

Aus dem Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung,
W.G. Kerckhoff-Institut, Abteilung für Experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim

***In vivo* und *in vitro* Untersuchungen zur Rolle des
Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors-II im Schweineherzen,
IGF-II transgenen Mäusen und Myoblasten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von
Diplom-Biologin Stefanie Böhm
Giessen, 2002

D26

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Rainer Renkawitz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Schaper

Tag der mündlichen Prüfung: 17.6.2002

meiner lieben Familie

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Arbeitsgruppe Molekulare Kardiologie der Abteilung Experimentelle Kardiologie des Max-Planck-Institutes für physiologische und klinische Forschung (W. G. Kerckhoff-Institut) in Bad Nauheim unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schaper angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schaper danke ich für die Vergabe des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Weiterhin danke ich ihm, daß er es mir ermöglichte, die Ergebnisse der Arbeit auf Kongressen vorstellen zu dürfen. Für die Begutachtung meiner Arbeit möchte ich ihm herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Rainer Renkawitz danke ich für die Bereitschaft zur Vertretung vor dem Fachbereich Biologie an der Justus-Liebig-Universität Giessen und die Begutachtung der Dissertation.

Herrn Dr. René Zimmermann danke ich für seine engagierte Betreuung und seinen Diskussionseifer. Weiterhin möchte ich mich für seine freundliche Unterstützung während der gesamten Zeit und für die Durchsicht der Arbeit bedanken.

Für eine gute Zusammenarbeit im Labor möchte ich mich bei Frau Claudia Ullmann ganz herzlich bedanken, wie auch für das eifrige Korrekturlesen.

Frau Marianne Granz gilt mein besonderer Dank hinsichtlich gemeinsamer Arbeiten im Labor. Auch bei ihr möchte ich mich herzlich für das Durchsehen der Arbeit bedanken.

Allen Mitgliedern des Labors schulde ich meinen Dank für das angenehme und freundliche Arbeitsklima und alle offenen Ohren.

Herrn Gerhard Stämmler danke ich für die Unterstützung bezüglich aller computertechnischen Fragen.

Zusammenfassung

Der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-II (IGF-II) spielt eine zentrale Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen. Für das porcine IGF-II sind mehrere mRNAs beschrieben. Die 6.0 kb mRNA ist nach dem Okklusion/Reperfusionmodell im Herzen induziert. Exogen appliziertes IGF-II wirkt kardioprotektiv und verringert den infarzierten Bereich im Schweineherzen. Ziel dieser Arbeit war es, Aufschluß über die Rolle des IGF-II in Myoblasten zu bekommen. Es sollte untersucht werden, welcher Promotor für die durch Ischämie- und Stress-induzierte 6.0 kb mRNA verantwortlich ist. Eine genomische Karte des Schweinegens galt es zu erstellen und anhand von transgenen Mäusen und einer Myoblasten-Zellkultur sollte die Regulation des IGF-II in Myoblasten näher betrachtet werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen an Gewebeproben aus dem Myokard des Schweins weisen auf eine ähnliche Struktur des humanen und porcinen IGF-II-Gens hin. Promotor P1 und P2 sind für die Transkription der 6.0 kb mRNA verantwortlich. Auch konnte eine 6.0 kb Antisense-RNA nachgewiesen werden. Die herzspezifische Überexpression von humanem IGF-II in Mäusen scheint von Nachteil für die Entwicklung zu sein, da lediglich ein Foundertier gefunden wurde und die Nachkommenzahl der heterozygoten Tiere vermindert war. *In vitro* Untersuchungen in Myoblasten zeigten, daß die Expression des endogenen IGF-II von der Zelldichte abhängt. Dies deutet auf eine positive Rückkopplung bei der Regulation des IGF-II hin. Die Überexpression bewirkte eine Vergrößerung der Zellen und hemmte die Differenzierungsfähigkeit zu Myotuben. Wie in den transgenen Mäusen konnten auch in der Zellkultur Sense- und Antisense-RNAs des H19 nachgewiesen werden. Vergleichbar mit dem Schweineherzen war eine IGF-II Antisense-RNA auch in den nicht transfizierten Myoblasten zu detektieren. Der IGF-II Rezeptor, der die IGF-II-Konzentration reguliert, war in den IGF-II überexprimierenden Myoblasten induziert. Neben dem genomischen Imprinting spielt also auch die Regulation über Antisense-RNA eine Rolle. Exogenes IGF-II hemmt die Expression der IGF-II-Antisense-RNA und der H19 Sense-mRNA, hat aber keinen Einfluß auf die Transkription der Antisense-RNA des H19. Umgekehrt scheint IGF-II in seiner Expression nicht von H19 beeinflusst zu sein. Parallel zu seinen kardioprotektiven Effekten hat IGF-II auch negativen Einfluß, seine Wirkung ist ambivalent.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Böhm S, Deindl E, Schaper W, Zimmermann R. Preliminary characterization of the porcine Insulin-like growth factor II promoters. *Growth Hormone & IGF Research*, 1999; 9, P55

2000, Workshop on Current concepts and Methods in Cardiovascular Research: Characterisation of the genomic organisation of Insulin-like growth factor II (IGF II), a gene involved in ischaemia / reperfusion injury in the pig heart.

Böhm S, Shimada M, Deindl E, Bauer EP, Schaper W, Zimmermann R. Transient and stable transfection of IGF-II in L6 rat myoblasts alter IGF-II receptor expression. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2000; 32, A64

Shimada M, Böhm S, Schaper W, Zimmermann R. Gene Expression patterns of the insulin-like growth factor system in cardiac & skeletal muscle cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2001; 33, A111

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Familie der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren	1
1.2	Insulin-like growth factor-II (IGF-II)	3
1.2.1	Das IGF-II-Gen	3
1.2.1.1	Evolution des IGF-II-Genes	3
1.2.1.2	Struktureller Aufbau des IGF-II-Genes	3
1.2.1.3	Alternatives Spleißmuster des IGF-II-Genes	4
1.2.2	Regulation des IGF-II	6
1.2.2.1	Entwicklungs- und gewebsspezifische Regulation	6
1.2.2.2	Genomischer Stempel – Genomic Imprinting	7
1.2.2.3	H19-Gen	9
1.2.3	IGF-II-Protein	9
1.2.4	Zelluläre Signalwege des IGF-II	10
1.2.4.1	Rezeptoren des IGF-Systems	10
1.2.4.2	Bindungsproteine	12
1.2.5	Die Rolle des IGF-II bei Erkrankungen	12
1.3	Herz und Herzmuskelzellen	13
1.3.1	Myoblasten im Herzen und im Skelettmuskel	13
1.3.2	IGF-II und Ischämie	13
1.4	Fragestellung	14
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Material	15
2.1.1	Geräte und sonstige Bedarfsgegenstände	15
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3	Chemikalien	16
2.1.3.1	Chemikalien, Lösungen und Nährmedien für molekularbiologische Techniken	16
2.1.3.2	Chemikalien, Proteine und Antikörper für die Proteinchemie	20
2.1.3.3	Chemikalien für die Zellkultur	22
2.1.4	Enzyme und Kits	22
2.1.5	Oligonukleotide	23
2.1.6	Plasmide und verwendete Klone	24
2.1.7	Bibliotheken	25
2.1.8	Bakterienstämme	25
2.2	Methoden	26

Inhaltsverzeichnis

2.2.1	Kompetente Bakterien (CaCl ₂ -Methode)	26
2.2.2	Transformation von Bakterien	26
2.2.3	Blau-Weiß-Differenzierung	27
2.2.4	Plasmidpräparation	27
2.2.4.1	Quick-Check (nach Rinji Akada ⁹⁸)	27
2.2.4.2	Plasmidpräparation	28
2.2.4.3	Anlegen von Glyzerinstocks der Bakterienklone	28
2.2.5	Quantifizierung von Nukleinsäuren	28
2.2.6	Restriktionsverdau	28
2.2.7	Polymerase-Ketten-Reaktion	29
2.2.7.1	PCR-Protokoll zur Amplifikation von genomischer DNA	29
2.2.7.2	Aufreinigung von PCR-Produkten	30
2.2.8	Auffüllen von 5'-Überhängen mit der Klenow-Polymerase	30
2.2.8.1	Dephosphorylierung von 5'-Enden	30
2.2.9	Klonierung von PCR-Produkten und restringierten Fragmenten	30
2.2.10	Isolation von Nukleinsäuren	31
2.2.10.1	Isolation genomischer DNA aus Gewebe	31
2.2.10.2	Genomische DNA-Isolation aus Mausschwanz-Biopsien ¹⁰¹	31
2.2.10.3	RNA-Isolation	32
2.2.10.4	DNA/RNA-Isolation aus Zellen	32
2.2.11	Gelelektrophorese	33
2.2.11.1	DNA-Gel	33
2.2.11.2	Denaturierendes Formaldehydgel	33
2.2.11.3	Southern Blot Analyse	33
2.2.12	Northern Blot Analyse	34
2.2.13	Markierung der Sonden	35
2.2.13.1	Sondenherstellung	35
2.2.13.2	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen durch Elektroelution	35
2.2.13.3	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit GeneClean III Kit	35
2.2.13.4	³² P-Markierung von Sonden	36
2.2.13.5	Hybridisierung mit cDNA-Sonden und Oligonukleotiden	37
2.2.13.6	Quantifizierung der Signale	37
2.2.14	Screening von Bibliotheken	38
2.2.15	Sequenzierung nach Sanger mit ALF	38
2.2.16	Proteinanalyse	38
2.2.16.1	Proteinisolation aus Zellen	38
2.2.16.2	Western Blot Analyse	39
2.2.16.3	Proteingel	39
2.2.16.4	Detektion des Western Blots	39
2.2.17	Zellkultur	40
2.2.17.1	Passagieren von Zellen und Ansetzen von Zellversuchen	40
2.2.17.2	Zellzahlbestimmung	40
2.2.17.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	41

2.2.17.4	Ernte der Zellen	41
2.2.17.5	Transiente und stabile Transfektion	41
2.2.17.6	Auswertung der Morphologie der Zellen	42
2.2.18	Transgene Mäuse	42
2.2.19	Stunning Protokoll	42
3	RESULTATE	43
3.1	Restriktionskarte des IGF-II-Gens des Schweins	43
3.1.1	Subklone des IGF-II-Genes beim Schwein	43
3.2	Promotor-Aktivitäten des porcinen IGF-II-Gens	46
3.2.1	Northern Blot Analyse als indirekter Nachweis der Promotor-Aktivitäten	46
3.2.1.1	Promotor P1 generiert eine 6.0 kb mRNA	48
3.2.1.2	Zwei mRNAs werden ausgehend von Promotor P2 transkribiert	49
3.2.1.3	Promotor P3 ist verantwortlich für eine 4.8 kb mRNA	50
3.2.1.4	Vier mRNAs werden bei Einsatz des Promotors P4 transkribiert	51
3.2.1.5	In zwei mRNAs kann die 3' UTR Region detektiert werden	51
3.2.1.6	Struktur des porcinen IGF-II-Genes	54
3.2.2	Antisense-RNA	54
3.3	Konstruktion IGF-II transgener Mäuse	56
3.3.1	Das Konstrukt	56
3.3.2	Mäusestamm	57
3.3.3	Herstellung der transgenen Mäuse	57
3.3.4	Nachweis des Transgens mittels PCR und genomischem Southern Blot	57
3.3.5	Expressionsuntersuchungen des Transgens auf mRNA-Ebene	58
3.3.6	Expression des H19-Gens in IGF-II transgenen Mäusen	59
3.3.7	Analyse der Paarung (Anzahl der Nachkommen)	60
3.4	Transfektion des humanen IGF-II in Myoblasten	62
3.4.1	Das Konstrukt	63
3.4.2	Transfektion von pEGFP-C1 in L6 Myoblasten	63
3.4.3	Transfektion der L6 Zellen mit pEGFP/IGF-II	63
3.4.4	Selektion stabil transfizierter Zellen	65
3.4.5	Expression der Konstrukte	65
3.4.5.1	Transkription der Konstrukte	65
3.4.5.2	Translation der Konstrukte	67
3.4.6	Lokalisierung des fluoreszierenden Proteins in der Zelle	70
3.4.7	Morphologie transfizierter L6 Myoblasten und ihr Differenzierungsverhalten	71
3.4.8	IGF-II Expression in Abhängigkeit der Zelldichte	73
3.4.9	Antisense-Expression des IGF-II	76
3.4.10	Transkription des H19-Gens in Sense- und Antisense-Richtung	77
3.4.11	Einfluß der Überexpression auf das IGF-System	78

