Form der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase der Ratte (PEPCK) und dem für humanes GH (hGH) bzw. bovines GH (bGH) kodierenden Strukturgen zusammengesetzt sind. Organpräparate nichttransgener Wurfgeschwister oder nichttransgener Mäuse der Basispopulation (POP) dienten als negative, humane und bovine Hypophysen als positive Gewebekontrollen. Für die In-situ-Hybridisierung von hGH- bzw. bGH-mRNA wurden Digoxigenin(DIG)-markierte doppelsträngige bGH- und hGH-DNA-Sonden, DIG-markierte einzelsträngige antisense-hGH-RNA-Sonden, zwei verschiedene DIG-markierte bGH-Oligonukleotidsonden sowie DIG-markierte DNA- und RNA-Kontrollsonden und unmarkierte antisense-hGH-RNA hergestellt. Die In-situ-Hybridisierung wurde vergleichend an Kryostat- und Paraffinschnitten durchgeführt. Die verwendeten, im Rahmen der Etablierung der Methode mehrfach modifizierten Arbeitsanleitungen basieren auf publizierten Protokollen zur In-situ-Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA- oder RNA-Sonden bzw. radioaktiv oder nichtradioaktiv markierten Oligonukleotidsonden. DIG-markierte Sonden wurden nach der Hybridisierung mit Hilfe eines direkten Immunalkalische-Phosphatase-Verfahrens über eine Tetrazoliumreaktion (Substrat: 5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat, Chromogen: 4-Nitroblautetrazoliumchlorid) sichtbar gemacht. Zu Vergleichszwecken eingesetzte andere Substrat-Chromogen-Kombinationen für alkalische Phosphatase (Naphtholphosphate in Kombination mit Fast Blue BB oder Neufuchsin) oder auf Peroxidase und  $H_2O_2/3,3'$ -Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid basierende Detektionsverfahren erwiesen sich für diesen Zweck aufgrund einer zu geringen Sensitivität als nicht geeignet. Die besten Ergebnisse wurden bei der In-situ-Hybridisierung mit RNA-Sonden in Paraffinschnitten erzielt. Nach Optimierung des Hybridisierungsprotokolls für RNA-Sonden gelang die Darstellung von hGH-mRNA in Paraffinschnitten routinemäßig formalinfixierter Organe mMT-hGH-transgener Mäuse bzw. autoptisch gewonnener humaner Hypophysen. Durch Kreuzhybridisierung mit DIG-markierter antisense-hGH-RNA konnte bGH-mRNA in bovinen Hypophysen sowie in Leber und Nieren PEPCK-bGH-transgener Mäuse nachgewiesen werden. In Leber und Nieren mMT-bGH-transgener Mäuse ist dies nicht gelungen. In Kryostatschnitten der Leber mMT-hGH-transgener Mäuse wurden RNA-Sonden in hohem Maße unspezifisch gebunden. Ein entsprechendes Verhalten zeigten DNA-Sonden in Kryostatschnitten von Leber und Pankreas mMT-hGH-transgener Tiere. In Paraffinschnitten verschiedener Organe mMT-hGH-transgener Mäuse konnte unter Verwendung von DNA-Sonden keine ausreichende Sensitivität erzielt werden. Die In-situ-Hybridisierung von bGH-mRNA mit Oligonukleotidsonden ist trotz zahlreicher methodischer Modifikationen bereits in Kryostatschnitten boviner Hypophysen nicht gelungen. Für die simultane Darstellung von GH und GH-mRNA wurden die In-situ-Hybridisierung und die Immunhistochemie nacheinander am selben Präparat durchgeführt. Wurde die Immunhistochemie der In-situ-Hybridisierung vorangestellt, konnte GH-mRNA nicht mehr dargestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde der immunhistochemische Nachweis von GH durch eine vorausgehende