4	DISKUSSION	81
4.1	Struktur des IGF-II-Gens in unterschiedlichen Spezies	81
4.2	Alternativer Einsatz der Promotoren beim Schwein	81
4.2.1	Transkription unterschiedlicher mRNAs ermöglicht Aussage über Promotor-Aktivitäten	81
4.2.2	IGF-II-Antisense-Transkripte im Schweineherzen	84
4.2.3	Rolle der 6.0 kb mRNA im Stunning-Modell	85
4.3	Herzspezifische Überexpression des IGF-II in transgenen Mäusen	86
4.3.1	Wirkung der Überexpression des IGF-II Transgens	86
4.3.2	H19 in IGF-II transgenen Mäusen	88
4.4	Überexpression des humanen IGF-II in Myoblasten	89
4.4.1	Zelldichte-abhängige Expression des IGF-II in Myoblasten	89
4.4.2	Lokalisierung des endogenen und exogenen IGF-II in der Zelle und im Überstand	90
4.4.3	Veränderte Morphologie der IGF-II transfizierten L6-Zellen	90
4.4.4	Überexpression des IGF-II inhibiert Differenzierungsfähigkeit der Myoblasten.	91
4.4.5	Expression anderer Mitglieder des IGF-Systems	93
4.4.6	Expression des H19-Gens	94
4.4.7	Einfluß des IGF-II auf die Expression von Aktin	97
4.5	Imprinting und Antisense-Regulation des IGF-II / H19-Systems	98
5	LITERATUR	101
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	113

1 Einleitung

1.1 Die Familie der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren

Die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (insulin-like growth factors, IGFs) sind kleine Polypeptide mit insulin-ähnlicher und wachstumsfördernder Wirkung. Zwei Spezies, IGF-I und IGF-II, sind bekannt^{1,2}. Sie haben sowohl zueinander (54 %) als auch zu Insulin strukturelle Homologien (47 %). IGF-I ist ein basisches Polypeptid mit 70 Aminosäuren (AS), welches eine große Rolle im postnatalen Wachstum spielt, während IGF-II, ein schwach saures Peptid mit 67 AS, hauptsächlich in der fetalen Entwicklung involviert ist. Während IGF-I nicht glykosyliert ist, wurden von IGF-II neben der nicht glykosylierten Form auch mindestens 12 verschiedene Isoformen mit Molekulargewichten zwischen 11-20 kDa und unterschiedlicher Glykosylierung gefunden^{3,4}. Die IGFs werden in erster Linie in der Leber synthetisiert und zirkulieren in weitaus höherer Konzentration (im nanomolaren Bereich) im Blutplasma als Insulin (picomolare Konzentration). Ihre Sekretion findet langsam und kontinuierlich statt.

Beide Wachstumsfaktoren binden mit höherer Affinität an sechs extrazelluläre Bindungsproteine (IGFBP) als an die Rezeptoren (Typ I und Typ II). Aufgrund der Bindung an die IGFBPs werden die IGFs in ihrer biologischen Aktivität und der Halbwertszeit reguliert. Neben diesen Bindungsproteinen hoher Affinität gibt es solche mit niedriger Affinität wie das IGFBP-7, das auch „IGFBP-related protein 1“ (IGFBP-rP1) genannt wird oder das IGFBP-8 (IGFBP-rP1)⁵. Insgesamt sind bisher neun solcher Proteine (IGFBP-rP1-9) beschrieben⁶. Daneben gibt es Proteasen, die Bindungsproteine abbauen⁷ (Abb. 1).

Zu den metabolischen, insulin-ähnlichen Effekten der IGFs gehören z. B. die Stimulierung der Glucose-Aufnahme, die Glykogen- und Lipid-Synthese⁸. Auch wenn die IGFs im Vergleich zum Insulin bei der Stimulation von metabolischen Effekten eine 10-100-fach geringere Wirksamkeit zeigen, können hohe Konzentrationen an IGF hypoglykämische Effekte auslösen. Anders als beim Insulin werden die IGFs nicht ausschließlich von einem Organ produziert. Sie haben neben ihren metabolischen Eigenschaften auch wachstumsfördernde Wirkungen und können ihre

mitogenen Wirkungen sowohl über autokrine und/oder parakrine als auch über endokrine Mechanismen ausüben, wobei sie die DNA- und RNA-Synthese stimulieren und die Proliferationsrate in einer Vielzahl von Zellen *in vitro* und *in vivo* erhöhen⁸⁻¹⁰.

THE INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR (IGF) SYSTEM

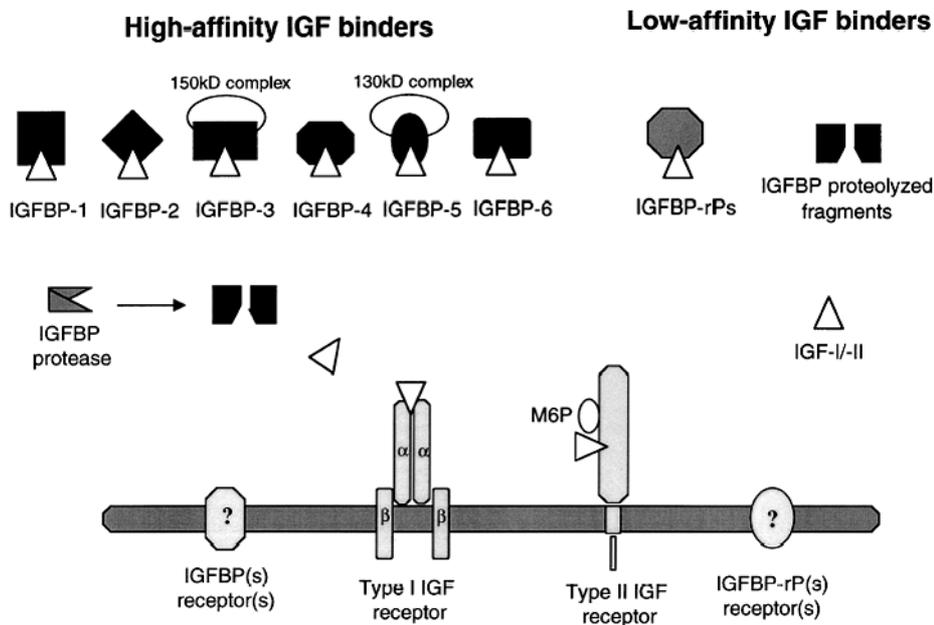


Abb. 1: IGF-IGFBP-Achse. IGFBP-1 bis -6 binden die IGFs mit hoher Affinität und regulieren die Verfügbarkeit der freien IGFs. Neun IGFBP-rPs binden die IGFs mit geringer Affinität. Spezifische IGFBP-Proteasen verdauen die IGFFBPs und regulieren dadurch die Menge an IGFs wie auch die IGFFBPs selbst. IGFFBPs sind in IGF-abhängige und unabhängige Mechanismen involviert. IGF-I und IGF-II binden an zwei unterschiedliche Rezeptoren, den Typ I und den Typ II-Rezeptor⁷.

Sie stimulieren Endothelzellen¹¹⁻¹³, glatte Muskelzellen¹⁴⁻¹⁸ und Fibroblasten¹⁷⁻²⁰ und die Differenzierung von Osteoblasten und Myoblasten²¹⁻²⁴. Gerade im Herzen scheint IGF-II eine besondere Rolle zu spielen. So wird das IGF-II pränatal stark exprimiert, während nach der Geburt die mRNA-Menge sinkt; dennoch unterstützt IGF-II die Kontraktilität der Myozyten²⁵. Vogt und Mitarbeiter²⁶ konnten am Schweineherzen zeigen, daß IGF-II ischämische Präkonditionierung imitiert und daher die Infarktgröße signifikant reduziert. Man kann von einer kardioprotektiven Funktion des IGF-II ausgehen. Diese Ergebnisse, im Zusammenhang mit denen von Kluge²⁷, die eine Induktion der 6.0 kb mRNA bei Stress und Ischämie zeigen, erfordern eine Untersuchung des IGF-II bezüglich seiner Aufgaben und der Regulation bei Stress und Ischämie.

1.2 Insulin-like growth factor-II (IGF-II)

Für das IGF-II sind auch die Synonyme Somatomedin A und Multiplication Stimulating Activity (MSA) bekannt. Die Halbwertszeit des freien IGF-II liegt bei 20-30 min und die des an IGFBP-gebundenen IGF-II bei 12-15 Stunden²⁸. Die Funktion von IGF-II *in vivo* wurde an IGF-II knock-out Mäusen untersucht. IGF-II defiziente Tiere zeichnen sich durch ein auf 60 % verringertes Geburtsgewicht aus²⁹. Dieser Zwergwuchs-Phänotyp tritt nur auf, wenn das durch homologe Rekombination ausgeschaltete Gen vom Vater vererbt wird, da das maternale IGF-II-Allel geprägt ist und somit nicht transkribiert wird³⁰. Darin zeigt sich die Bedeutung, die dem IGF-II für normales Wachstum während der Embryonalentwicklung zukommt.

1.2.1 Das IGF-II-Gen

1.2.1.1 Evolution des IGF-II-Genes

Das humane IGF-II-Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosom 11³¹⁻³⁴, 12.6 kb nach Angaben von Bell³⁵ bzw. 1.4 kb 3' des Insulin-Genes (nach Genbank-Angaben, Acc. Nr. L15440). Des weiteren sind Antisense-Transkripte beim Huhn und der Maus bekannt^{36,37}. Moore³⁷ beschrieb ein Antisense-Gen, das im 5' Bereich des IGF-II-Gens liegt (s. 1.2.2.2) und dessen Transkripte sich mit den sense-mRNAs überlappen³⁷; seine Funktion ist derzeit noch nicht untersucht.

Es kann davon ausgegangen werden, daß das IGF-II-Gen stark konserviert ist, da es bezüglich der kodierenden Sequenzen zwischen Mensch, Maus und Ratte eine Homologie von 91 % aufweist. Bei Maus und Ratte befindet sich das Gen auf Chromosom 7 bzw. 1. Beim Schwein ist seit kurzem bekannt, daß das IGF-II-Gen auf dem kurzen Arm des Chromosom 2 liegt.

1.2.1.2 Struktureller Aufbau des IGF-II-Gens

Das humane IGF-II-Gen hat eine Größe von ca. 30 kb und besteht aus 9 Exons. Die Exons 1 bis 6 bilden in verschiedener Zusammensetzung die 5' UTR (untranslatierte Region) des Gens. Exon 7, 8 und der 5' Bereich von Exon 9 sind kodierender Bereich. In Exon 9 sind zwei Polyadenylierungsstellen bekannt, die in der 3' UTR liegen. Es sind 4 Promotoren (P1-P4) für die

Regulation des IGF-II-Gens verantwortlich. Diese werden alternativ eingesetzt. Die beiden Promotoren P3 und P4 enthalten TATA-Box-ähnliche Sequenzen an der Position -25. P3 enthält zusätzlich noch eine CCAAT-Box an Position -78 und hat einen hohen GC-Gehalt von 80 %. Im Vergleich zum humanen IGF-II sind die Gene der Maus und der Ratte stark homolog, jedoch sind Exon 1, 2 und 3 nicht beschrieben. Man geht davon aus, daß diese Exons fehlen und es keinen homologen Promotor zu dem des humanen P1 gibt. Auch in der Maus, die zwei Insulin-Gene besitzt ³⁸, liegt IGF-II 3' vom Insulin Gen ³⁹.

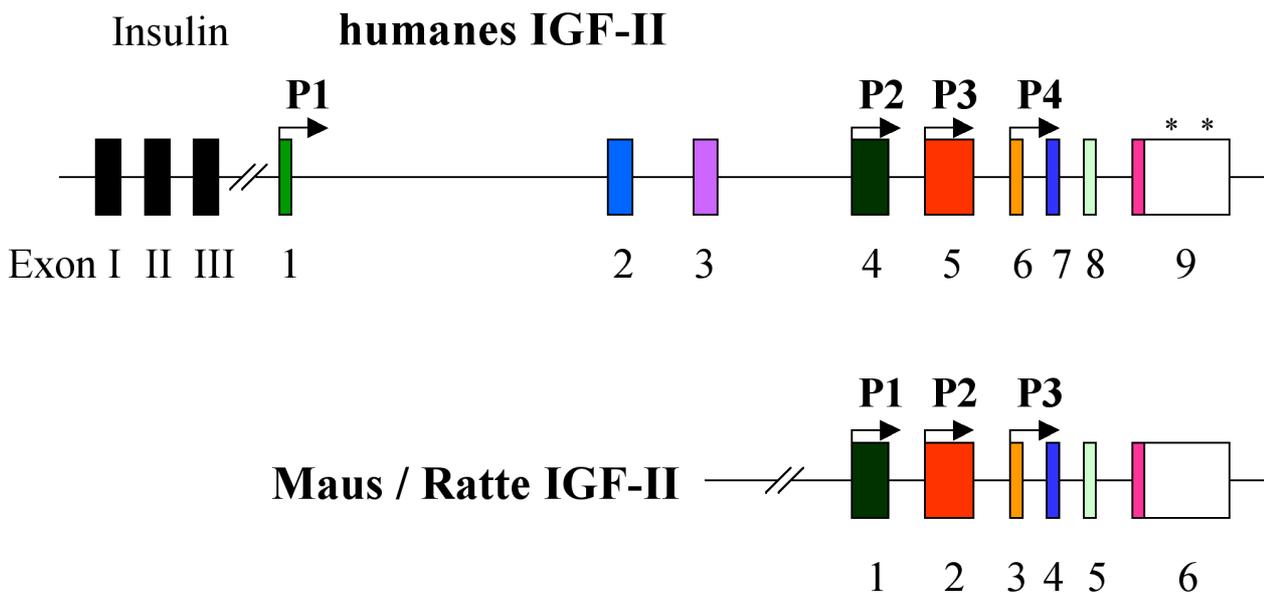


Abb. 2: Struktur des IGF-II-Gens. Skizziert ist die genomische Organisation des humanen und des Maus/Ratte IGF-II-Gens, welche stark konserviert ist. Das humane IGF-II-Gen liegt 3' des Insulin. Neben den 9 Exons (als Rechtecke dargestellt) im humanen Gen sind die vier zugehörigen Promotoren (P) und die beiden Polyadenylierungsstellen (*) in Exon 9 eingezeichnet. Die Struktur des humanen IGF-II-Gens ist in Relation zu der von Maus/Ratte gesetzt.

1.2.1.3 Alternatives Spleißmuster des IGF-II-Genes

Das IGF-II-Gen wird alternativ gespleißt. Beim Menschen sind sechs mRNAs mit Größen von 6.0, 5.3, 5.0, 4.8, 2.2 und 1.8 kb bekannt ⁴⁰⁻⁴². Für das IGF-II des Schweins sind ebenfalls mehrere mRNAs von 6.0, 5.3, 4.8, 4.4, 2.2, 1.9, 1.7 kb und 1.2 beschrieben ^{27,43,44}. Die verschiedenen Promotoren des humanen IGF-II generieren die unterschiedlichen prä-mRNAs, welche alternativ gespleißt werden (Abb. 3).

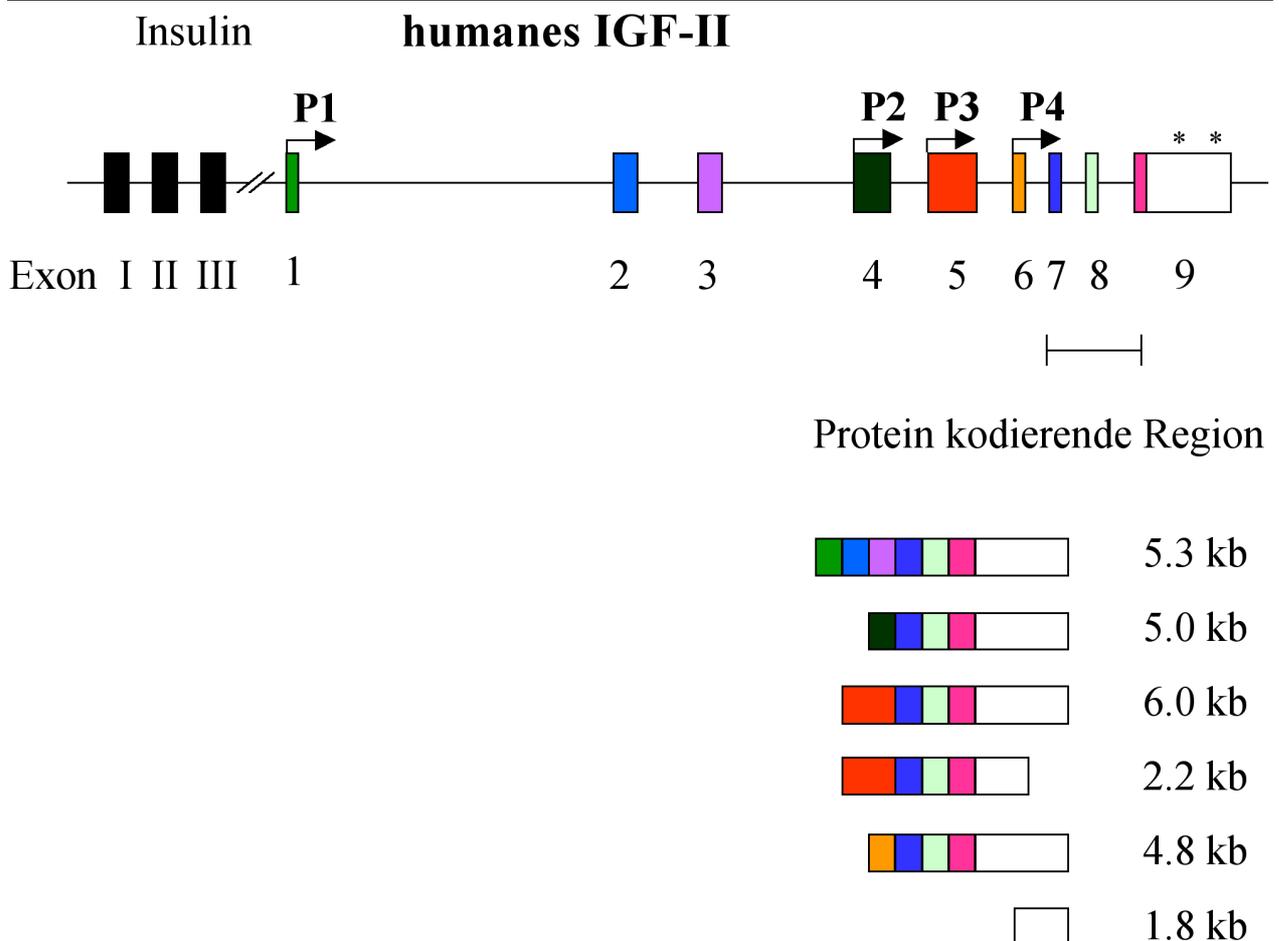


Abb. 3: Alternatives Spleißmuster des humanen IGF-II. IGF-II-prä-mRNAs werden von vier Promotoren(P) ausgehend transkribiert und durch alternatives Spleißen die fertigen mRNAs generiert, wobei bis auf eine 1.8 kb mRNA alle mRNAs für das gleiche Protein kodieren; proteinkodierende Exons (als Rechtecke dargestellt) sind gekennzeichnet. Beim Menschen sind sechs mRNAs mit 6.0, 5.3, 5.0, 4.8, 2.2 und 1.8 kb beschrieben. Die Polyadenylierungsstellen sind mit einem Stern (*) markiert.

Bis auf einen Fall ist der 3' Bereich und damit der kodierende Bereich der mRNAs immer gleich und besteht aus Exon 7, 8 und dem 5' Bereich des Exon 9. Nur die kleinste mRNA von 1.8 kb besteht ausschließlich aus dem 3' Bereich des Exon 9 und entsteht durch posttranskriptionale Prozessierung. Alle anderen mRNAs kodieren für das gleiche Protein^{45,46}. Beim humanen IGF-II-Gen liegt der Promotor P1 5' des Exon 1 und generiert eine mRNA von 5.3 kb, bestehend aus Exon 1, 2, 3 als 5' UTR und dem proteinkodierenden Anteil mit den Exons 7, 8 und 9. Promotor P2 ist für eine 5 kb mRNA mit dem Exon 4 als 5' UTR verantwortlich. Dem humanen Promotor P3 können zwei mRNAs mit den Größen 6.0 und 2.2 kb zugeordnet werden, die beide

Exon 5 als 5' UTR tragen, jedoch unterschiedliche Polyadenylierungsstellen benutzen. Der letzte Promotor (P4) ist für die Expression der 4.8 kb mRNA verantwortlich; er liegt 5' des Exon 6 (Abb. 3). Für das porcine IGF-II ist die alternative Zusammensetzung der verschiedenen mRNAs noch nicht beschrieben. Es sind beim Schwein lediglich unterschiedliche mRNAs in ihrer gewebespezifischen Expression charakterisiert (s. 1.2.2.1).

1.2.2 Regulation des IGF-II

1.2.2.1 Entwicklungs- und gewebsspezifische Regulation

IGFs und insbesondere IGF-II haben einen großen Einfluß auf die Embryonalentwicklung. So ist bei IGF-II-knock-out-Mäusen ein kleinerer Phänotyp zu finden. Entsprechend sind IGF-II transgene Mäuse mit Überexpression größer als der Wildtyp⁴⁷.

Die Verwendung der Promotoren ist entwicklungs- und gewebsspezifisch^{40,46,48-50}. Die humanen Promotoren P2, P3 und P4 sind in fetalem Gewebe aktiv (einschließlich der Leber) und bleiben während der Entwicklung in fast allen nicht-hepatischen Geweben angeschaltet. Eine Ausnahme ist die Leber, in der die Promotoren P2, P3 und P4 komplett inaktiv sind, während der Promotor P1 für die Transkription verantwortlich ist⁴⁰. Von Hedley⁴³ wurde beschrieben, daß in der fetalen Leber des Schweins mRNAs von 5.4 und 2.3 kb und im Gegensatz dazu in der adulten Leber mRNAs von 4.7 und 1.2 kb vorhanden sind.

Im Plexus choroideus des Schweinehirns wurden von Nielsen⁵¹ mRNAs des IGF-II von 1.2, 1.6, 2.4 und 4.4 kb gefunden.

Im Herzen wird das IGF-II pränatal stark exprimiert; nach der Geburt sinkt die mRNA-Menge. IGF-II induziert DNA-, Protein-Synthese und hat Einfluß auf die Proliferation von Rattenventrikel-Myozyten durch Unterdrückung lysosomaler Protein-Degradation. Damit kann auch die Entstehung von Hypertrophie erklärt werden^{28,52}. Weiterhin unterstützt IGF-II die Kontraktilität der Myozyten²⁵. Von Kluge²⁷ wurden im Herzen des Schweins mRNAs der Größen 6.0, 5.3, 4.8, 2.2, 1.9 und 1.7 kb gefunden.