In-situ-Hybridisierung von GH-mRNA nicht beeinträchtigt. Bei PEPCK-bGH-transgenen Mäusen wurde bGH-mRNA in der Leber und den Nieren dargestellt. Bei mMT-hGH-transgenen Mäusen wurde die Transgenexpression immunhistochemisch, mittels In-situ-Hybridisierung sowie bei einem Tier zusätzlich durch ein kombiniertes Verfahren zur simultanen Darstellung von hGH und hGH-mRNA untersucht. Die Expressionsprodukte konnten in Lunge, Herz, großen Speicheldrüsen, Pankreas, Leber, Magen, Darm, Niere, Nebenniere, Hoden, Nebenhoden, Ovar, Eileiter und Uterus, nicht aber in der Milz nachgewiesen werden. Hinsichtlich der zellulären Lokalisation der Expressionsprodukte lieferten die In-situ-Hybridisierung und die Immunhistochemie im allgemeinen übereinstimmende Ergebnisse. Bei allen untersuchten GH-transgenen Mäusen wurden organopathologische Veränderungen festgestellt. Im Vordergrund der pathologischen Organbefunde standen Alterationen der Nieren und der Leber. In den Nieren dominierten glomeruläre Läsionen und tubulozystische Veränderungen. Die mittels In-situ-Hybridisierung in Nierenpräparaten erzielten Ergebnisse sprechen dafür, daß die Glomerulopathie nicht auf eine Transgenexpression in glomerulären Zellelementen zurückzuführen ist. Die Leber fiel bei den untersuchten GH-transgenen Mäusen vor allem durch eine zentrolobulär betonte bis diffuse Hypertrophie und Polymorphie der Hepatozyten und ihrer Kerne auf. Die bei der In-situ-Hybridisierung in Leberschnitten gewonnenen Resultate ergaben keinen Hinweis auf eine pathogenetische Beteiligung einer intra- oder autokrinen GH-Wirkung. Bei bGH-transgenen Mäusen wurden Lebertumoren beobachtet. Bei einem PEPCK-bGH-transgenen Tier konnte bGH-mRNA unter anderem in einem hepatozellulären Adenom nachgewiesen werden. Dies zeigt, daß auch in neoplastischen Leberzellen eine Transgenexpression erfolgen kann. Die Ergebnisse verdeutlichen, daß mittels nichtradioaktiver In-situ-Hybridisierung die Darstellung von GH-mRNA in histologischen Präparaten routinemäßig formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebes möglich ist. Darüberhinaus ist festzustellen, daß sich die beim kombinierten Einsatz von In-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie mit Hilfe der beiden einzelnen Nachweisverfahren erzielten Resultate in ihrer Aussage ergänzen.

**Summary:** A procedure for non-radioactive in situ hybridization of growth hormone (GH) mRNA was established and applied to localize transgene expression in GH-transgenic mice histologically. Furthermore, GH was detected by immunohistochemistry. Transgenic mice harbouring mouse metallothionein I-human GH (mMT-hGH), mouse metallothionein I-bovine GH (mMT-bGH), or rat cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase-bovine GH (PEPCK-bGH) fusion genes were examined. Organs of either non-transgenic littermates or non-transgenic mice of the basic population (POP) served as negative tissue controls. Human and bovine pituitaries were used as positive tissue controls. For in situ hybridization of hGH mRNA and bGH mRNA, respectively, digoxigenin(DIG)-labeled double-stranded hGH DNA probes, DIG-labeled double-stranded bGH DNA probes, DIG-labeled single-stranded antisense hGH RNA probes, two different DIG-labeled bGH oligonucleotide probes, as well as DIG-labeled DNA and RNA control probes and unlabeled antisense hGH RNA were prepared. In situ hybridization was performed using both cryostat and paraffin sections in comparison. The procedures employed had repeatedly been subject to modification during the establishment of the technique. They are based upon published protocols for in situ hybridization with either radioactive probes (DNA probes, RNA probes, oligonucleotide probes) or non-radioactive probes (oligonucleotide probes). Following hybridization DIG-labeled probes were detected by means of a direct immunoalkaline phosphatase procedure. Alkaline phosphatase was visualized using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate and 4-Nitro Blue tetrazolium chloride as substrate and chromogen, respectively. Other substrate-chromogen combinations for alkaline phosphatase (naphthol phosphates in combination with either Fast Blue BB or New Fuchsin) as well as detection procedures based upon peroxidase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride were found to be unsuitable for this purpose due