Vogt²⁶ konnte bei intramyokardialer Gabe von IGF-II zeigen, daß IGF-II eine ischämische Präkonditionierung nachahmt und dadurch den Infarkt signifikant verringert. Daher kann man davon ausgehen, daß IGF-II kardioprotektiv ist. Diese Ergebnisse im Zusammenhang mit denen von Kluge²⁷, die eine Induktion der 6.0 kb mRNA bei Stress und Ischämie zeigen, werfen die Frage auf, welche Aufgabe der durch Stress und Ischämie induzierten 6.0 kb mRNA des IGF-II beim Schwein zukommt.

1.2.2.2 Genomischer Stempel – Genomic Imprinting

Mit „Imprinting“ wird das Phänomen bezeichnet, bei dem es aufgrund einer Gameten-spezifischen Methylierung kurzer Genabschnitte in der Keimbahn entweder zu einer Aktivierung oder Reprimierung eines Allels kommen kann^{53,54}.

Das IGF-II-Gen hat einen genomischen Stempel auf dem maternalen Allel, d.h. das maternale Allel ist geprägt und nicht aktiv, wohingegen das paternale Allel transkribiert wird (Abb. 4, <http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/imprinting/maps/chr7imp.gif>). Lediglich in Leber, Plexus Choroideus und ZNS wie auch in verschiedenen Tumoren⁵⁵⁻⁵⁷ wird auch das maternale Allel transkribiert; man spricht dann von einem „Loss of imprinting“ (LOI, Verlust des genomischen Stempels). Dies kann mit der Methylierung der CpG-Inseln in den Promotoren P2, P3 und P4, welche in den anderen Geweben aktiv sind, erklärt werden. Promoter P1, der in der Leber aktiv ist, enthält keine CpG-Inseln und ist daher nicht methyliert. Dies erklärt die dortige biallelische Expression. Neben dem eigentlichen Imprinting, bei dem das Gen durch diesen epigenetischen Mechanismus in seiner Transkription gehemmt wird, gibt es auch genetische Mechanismen, bei denen Antisense-RNA oder „Silencer“ eine wesentliche Rolle spielen. Bei der Antisense-Hemmung verhindert die Transkription der Antisense-RNA die Translation der Sense-mRNA. Meist wird der maternale Stempel durch Methylierung ausgelöst^{58,59}. Auch der Kondensationsgrad des Chromatins spielt eine Rolle in der Regulation des Imprintings.

1.2.2.3 H19-Gen

IGF-II zeigt in vielen Tumoren eine Überexpression, wohingegen H19 Eigenschaften eines Tumorsuppressorgens zugeschrieben werden⁶¹. H19 liegt beim Menschen 3' des IGF-II-Gens auf Chromosom 11 (s.1.2.2.2). Es wird zwar transkribiert, ein Protein konnte bis jetzt der mRNA nicht zugeordnet werden. Die mRNA konnte postnatal nur in Skelettmuskel und Herzmuskel nachgewiesen werden⁶², während sie nur in bestimmten Phasen der fetalen Entwicklung in verschiedenen Organen detektiert werden konnte⁶³. Das H19 Gen unterliegt wie das IGF-II einem genomischen Stempel (s. 1.2.2.2). Im Falle des H19 Gens ist das paternale Allel geprägt, nur das maternale Allel wird transkribiert⁶⁴ (Abb. 4).

1.2.3 IGF-II-Protein

Die IGFs sind in vier Domänen gegliedert, die vom N-Terminus ausgehend als B-, C-, A- und D-Domäne bezeichnet werden. Etwa 70 % der Aminosäurereste in der A- und B-Region von IGF-I und IGF-II sind identisch. Zu den entsprechenden Resten der A- und B-Region des Insulins zeigen sie eine 50 % ige Identität. Die C-Domänen der IGFs, die dem C-Peptid des Insulins entsprechen, zeigen keine Sequenzhomologien, weder zueinander noch zum Proinsulin. Die D-Domäne im IGF-II hat kein entsprechendes Gegenstück im Insulin. Beide IGFs entstehen durch proteolytische Spaltung aus einem längeren Vorläuferprotein. Das Präpro-IGF-II besteht aus der Signalsequenz am N-Terminus, die für die Sekretion des IGF-II verantwortlich ist, den Domänen BCAD und dem E-Peptid am C-Terminus. Die Signalsequenz wird nach der Sekretion entfernt, anschließend wird auch die E-Domäne vom Pro-IGF-II abgespalten. Die reifen IGFs werden durch intramolekulare Disulfidbrücken zusammengehalten, wobei eine innerhalb der A-Domäne und zwei zwischen den A- und B-Domänen liegen⁶⁵. Terasawa⁶⁶ hat die dreidimensionale Struktur des IGF-II in wässriger Lösung durch NMR bestimmt (Abb. 5).

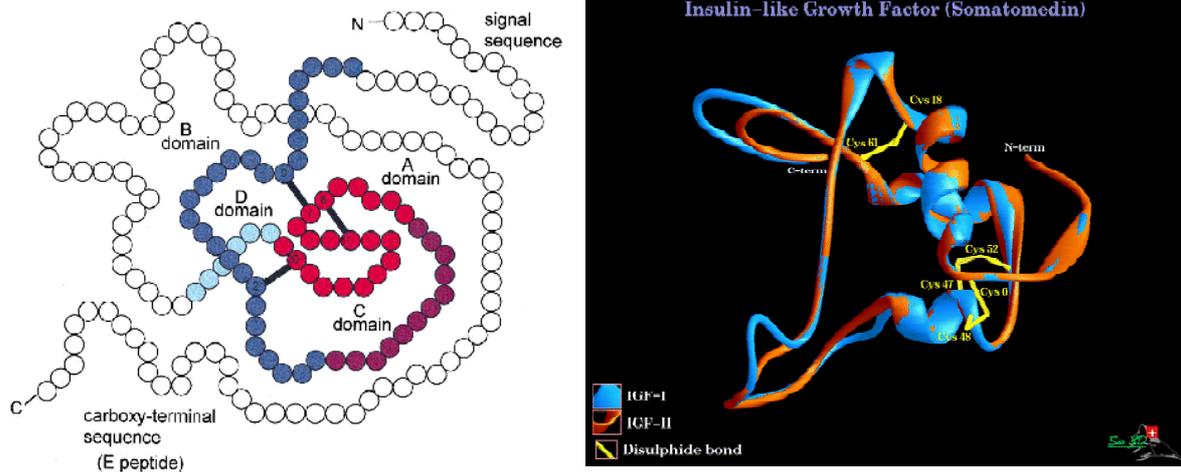


Abb. 5: IGF-II-Präproprotein. Dargestellt sind die Domänen des Präpropeptides und seine Disulfidbrücken ⁶⁵. Die Signalsequenz ist für die Sekretion des Proteins verantwortlich und wird nach der Sekretion entfernt, anschließend wird die E-Domäne vom reifen IGF-II abgespalten. Mit Swissprot3D (<http://www.expasy.ch>) ist die 3-D-Struktur des IGF-II und IGF-I dargestellt.

Die Proteinsequenz des IGF-II ist stark konserviert und zeigt eine Homologie von 91 % (61 von 67 AS) zwischen Mensch und Maus ⁶⁷. Das IGF-II ist ein saures Glykoprotein mit einem Gewicht von 7.5 kD. Es sind allerdings noch andere höhermolekulare Isoformen bekannt, die zwischen 11 und 20 kD liegen und an den löslichen IGF-II-Rezeptor gebunden sein können ³.

1.2.4 Zelluläre Signalwege des IGF-II

1.2.4.1 Rezeptoren des IGF-Systems

Die Wirkung der IGFs auf zellulärer Ebene erfolgt durch Wechselwirkung mit spezifischen Rezeptoren. IGF-I und IGF-II binden an den IGF-I-Rezeptor (Typ I, IGF-I-R), den Mannose-6-Phosphat (M6P)/IGF-II-Rezeptor (Typ II, IGF-II-R) und den Insulin-Rezeptor. Die wachstumsfördernden Wirkungen beider IGFs laufen in erster Linie über den membranständigen IGF-I-Rezeptor und in begrenztem Umfang über den Insulinrezeptor. Der IGF-I-Rezeptor gehört zur Familie der Insulinrezeptoren, zu der neben dem Insulinrezeptor auch der „insulin-receptor-related-receptor“ zuzuordnen ist. Der IGF-I-Rezeptor bindet IGF-II mit einer 3-10-fach und Insulin mit einer ungefähr 500-fach niedrigeren Affinität als IGF-I ⁶⁸. Der Typ-II IGF-Rezeptor besteht aus einer singulären Peptidkette und ist identisch mit dem Kationen-unabhängigen M6P-

Rezeptor. IGF-II bindet zwar mit einer höheren Affinität an den IGF-II-Rezeptor, jedoch ist die Signaltransduktion des IGF-II-Rezeptors noch unklar ⁶⁹.

Die mitogene Wirkung beider IGFs wird hauptsächlich durch ihre Bindung an den IGF-I- und den Insulin-Rezeptor ausgelöst, während der M6P/IGF-II-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Regulation der IGF-II-Konzentration spielt. Die Bindung von IGF-II an den M6P/IGF-II-Rezeptor führt zur Internalisierung in die Zelle, in der IGF-II zu den Lysosomen transportiert und abgebaut wird ⁷⁰⁻⁷² (Abb. 6).

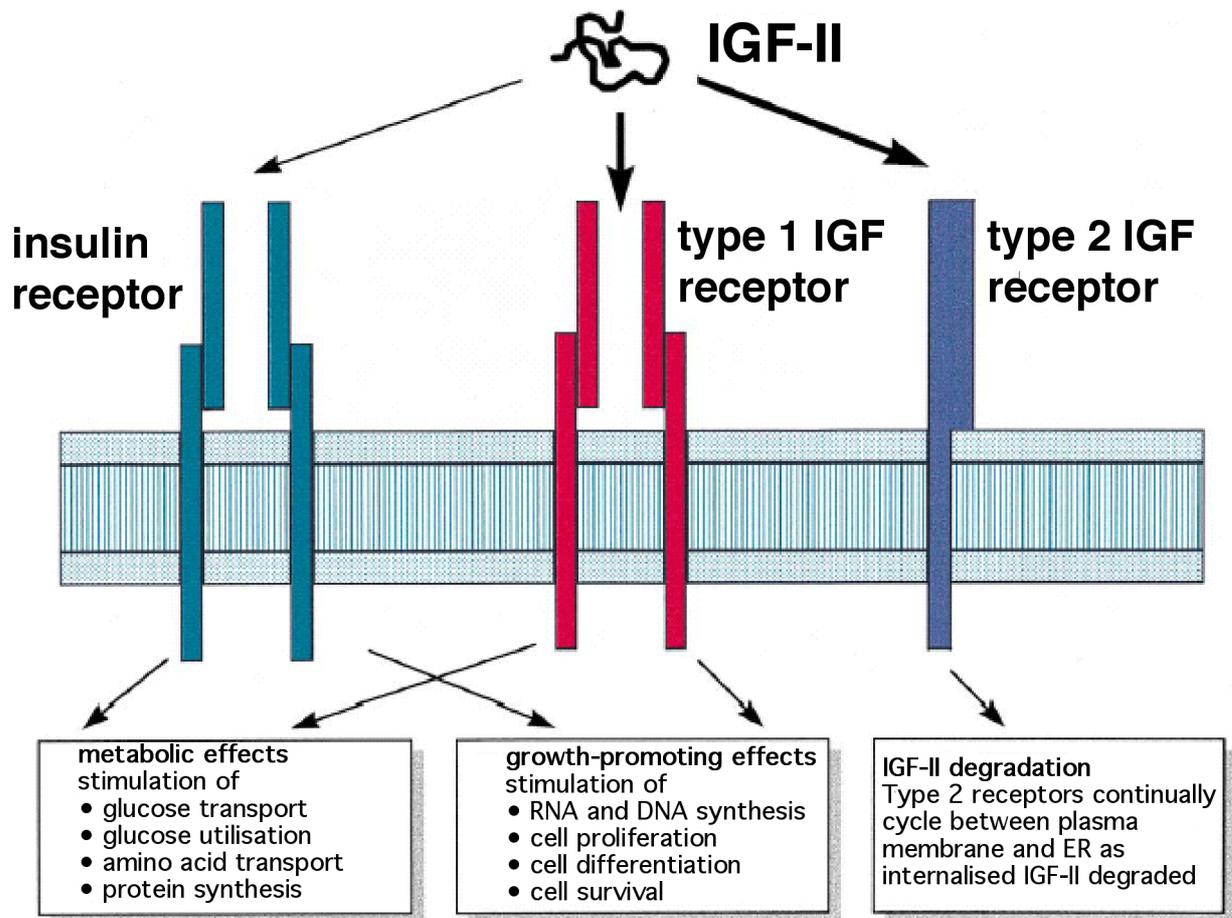


Abb. 6: IGF-Rezeptoren. IGF-I, IGF-II und Insulin binden an den IGF-I-R und den Insulinrezeptor. An den IGF-II-R binden nur IGF-II und IGF-I. Der IGF-I-R vermittelt metabolische und wachstumsfördernde Effekte, wohingegen der IGF-II-R nur für den Abbau des IGF-II verantwortlich ist ⁶⁵.

1.2.4.2 Bindungsproteine

Im Extrazellularraum liegen die IGFs zu ca. 95 % an eine Familie hochaffiner IGF-Bindungsproteine (IGFBP) gebunden vor, die keine Sequenzhomologie zu den IGF-Rezeptoren aufweisen. Es sind sechs verschiedene Bindungsproteine (IGFBP-1 bis -6) beschrieben^{7,18,73-76}. Sie binden IGF-I und IGF-II, aber kein Insulin. Die Bindungsaffinitäten variieren unter den IGFBPs; einige haben eine höhere Affinität für IGF-II als für IGF-I. Durch die Bindung der IGFs an die IGFBPs wird ihre Verfügbarkeit reguliert und die Halbwertszeit der IGFs verlängert. Das IGFBP-3 bindet in Kombination mit einer säurelabilen Untereinheit (acid labile subunit, ALS) den Großteil des zirkulierenden IGFs⁷⁷⁻⁷⁹, wodurch ein Komplex von 150 kD entsteht.

Neben den Bindungsproteinen hoher Affinität gibt es auch BPs mit niedriger Affinität, die unter anderem als IGFBP-rPs bezeichnet werden⁶. Neun solcher IGFBP-rPs sind bisher bekannt. IGFBP-7 und -8 werden z.B. als IGFBP-rP-1 und 2 bezeichnet. Die Bindungsproteine werden andererseits durch spezifische Proteasen (IGFBP-Proteasen) abgebaut. IGF-I und IGF-II aktivieren diese Proteasen^{80,81} (Abb. 1).

1.2.5 Die Rolle des IGF-II bei Erkrankungen

Erhöhte IGF-II-Expression führt zu pränatalen Wachstumsstörungen (Beckwith-Wiedemann-Syndrom) und zur Tumorentwicklung (Wilm's Tumor)⁸²⁻⁸⁴. Kinder, die an dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) leiden, zeigen allgemeines Überwachstum, eine Vergrößerung der Zunge und einseitiges Überwachstum einer Körperhälfte (Hemihypertrophie). Damit geht die Prädisposition zur Entwicklung eines embryonalen Tumors einher. Von Überwachstum betroffene Gewebe zeigen eine Duplikation des paternalen IGF-II Allels⁸⁵ oder ein LOI, so daß beide Allele aktiv sind⁸⁶.

1.3 Herz und Herzmuskelzellen

1.3.1 Myoblasten im Herzen und im Skelettmuskel

Kardiomyozyten sind terminal differenzierte Zellen, die sich nicht mehr teilen können. Sterben Zellen ab, können diese nicht durch neue ersetzt werden, d.h. der Verlust der Zelle ist irreversibel. Dies ist beim Herzinfarkt der Fall. Es erfolgt kurz nach der Geburt keine Zellteilung wie in anderen Geweben (z.B. Leber, Niere oder wie im Skelettmuskel durch Satellitenzellen). Daher kann davon ausgegangen werden, daß Kardiomyozyten einen anderen Weg zur Steigerung ihrer Überlebensfähigkeit haben. So könnten sie u. a., wie auch in den Neuronen, trophische Faktoren besitzen, die für die Erhaltung der Myozyten notwendig sind.

Für IGF-II ist nachgewiesen worden, daß es im Herzen verschiedener Spezies exprimiert wird, wozu neben dem Menschen^{35,87}, Affe⁸⁸, Schwein⁸⁹ und Ratte⁹⁰⁻⁹³ gehören. Speziell in neonatalen Ratten-Myozyten^{23,24}, Endothelzellen^{12,13}, glatten Muskelzellen¹⁶⁻¹⁸ und Fibroblasten¹⁷⁻¹⁹ wird IGF-II transkribiert.

IGF-II hat Einfluß auf die Proliferation fetaler Rattenventrikelmyozyten. Es induziert DNA-Synthese, hat daher Einfluß auf das Wachstum des Ventrikels und induziert Hypertrophie²⁸.

IGF-II wird im Schwein in all diesen Zelltypen exprimiert, kann aber im Herzen keine mitogene Funktion haben, da im adulten Myokard keine Proliferation stattfindet. Es muß also eine andere Aufgabe haben.

1.3.2 IGF-II und Ischämie

Unter Ischämie versteht man die Verminderung der Perfusion eines Gewebes und den damit einhergehenden Sauerstoffmangel, die Unterversorgung mit metabolischen Substraten sowie die Ansammlung von Stoffwechselprodukten⁹⁴. Das Myokard reagiert darauf mit einer Reihe adaptiver Prozesse. Wiederholte kurze koronare Okklusionen (Gefäßverschlüsse) führen zu länger anhaltenden kontraktilen Dysfunktionen⁹⁵ und einer erhöhten ischämischen Toleranz bezüglich nachfolgender Okklusionen längerer Dauer⁹⁶.

Als experimentelles Modell für das menschliche Herz eignet sich besonders wegen seiner Größe und der Vergleichbarkeit der koronaren Anatomie das Herz des Schweins⁹⁷. Zudem besitzt es keine nativen Kollateralen und bildet - wie im Menschen ebenfalls beschrieben - nach myokardialer Ischämie viele mikrovaskuläre Gefäße aus. Es konnte von Kluge und Vogt^{26,27} gezeigt werden, daß IGF-II im Schweineherzen nach Okklusion/Reperfusion induziert, d.h. die 6.0 kb mRNA unter Stress und Ischämie hochreguliert ist. Außerdem wirkt IGF-II kardioprotektiv, da es die Größe des infarzierten Gebietes in dem eben beschriebenen Modell der Okklusion/Reperfusion verringert. Allerdings liegen bisher keine Kenntnisse über die Regulation des IGF-II unter solchen Bedingungen vor.

1.4 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, Aufschluß über die Regulation des IGF-II nach Ischämie/Reperfusion zu bekommen. Es sollte untersucht werden, welche mRNAs des IGF-II beim Schwein durch den jeweils entsprechenden Promotor generiert werden und im Speziellen, welcher Promotor des IGF-II-Gens für die durch Ischämie und Stress-induzierte 6.0 kb mRNA verantwortlich ist. Eine genomische Karte des IGF-II-Gens des Schweines galt es zu erstellen.

Weiterhin stellte sich die Frage nach der Funktion des IGF-II in Myoblasten. Mittels unterschiedlicher Modelle war die Wirkung des IGF-II in den Myoblasten zu analysieren. Neben den Untersuchungen am Modell der Ischämie/Reperfusion des Schweineherzens sollte eine transgene Mauslinie mit herzspezifischer Überexpression des IGF-II etabliert werden. Parallel dazu waren Zellkulturstudien von Interesse, um den Einfluß der Überexpression des IGF-II-Gens auf Myoblasten anhand von Transfektionsstudien zu analysieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und sonstige Bedarfsgegenstände

Standardgerätschaften werden nicht gesondert aufgeführt.

A.L.F. DNA Sequencer	<i>Pharmacia LKB, Freiburg</i>
Autoklav, Varioklav, Typ 500	<i>H-P Labortechnik, München</i>
Bakterienschüttler Certomat HK	<i>B. Braun Biotech</i>
Betastrahlzähler (β -Counter)	<i>Berthold, Bad Wildbad</i>
Brutschrank Cytoperm	<i>Heraeus, Hanau</i>
Corex-Röhrchen	<i>Heraeus, Hanau</i>
Filmentwicklungsmaschine Optimax	<i>Beetz, Langen</i>
Fluoreszenzmikroskop	<i>Leica, Wetzlar</i>
Hybridisierungsöfen	<i>Biometra, Göttingen</i>
Hybridisierungsröhren	<i>Biometra, Göttingen</i>
Kamera	<i>Polaroid, UK</i>
Kühlzentrifuge	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Laminar Flow	<i>Ceag Schirp, Selm-Bork</i>
Neubauer-Zählkammer	<i>Superior, Lauda-Königshofen</i>
<u>PCR-Geräte:</u>	
- Thermocycler Gene Amp PCR 9600	<i>Perkin-Elmer, Weiterstadt</i>
- PTC-200	<i>Biozym, Hess. Oldendorf</i>
pH-Meter	<i>Schott, Mainz</i>
PhosphorImager Storm 860, zugehörige Kassetten	<i>Molecular Dynamics, Freiburg</i>
Präzisions-Küvetten aus Quarzglas	<i>Hellma, Nürnberg</i>
Spektrophotometer 4054, UV/visible	<i>Pharmacia Biosystems, Freiburg</i>
Ultra Turrax	<i>IKA-Labortechnik, Staufen</i>
Ultraschall-Sonifizierer	<i>Branson, Dietzenbach</i>
UV-Stratalinker 1800	<i>Stratagene, Heidelberg</i>
UV-Transilluminator (302 nm, mittelwellig)	<i>Herolab, Wiesloch</i>
Vakuum Konzentrat Speed Vac	<i>GMI, Clearwater, USA</i>
Vertikale Elektrophorese/Naßblotkammer	<i>Invitrogen, Groningen, Niederlande</i>
<u>Zentrifugen und Rotoren:</u>	
- RC-5B mit SS-34 und GS-3	<i>Sorvall, Hanau</i>
- J2-21 mit JA-21 und JA-10	<i>Beckmann, München</i>

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Übliche Verbrauchsmaterialien werden nicht extra genannt.

3MM-Papier	<i>Whatman, Kent, UK</i>
Chroma Spin™ Columns	<i>Clontech, Heidelberg</i>
Chromatographiepapier DE 81	<i>Whatman, Kent, UK</i>
DE81-Papier	<i>Whatman, Kent, UK</i>
Dialyseschlauch	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
ExpressHyb Hybridization Solution	<i>Clontech, Heidelberg</i>
<u>Filter:</u>	
- Protran BA 85 (82 mm)	<i>Schleicher&Schuell, Dassel</i>
- Protran BA 85 (132 mm)	<i>Schleicher&Schuell, Dassel</i>
- Duralon UV™	<i>Stratagene, Heidelberg</i>
- Nitrozellulose	<i>Invitrogen, Groningen, Niederlande</i>
Gewebekulturflaschen 75 cm ²	<i>Greiner, Frickenhausen</i>
Hyperfilm ECL	<i>Amersham, Freiburg</i>
Kryo-Röhrchen	<i>Nunc, Wiesbaden</i>
Plastikküvetten	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen	<i>Falcon, Le Pont de Claix, FR</i>
Reaktionsgefäße: 1.5 und 2.0 ml (Eppendorftube)	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Röntgenfilme X-Omat AR	<i>Kodak, Stuttgart</i>
Sterilfilter	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Zellschaber	<i>Greiner, Frickenhausen</i>
Ultrafree-4 Units	<i>Millipore, Eschborn</i>

2.1.3 Chemikalien

Die üblichen Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Karlsruhe; Merck, Frankfurt a. M.; Sigma, Deisenhofen und Serva, Heidelberg bezogen und werden bei den Lösungen und Medien aufgeführt. Zusätzliche Chemikalien sind gesondert genannt. Wenn nicht anders vermerkt, wurde Wasser als Lösungsmittel verwendet.