to a lack in sensitivity. The best results were obtained by in situ hybridization with RNA probes in paraffin sections. After the protocol for hybridization with RNA probes had been optimized, visualization of hGH mRNA could be achieved in paraffin sections of both routinely formalin-fixed organs of mMT-hGH-transgenic mice and routinely processed human pituitaries obtained from autopsy cases. By cross-hybridization with DIG-labeled antisense hGH RNA, detection of bGH mRNA was accomplished in bovine pituitaries as well as in the liver

and the kidney of PEPCK-bGH-transgenic mice. However, visualization of bGH mRNA could not be attained in the liver and the kidney of mMT-bGH-transgenic mice. In cryostat sections of the liver of mMT-hGH-transgenic mice, RNA probes exhibited a high degree of non-specific binding. DNA probes showed a similar non-specific binding pattern in cryostat sections of the liver and the pancreas of mMT-hGH-transgenic animals. Hybridization with DNA probes in paraffin sections of different organs of mMT-hGH-transgenic mice proved to be insufficient in sensitivity. In situ hybridization of bGH mRNA with oligonucleotide probes was already unsuccessful in cryostat sections of bovine pituitaries, although the procedure had been subject to various modifications. For simultaneous visualization of GH and GH mRNA, both in situ hybridization and immunohistochemistry were performed in the same section. When immunohistochemistry was applied prior to in situ hybridization, detection of GH mRNA could not be accomplished. In contrast, in situ hybridization of GH mRNA preceding immunohistochemistry did not impair the detection of GH. In PEPCK-bGH-transgenic mice, bGH mRNA was demonstrated in the liver and the kidney. Transgene expression in mMT-hGH-transgenic mice was investigated by both immunohistochemistry and in situ hybridization, and in one animal additionally by a combined procedure for simultaneous demonstration of hGH and hGH mRNA. The products of transgene expression could be detected in lung, heart, salivary glands, pancreas, liver, stomach, intestine, kidney, adrenal gland, testis, epididymis, ovary, oviduct and uterus, yet not in the spleen. Commonly, in situ hybridization and immunohistochemistry resulted in an almost identical staining pattern. Pathologic changes of various organs were noted in all GH-transgenic mice investigated. Renal and hepatic alterations made up the predominant pathologic findings observed. Lesions of the glomeruli and tubulocystic alterations were the most conspicuous renal changes. Results obtained by in situ hybridization in tissue sections of the kidney indicate that the glomerulopathy is not due to transgene expression in glomerular cells. Centrilobular to diffuse hypertrophy and polymorphism of both hepatocytes and hepatocellular nuclei were the predominant lesions observed in the liver of GH-transgenic mice. Results obtained by in situ hybridization in liver sections did not provide evidence for any involvement of either intracrine or autocrine GH effects in the pathogenesis of these hepatocellular alterations. Liver tumors were observed in bGH-transgenic mice. In one PEPCK-bGH-transgenic animal, bGH mRNA could be detected in a hepatocellular adenoma. This indicates that transgene expression can not only occur in non-neoplastic liver cells but also in neoplastic hepatocytes. The results illustrate that visualization of GH mRNA in histological sections of routinely formalin-fixed and paraffin-embedded tissue can be accomplished by non-radioactive in situ hybridization. Furthermore, it has to be noted that the results obtained by the combined use of in situ hybridization and immunohistochemistry add further information to the interpretation of the findings obtained by each method regarded on its own.