2.1.3.1 Chemikalien, Lösungen und Nährmedien für molekularbiologische Techniken

Chemikalien:

4'6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), 1µg/ml	<i>Mo Bi Tec, Göttingen</i>
<u>Agarose:</u>	
- SeaKEM GTG	<i>Biozym, Hess. Oldendorf</i>
- LE-Agarose	<i>Biozym, Hess. Oldendorf</i>
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	<i>Merck, Frankfurt a. M.</i>

Calciumchlorid (CaCl ₂)	<i>Merck, Frankfurt a. M.</i>
Dextransulfat	<i>Roth, Karlsruhe</i>
dNTPs	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Harnstoff, ultrarein	<i>Amersham, Freiburg</i>
Propidiumjodid, 1µg/ml	<i>Mo Bi Tec, Göttingen</i>
Salmonsperma DNA (ssDNA)	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
TEMED (N'N'N'N'Tetramethylethylendiamin)	<i>Pharmacia, Freiburg</i>

Lösungen:

1 x Lambda-Verdünnungspuffer

- 100 ml 10 x Lambda-Verdünnungspuffer
- 0.1 % Gelatine *Sigma, Deisenhofen*
- in H₂O, autoklavieren und bei 4°C lagern

10x TE Puffer

- 100 mM Tris/HCl *Roth, Karlsruhe*
- 10 mM EDTA *Roth, Karlsruhe*

50 x Denhardt's

- 1 % Ficoll 400 *Sigma, Deisenhofen*
 - 1 % Polyvinylpyrrolidon *Sigma, Deisenhofen*
 - 1 % Bovine serum albumin (BSA) *Sigma, Deisenhofen*
- Ampicillin *Roth, Karlsruhe*

- Stammlösung von 60 mg/ml H₂O (Lagerung bei -20°C)
- wurde im LB-Medium auf 60 µg/ml verdünnt

Ethidiumbromid

- 10 mg/ml in H₂O und 1 mg/ml *Roth, Karlsruhe*

Guanidiniumpuffer

- 4 M Guanidiniumthiocyanat *Roth, Karlsruhe*
- 25 mM Na-citrat, pH 7 *Roth, Karlsruhe*
- 0.5 % N-Lauryl-Sarcosylsarcosin *Sigma, Deisenhofen*
- 0.1 M β-Mercaptoethanol in DEPC-H₂O *Roth, Karlsruhe*

Hybridisierungspuffer für Northern Blot

- 50 % deionisiertes Formamid *Gibco, Karlsruhe*
- 10 % Dextransulfat *Roth, Karlsruhe*
- 1 % (w/v) SDS *Roth, Karlsruhe*
- 1 M NaCl *Roth, Karlsruhe*
- 100 µg/ml ssDNA *Sigma, Deisenhofen*

Hybridisierungspuffer für Southern Blot

- 6 x SSC *Gibco, Karlsruhe*
- 5 x Denhardt's Reagenz
- 0.5 % (w/v) SDS *Roth, Karlsruhe*
- 100 µg/ml ssDNA *Sigma, Deisenhofen*
- 50 % deionisiertes Formamid *Gibco, Karlsruhe*

Material und Methoden

Hybridisierungspuffer für Phagenscreening

- 5 x SSC *Gibco, Karlsruhe*
- 5 x Denhardt's Reagenz
- 0.1 % SDS *Roth, Karlsruhe*
- 50 % deionisiertes Formamid *Gibco, Karlsruhe*
- 100 µg/ml ssDNA *Sigma, Deisenhofen*

Isopropyl-β-D-Thio-Galactopyranosid (IPTG)

- 200mg/ml-Stammlösung in H₂O dest. *Sigma, Deisenhofen*
- Lagerung bei -20°C

Kanamycin

- 50 mg/ml H₂O (Lagerung bei -20°C) *Sigma, Deisenhofen*
- wurde im LB-Medium auf 50 µg/ml verdünnt

RNA-Proben- Puffer

- 750 µl deionisiertes Formamid (bei -20°C lagern) *Gibco, Karlsruhe*
- 150 µl 10 x MOPS *Roth, Karlsruhe*
- 240 µl Formaldehyd *Merck, Frankfurt a. M.*
- 100 µl Glycerin *Roth, Karlsruhe*
- Bromphenolblau *Roth, Karlsruhe*
- Xylencyanol *Sigma, Deisenhofen*
- ad 1.5 ml mit H₂O
- Lagerung bei -20°C

TBE

- 100 mM Tris *Roth, Karlsruhe*
- 100 mM Borsäure *Roth, Karlsruhe*
- 2 mM EDTA *Roth, Karlsruhe*
- pH 8.0

TE

- 10 mM Tris *Roth, Karlsruhe*
- 1 mM EDTA *Roth, Karlsruhe*
- pH 8.0

Verdaupuffer für genomische DNA aus Gewebe

- 100 mM NaCl *Roth, Karlsruhe*
- 10 mM Tris / HCl pH 8.0 *Roth, Karlsruhe*
- 25 mM EDTA pH 8.0 *Roth, Karlsruhe*
- 0.5 % SDS *Roth, Karlsruhe*
- 0.1 mg / ml Proteinase K *Promega, Mannheim*

Verdaupuffer für genomische DNA aus Mäuseschwänzen

- 50 mM Tris/HCl pH 8.0 *Roth, Karlsruhe*
- 100 mM EDTA *Roth, Karlsruhe*
- 0.5 % SDS *Roth, Karlsruhe*
- 500 µg Proteinase K *Promega, Mannheim*

X-Gal

- 20 mg/ml-Stammlösung in Dimethylformamid *AppliChem, Darmstadt*
- Lagerung bei -20°C *Roth, Karlsruhe*

10 x MOPS-Puffer

- 41.8 g MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure) *Roth, Karlsruhe*
- 4.1 g NaAcetat *Roth, Karlsruhe*
- 3.72 g EDTA (Ethylendiamintetraacetat) *Roth, Karlsruhe*
- in 1l DEPC-H₂O auf pH 7.0 mit NaOH einstellen
- autoklavieren ist nicht notwendig, da alle Substanzen in DEPC-H₂O gelöst werden

DEPC-H₂O

- 0.1 % DEPC in H₂O *Roth, Karlsruhe*
- üN bei 37°C und autoklavieren

10 x DNA Proben-Puffer

- 1ml 0.5 M EDTA *Roth, Karlsruhe*
- 0.1 ml 10 % SDS *Roth, Karlsruhe*
- 2.7 ml Glycerin *Roth, Karlsruhe*
- 0,01 % (w/v) Bromphenolblau *Sigma, Deisenhofen*
- 0,01 % (w/v) Xylencyanol *Sigma, Deisenhofen*
- 0.9 ml H₂O

Denaturierungslösung für Southern Blot

- 1.5 M NaCl *Roth, Karlsruhe*
- 0.5 M NaOH *Roth, Karlsruhe*

Neutralisierungslösung für Southern Blot

- 1.5 M NaCl *Roth, Karlsruhe*
- 0.5 M Tris/HCl pH 8.0 *Roth, Karlsruhe*

10 x Lambda-Verdünnungspuffer

- 0.35 M Tris/HCl pH 7.5 *Roth, Karlsruhe*
- 0.1 M MgSO₄ • 7H₂O *Roth, Karlsruhe*
- in H₂O, autoklavieren und bei 4°C lagern

PBS

- 137 mM NaCl *Roth, Karlsruhe*
- 2,7 mM KCl *Roth, Karlsruhe*
- 7,4 mM Na₂HPO₄ *Roth, Karlsruhe*
- 1,5 mM KH₂PO₄ *Roth, Karlsruhe*
- pH 7.4

20 x SSC

- 3 M NaCl *Roth, Karlsruhe*
- 0.3 M Natriumcitrat pH 7.0 *Roth, Karlsruhe*

10 x TBE

- 1 M Tris/HCl pH 8,0 *Roth, Karlsruhe*
- 1 M Borsäure *Roth, Karlsruhe*
- 25 mM EDTA *Roth, Karlsruhe*

Medien:

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

- 10 g/l Pepton aus Casein tryptisch verdaut *Roth, Karlsruhe*
- 5 g/l Hefeextrakt *Roth, Karlsruhe*
- 5 g/l NaCl *Roth, Karlsruhe*
- pH 7.0
- Sterilisieren (Autoklavieren)

NZYM-Platten

- NZYM *Sigma, Deisenhofen*
- 1.5 % Agar *Roth, Karlsruhe*

SOC-Medium:

zu SOB-Medium geben

- 1 M MgCl₂ (sterilfiltriert) *Merck, Darmstadt*
- 1 M MgSO₄ (sterilfiltriert) *Roth, Karlsruhe*
- 2M Glucose *Roth, Karlsruhe*

Top Agarose

- 7 g Agarose/ 100 ml NZYM-Medium

Lambda-Medium

- LB-Medium
- 10 mM MgSO₄ *Roth, Karlsruhe*
- 0.2 % Maltose *Roth, Karlsruhe*

LB/ MgSO₄-Platten

- LB-Medium
- 10 mM MgSO₄ • 7 H₂O *Roth, Karlsruhe*

LB-Platten

- LB-Medium
- 1.5 % Agar *Roth, Karlsruhe*

SOB-Medium

- 10 g Trypton *Roth, Karlsruhe*
- 2.5 g Hefeextrakt *Roth, Karlsruhe*
- 0.25g NaCl *Roth, Karlsruhe*
- auf 500 ml mit H₂O dest. auffüllen
- autoklavieren

2.1.3.2 Chemikalien, Proteine und Antikörper für die Proteinchemie

Chemikalien und Puffer:

- 0.5 % Ponceau S-Lösung in 40 % MetOH, 15 % Eisessig *Merck, Darmstadt/Roth, Karlsruhe*
- 4-12 % Bis/Tris-Gele *Invitrogen, Groningen, Niederlande*
- BSA, fettsäurefrei *Sigma, Deisenhofen*
- Dithiothreitol, ultrarein (DTT) *Serva, Heidelberg*

Hepes-Puffer:

- 20 mM Hepes pH 7.9 *Roth, Karlsruhe*
- 20 % Glycerin *Roth, Karlsruhe*
- 0.4 M KCl *Roth, Karlsruhe*
- 1.5 mM MgCl₂ *Roth, Karlsruhe*
- 0.1 mM EDTA *Roth, Karlsruhe*
- 5.7 mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl-Fluorid) *Roth, Karlsruhe*

Laemmli-Puffer (5 x) pH 6.8:

- 0.0625 M Tris/HCl *Roth, Karlsruhe*
- 2.3 % SDS *Roth, Karlsruhe*
- 10 % Glycerin *Roth, Karlsruhe*

MES-SDS-Laufpuffer (20 x):

- 1 M MES *Invitrogen, Groningen, Niederlande*
- 1 M Tris/HCl
- 69.3 mM SDS
- 20.5 mM EDTA
- pH 7.3

Stripping-Puffer:

- 100 mM 2-Mercaptoethanol *Roth, Karlsruhe*
- 2 % SDS *Roth, Karlsruhe*
- 62, 5 mM Tris/HCl pH 6.7 *Roth, Karlsruhe*

TBS:

- 20 mM Tris/HCl *Roth, Karlsruhe*
- 137 mM NaCl *Roth, Karlsruhe*
- pH 7.6

TBS-T-Puffer:

- TBS
- 0.1% Tween-20 *Roth, Karlsruhe*

NuPage-Transferpuffer (20 x):

- 0.5 M Bicine *Invitrogen, Groningen, Niederlande*
- 0.5 M Bis/Tris
- 20.5 mM EDTA
- 1 M Chlorobutanol
- pH 7.2

Rekombinante Proteine:

- rekombinantes humanes IGF-II-Protein *BioTrend, Köln*
- rekombinantes GFP Protein *Clontech, Heidelberg*

Antikörper:

- Anti-alpha/gamma Muskel-Aktin, monoklonal (HHF35) *Dako, Glostrup, Dänemark*
- Anti-GAPDH, monoklonal *BioTrend, Köln*
- Anti-GFP, monoklonal *Clontech, Heidelberg*

Anti-IGF-II, monoklonal (S1F2) *Upstate, Biozol, Eching*
Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP *Dako, Glostrup, Dänemark*

2.1.3.3 Chemikalien für die Zellkultur

Dimethylsulfoxid (DMSO) *Sigma, Deisenhofen*
DMEM *Gibco, Karlsruhe*
Fetal Bovine Serum (FBS) *Sigma, Deisenhofen*
FugeneTM6 *Roche, Mannheim*
Geneticin (G418) *Amersham, Freiburg*
Natriumpyruvat *Gibco, Karlsruhe*
Non-Essential Amino Acids *Gibco, Karlsruhe*
Penicillin-Streptomycin für Zellkultur (Pen/Strep) *Gibco, Karlsruhe*
Trizol *Gibco, Karlsruhe*
Trypsin/EDTA *Gibco, Karlsruhe*

2.1.4 Enzyme und Kits

Enzyme:

Alkalische Phosphatase *Boehringer, Mannheim*
AutoReadTM Sequencing Kit *Pharmacia LKB, Freiburg*
DNase I *Gibco, Karlsruhe*
GeneAmp *Perkin Elmer, Weiterstadt*
Klenow Polymerase *Promega, Mannheim*
Proteinase K *Promega, Mannheim*
RNase-It Cocktail *Stratagene, Heidelberg*
RNase *Sigma, Deisenhofen*
T4 Polynukleotidkinase *Promega, Mannheim*

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Promega, Mannheim; Stratagene, Heidelberg; Amersham, Freiburg und Gibco, Karlsruhe bezogen.

Kits:

ECL-Kit *Amersham, Freiburg*
DC Protein Assay *Biorad, München*
Geneclean III Kit *Dianova, Hamburg*
MegaPrime Labeling Kit *Amersham, Freiburg*
PCR-ScriptTM Amp Cloning-Kit *Stratagene, Heidelberg*
pGEM-T-Easy Vector System *Promega, Mannheim*
Qiaquick PCR Purification Kit *Qiagen, Hilden*
ready to go-T4-Ligase *Amersham, Freiburg*
rediprime IITM, RandomPrime Labeling Kit *Amersham, Freiburg*

Taq-Master-Mix	<i>Qiagen, Hilden</i>
Wizard Plus DNA Mini/Midiprep Purification System	<i>Promega, Mannheim</i>

Größenmarker:

Lambda DNA / <i>Eco</i> R I + <i>Hind</i> III-Fragmente	<i>Promega, Mannheim</i>
Lambda DNA / <i>Hind</i> III-Fragmente	<i>Promega, Mannheim</i>
phi X 174 RF DNA / <i>Hae</i> III-Fragmente	<i>Promega, Mannheim</i>
RNA-Größen-Marker G319	<i>Promega, Mannheim</i>
Supercoiled DNA-Leiter	<i>Gibco, Karlsruhe</i>
Multi-Mark	<i>Invitrogen, Groningen, Niederlande</i>

Radioaktive Nukleotide:

α ^{32}P -dCTP	<i>Amersham, Freiburg</i>
γ ^{32}P -ATP	<i>Amersham, Freiburg</i>

2.1.5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide außer uni, rev, die im AutoRead Sequencing Kit (Amersham) enthalten sind und zur Sequenzierung verwendet wurden, wurden von der Firma MWG, Ebersberg synthetisiert. Oligonukleotide, die zur Hybridisierung verwendet wurden, sind auch in Abb. 10 eingezeichnet.

- uni: 5' - CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3', 5'-Fluorescein-markierung, (universal)
- rev: 5' - CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3', 5'-Fluorescein-markierung, (reverse)
- T3: 5' - TCA CTA AAG GGA ACA AAA - 3', 5'-Fluorescein-markierung
- T7: 5' - GCG TAA TAC GAC TCA CTA - 3', 5'-Fluorescein-markierung
- #92: 5' - CTT CCC CAT GAC CAC ATC AGC - 3', (humanes IGF-II Exon 1, sense) Homologie zu Acc. Nr. L15440 (Nukleotide 6964-6987)
- #93: 5' - GGG TTT GTG GTT TGG ATG - 3', (porcine IGF-II mRNA, antisense) Homologie zu Acc. Nr. X56094 (Nukleotide 1125-1108)
- #104: 5' - CCT GCT GGA GAC CTA CTG - 3', (porcine IGF-II mRNA, sense) Homologie zu Acc. Nr. X56094 (Nukleotide 604-621)
- #119: 5' - CTT CCG GGT CCA GTG TCC GG - 3', (porcine IGF-II mRNA, antisense) Homologie zu Acc. Nr. X56094 (Nukleotide 36-17)
- #148: 5' - CGT GGC ATC GTT GAG GAG TG - 3', 5'-Fluorescein-markierung, (humanes IGF-II Exon 8, sense) Homologie zu Acc. Nr. X03562 (Nukleotide 7537-7556)
- #149: 5' - AAC AGC ACT CCT CAA CGA TG - 3', 5'-Fluorescein-markierung, (humanes IGF-II Exon 8, antisense) Homologie zu Acc. Nr. X03562 (Nukleotide 7561-7542)
- #155: 5' - CTG TCC ACG TCC TGA GGG CGC G - 3', (humanes IGF-II Exon 4, antisense) Homologie zu Acc. Nr. X03562 (Nukleotide 142-121)
- #156: 5' - GGA GTC AGC AGC GAG GCA GCG GG - 3', (humanes IGF-II Exon 5, antisense) Homologie zu Acc. Nr. X03562 (Nukleotide 1982-1960)
- #157: 5' - CAC AGC CCT GGT TAC CTA CAG CTC AG - 3', (humanes IGF-II Exon 6,

- antisense) Homologie zu Acc. Nr. X03562 (Nukleotide 3998-3973)
- #158: 5' - GCC AGG GCT GCC CGA GAC CCC AG – 3', (porcine IGF-II mRNA, sense) Homologie zu Acc. Nr. X56094 (Nukleotide 257-279)
- #159: 5'- GCAGGGGCGGCCAGCAGGCTC - 3', (MLc2v-Promotor der Ratte, sense, Promotorspezifischer Primer, PP) Homologie zu Acc. Nr. U26708 (Nukleotide 1951-1972)
- #163: 5' - TGG GGA CCG CGG CTT CTA CTT C – 3', 5'-Fluorescein-markierung, (humanes IGF-II Exon 7, sense) Homologie zu Acc. Nr. X03562 (Nukleotide 5781-5802)
- #164: 5' - TGC TTA CCG CCC CAG TGA GAC – 3', 5'-Fluorescein-markierung, (humanes IGF-II Exon 7, sense) Homologie zu Acc. Nr. X03562 (Nukleotide 5718-5738)
- #186: 5' - CGGAACTACGACGGTATC - 3', (18S antisense) Homologie zu Acc. Nr. X01117 (Nukleotide 1080-1061)
- #285: 5' - CAG GAC GTG GAC AGG GAG GGC -3' (humanes IGF-II Exon 7, sense) Homologie zu Acc. Nr. X03562 (Nukleotide 5781-5802)
- #286: 5' - CTG CCT CGC TGC TGA CTC CCG - 3', (humanes IGF-II Exon 4, sense) Homologie zu Acc. Nr. X03562 (Nukleotide 129-149)
- #287: 5' - CTC CTC CTG CCC CAG CGA GCC -3', (humanes IGF-II Exon 6, sense) Homologie zu Acc. Nr. X03562 (Nukleotide 3947-3967)
- #335: 5' - GAT GCT GCT GTG CTT CCT CAG CC – 3' (humanes IGF-II, Exon 9, antisense, Genspezifischer Primer, GP1) Homologie zu Acc. Nr. X03562 (Nukleotide 8388-8366)
- #337: 5' - GCA GTT TTG CTC ACT TCC GAT TG – 3' (humanes IGF-II, Exon 9, antisense, Genspezifischer Primer, GP2) Homologie zu Acc. Nr. X03562 (Nukleotide 8193-8171)
- #351: 5' - TGA GCT AGG GCT GGA AAG AA - 3', (humanes H19, sense) Homologie zu Acc. Nr. AF087017 (Nukleotide 8596-8615)
- #352: 5' - CGA TCC CCT AAA CCT CCT TC - 3', (humanes H19, antisense) Homologie zu Acc. Nr. AF087017 (Nukleotide 8836-8817)

2.1.6 Plasmide und verwendete Klone

Bluescript KS+	<i>Stratagene, Heidelberg</i>
Bluescript SK+	<i>Stratagene, Heidelberg</i>
PCR-Script	<i>Stratagene, Heidelberg</i>
pEGFP-C1	<i>Clontech, Heidelberg</i>
pGEM T	<i>Promega, Heidelberg</i>
pGEM T-Easy	<i>Promega, Heidelberg</i>

Name	Vektor / Selektion	kloniert in	Insert	Spezies	Herkunft
IGF-II /8-1	pUC12 /Amp	<i>Eco</i> R I	~1.2 kb	human	ATCC Nr. 57482, Genbank Acc. Nr. M13970
IGF-II 0.46 ES	pBS SK+ / Amp	<i>Eco</i> R I / <i>Sal</i> I	0.46 kb	human	IGF-II/8-1 subkloniert
Mlc2v/IGF-II	pBluescript / Amp	<i>Eco</i> R I	~1.2 kb	human	IGF-II/8-1 subkloniert
pEGFP-C1	pEGFP / Kan, G418				Clontech, Heidelberg
pEGFP-C1/IGF-II	pEGF-C1 / Kan, G418	<i>Eco</i> R I	~1.2 kb	human	Stefanie Böhm
IGF-II / P1	pBS II KS+/Amp	<i>Bam</i> H I / <i>Hind</i> III	0.59 kb	human	E. Holthuizen
IGF-II / P2	pEMBL/Amp	<i>Bam</i> H I	0.98 kb	human	E. Holthuizen
IGF-II / P3	pUC/Amp	<i>Eco</i> R I / <i>Sal</i> I	0.85 kb	human	E. Holthuizen
IGF-II / P4	pBS II KS+/Amp	<i>Bam</i> H I / <i>Hind</i> III	0.114 kb	human	E. Holthuizen
IGF-II 5' Region	PCR-Script/Amp	<i>Srf</i> I	~1 kb	Schwein	Stefanie Böhm
IGF-I	pKT218 / Tet	<i>Pst</i> I	0.66 kb	human	ATCC Nr. 59944
Insulin Rezeptor	pUC12 / Amp	<i>Eco</i> R I	4.1 kb	human	ATCC Nr. 57492
IGF-I Rezeptor	pUC13 / Amp	<i>Eco</i> R I	0.7 kb	human	ATCC Nr. 59294
IGF-II Rezeptor	pBS SK- / Amp	<i>Eco</i> R I	1.9 kb	human	ATCC Nr. 78211, Genbank Acc. Nr. 78019
IGFBP-5	pBlue SK+ / Amp	<i>Eco</i> R I	1.64 kb	human	M.Kiefer
IGFBP-6	pBlue SK- / Amp	<i>Eco</i> R I	0.98 kb	human	M. Kiefer
18S rRNA	pUC830 / Amp	<i>Eco</i> R I / <i>Bam</i> H I	0.77 kb	Maus	I.Oberbäumer

2.1.7 Bibliotheken

Cosmid-Bibliothek

Lambda EMBL3/SP6

Porcine Genomic Library in Lambda FIX II Vector

Clontech, Heidelberg

Clontech, Heidelberg

Stratagene, Heidelberg

2.1.8 Bakterienstämme

E. coli JM 109

E. coli K802

E. coli XL1-blue MRA

E. coli XL1-blue MRA (P2)

E. coli XL1-blue

Promega, Heidelberg

Clontech, Heidelberg

Stratagene, Heidelberg

Stratagene, Heidelberg

Stratagene, Heidelberg

2.2 Methoden

2.2.1 Kompetente Bakterien (CaCl₂-Methode)

Bakterien, die transformiert werden sollen, müssen kompetent sein, d.h. Fremd-DNA aufnehmen können. Dazu wurde der entsprechende Stamm (Xl 1-blue oder JM109) auf einer LB-Platte ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert. Eine Kolonie wurde in LB-Medium transferiert und üN bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur 1:50 in LB-Medium verdünnt und bis zu einer Dichte von $OD_{550} = 0.4 - 0.5$, d.h. bis zur logarithmischen Wachstumsphase wachsen gelassen. In einem Eiswasserbad wurde die Kultur für 10 min unter leichtem Schütteln abgekühlt und bei 4°C und 2500 x g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 250 ml eiskalter 0.1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation. In 20 ml eiskalter 0.1 M CaCl₂-Lösung wurde das Pellet gelöst und unter Zugabe von Glycerin (in einer Endkonzentration von 15 %) aufgenommen. Zur Steigerung der Kompetenz inkubierte man sie üN bei 4°C. Zur endgültigen Lagerung wurden Aliquots zu je 1ml in Eppendorftubes gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden dann bei -80°C gelagert.

2.2.2 Transformation von Bakterien

Kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. 10 – 100 ng der Plasmid-DNA wurden zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte bei 42°C ein Hitzeschock für 45-60 sec. 1 ml LB-Medium wurde zu den Bakterien gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert, in dieser Zeit können die Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, die Antibiotikaresistenz aufbauen. Die Bakterien wurden anschließend pelletiert, in 100 µl LB- Medium resuspendiert und auf der entsprechenden Platte (LB mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.3 Blau-Weiß-Differenzierung

Im Falle einer Blau-Weiß-Differenzierung, d.h. bei Verwendung eines Plasmides, welches das lacZ'Gen trägt und eines Bakterienstammes (JM109, XL-1blue), der für den C-Terminus der β -Galactosidase kodiert, wurden auf den LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum mit Hilfe eines Drygalskispatels 40 μ l X-Gal (20 mg/ml) und 4 μ l IPTG (200 mg/ml) gleichmäßig verteilt und bei 37°C mindestens 1h vor dem Ausplattieren des Transformationsansatzes inkubiert. Nach der Inkubation üN bei 37°C können weiße von blauen Kolonien unterschieden werden. Zellen, die ein Plasmid mit einem intakten lacZ'Gen tragen, sind in der Lage das künstliche Substrat X-Gal zu spalten und bilden daher blaue Kolonien. Durch Klonierung eines Fragmentes in die multiple Klonierungssequenz (multiple cloning site, MCS) ist das lac Z'Gen inaktiviert und die Bakterien, die es enthalten, sind daher weiß.

2.2.4 Plasmidpräparation

Zum Ansetzen der üN-Minikulturen wurden Kolonien von einer Platte gepickt und in 3 ml Medium gegeben. Bei der Midikultur wurden 10 μ l der Minikultur zu 50 - 100 ml Medium gegeben und über Nacht bei 37°C und 250 rpm geschüttelt.

2.2.4.1 Quick-Check (nach Rinji Akada 98)

Nach der Herstellung von Plasmidkonstrukten (s. 2.2.9) wurde der Quick-Check verwendet, um zu überprüfen, ob der Vektor ein Insert trägt. Zu 100 μ l der üN-Kulturen wurden 50 μ l Phenol/Chloroform und 10 μ l DNA-Proben-Puffer gegeben und für 10 sec gemischt. Die obere wäßrige Phase, welche die Nukleinsäuren enthält, wurde durch Zentrifugation (5 min, 15000 x g) von der unteren organischen Phase getrennt. 40 μ l der wäßrigen Phase wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Dadurch können Plasmide, welche einen Größenunterschied von mehr als 200 bp haben, unterschieden werden. Weiterhin werden bakterielle genomische DNA und RNA aufgetrennt.

2.2.4.2 Plasmidpräparation

Die Präparation der DNA erfolgte nach der Anleitung des Wizard[®] Plus Mini/Midiprep Purification System (Promega, Mannheim); die Maxipräparation wurde nach dem Protokoll von Wang⁹⁹ durchgeführt.

2.2.4.3 Anlegen von Glyzerinstocks der Bakterienklone

850 µl einer üN-Kultur wurden mit 150 µl Glycerin (86 %) gemischt und bei -80°C gelagert. Um aufbewahrte Kulturen zu amplifizieren, wurden die Bakterienklone mit einer Impföse ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert und damit vereinzelt. Anschließend konnte mit der beschriebenen Plasmidpräparation (s. 2.2.4.2) fortgefahren werden.

2.2.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäuren kann photometrisch bestimmt werden. Hierbei entspricht die $OD_{260} = 1$ bei DNA einer Konzentration von 50 ng/µl und 40 ng/µl bei RNA. Die Reinheit der Nukleinsäuren läßt sich durch den Quotienten aus OD_{260}/OD_{280} ermitteln, welcher zwischen 1.5 und 2.0 liegen sollte. Die OD_{280} ermöglicht eine Aussage über die Verunreinigung durch Proteine und Phenolreste aus der Präparation.

Bei der Insert-Herstellung (s. 2.2.13.3) wurde die Konzentration mit den einzelnen Banden des Größenmarkers verglichen und dadurch abgeschätzt.

2.2.6 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Sequenzen in der DNA und schneiden innerhalb des Palindroms so, daß ein 5', 3'-Überhang oder glatte Enden entstehen. Die Einheiten, die pro Enzym eingesetzt werden müssen, ergeben sich aus der Relation der Schnittstellen in der Lambda-DNA und der zu untersuchenden DNA.

Zur Linearisierung eines Vektors oder zur quantitativen Isolierung eines Inserts aus einem Vektor wurden 30-50 µg der DNA in einem Gesamtvolumen von 100-200 µl für 2 Stunden oder üN bei 37°C verdaut. Die DNA wurde danach elektrophoretisch aufgetrennt und das gewünschte Fragment aus dem Gel eluiert (s. 2.2.13.1).

2.2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist ein Verfahren zur selektiven *in vitro* Anreicherung von DNA-Fragmenten mit Hilfe von thermostabilen DNA-Polymerasen. Diese ergänzen einen DNA-Einzelstrang zum Doppelstrang, wenn ihnen ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Startpunkt zur Verfügung steht. Durch Wiederholen einer temperaturabhängigen Reaktionsfolge von DNA-Denaturierung, Primeranlagerung und DNA-Doppelstrang-Synthese kommt es zur exponentiellen Vermehrung der Zielsequenz.

Bei der Auswahl der Primersequenzen für die PCR-Reaktionen wurde Folgendes beachtet. Um eine möglichst spezifische Amplifikation der Zielsequenz in der PCR zu gewährleisten, müssen die Primer lang genug sein, um bei einer hinreichend hohen Anlagerungstemperatur selektiv mit der Zielsequenz zu hybridisieren. Die zur Primerwahl benötigten Sequenzen der jeweiligen Gene wurden entsprechenden Datenbanken entnommen (genebank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Durch computergestützten Homologievergleich der gewählten Primersequenzen mit entsprechenden Datenbanken (Blast; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) wurden unspezifische Hybridisierungen ausgeschlossen.

2.2.7.1 PCR-Protokoll zur Amplifikation von genomischer DNA

PCR-Amplifikationen aus genomischen DNA-Proben zur Genotypisierung der Mäuse wurden unter Standardbedingungen des Taq-PCR-Mastermixes (Qiagen, Hilden) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Als Template wurde 1 µl einer 1:10-Verdünnung der Mäuseschwanz-DNA-Präparation (s. 2.2.10.2) eingesetzt. Es wurde der Taq-PCR-Mastermix verwendet und unterschiedliche Primerkombinationen verwendet. Nach Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation im 1 % igen Agarosegel wurde die DNA mittels Southern Blot auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer cDNA-Sonde, welche innerhalb des amplifizierten Bereiches liegt, mit den Primern aber keine Homologie hat, hybridisiert. Dieser zusätzliche Test ermöglicht es, eine Aussage über die Amplifikation der Zielsequenz zu treffen und wurde während der Etablierung der PCR durchgeführt (s. 3.3.4).

PCR zu Amplifikation anderer genomischer Sequenzen wurden mit GeneAmp durchgeführt und nach Angaben des Herstellers (Perkin Elmer) eingesetzt.

2.2.7.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden vor der Klonierung mit dem Qiaquick PCR Purification Kit von Qiagen aufgereinigt, um freie Nukleotide abzutrennen. Hierbei wurden alle Nukleinsäuren kleiner 100 bp von den größeren (bis zu 10 kb) abgetrennt.

2.2.8 Auffüllen von 5'-Überhängen mit der Klenow-Polymerase

Folgender Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und einer Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Fällung unterzogen (s. Fällung bei 2.2.10.1). Nach dem Trocknen des Pellets, wurde es in einem geringen Vol Wasser gelöst.

Reaktionsansatz:

max. 5 µg DNA
5 µl Klenowpuffer
100 µM je dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
6 U Klenow Polymerase
ad 50 µl mit H₂O

2.2.8.1 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Um die Religation eines restringierten Vektors zu verhindern, werden dessen 5'-Enden mit Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Zu 1 bis 2 µg DNA wurde 1 U Alkalische Phosphatase (CIP = Calf Intestine Phosphatase) (Boehringer, Mannheim) sowie 5 µl 10 x CIP-Puffer gegeben und der Ansatz mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurde die Reaktion durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion gestoppt, die DNA gefällt und in einem geeigneten Vol TE-Puffer aufgenommen.

2.2.9 Klonierung von PCR-Produkten und restringierten Fragmenten

Ligationen wurden entweder mit dem PCR-Script™ Amp Cloning-Kit (Stratagene, Heidelberg), pGem T (Easy)-Kit (Promega, Mannheim) oder mit der ready to go-T4-Ligase (Amersham, Freiburg) nach jeweiliger Vorschrift durchgeführt.

PCR-Produkte wurden mit dem PCR-Script-SK(+)-Plasmid blunt end oder über T-Überhang mit dem pGEM T Easy-Vektor/pGEM T-Vektor ligiert. Da die Taq-Polymerase an die 3'-Enden der PCR-Fragmente jeweils ein überhängendes dA-Nukleotid anhängt, können diese DNA-Fragmente direkt in einen geöffneten T-Vektor ligiert werden, der komplementäre dT-Überhänge aufweist. Generell wurden zur Ligation Vektor und PCR-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:5 eingesetzt und über Nacht bei 16°C oder 1 h bei RT inkubiert und anschließend in frisch aufgetaute kompetente Bakterien transformiert (s. 2.2.2).

Wurde die ready to go-T4-Ligase verwendet, wurde die Ligation in einem molaren Vektor/Insert-Verhältnis von 1 : 5 bis 1 : 10 angesetzt. Es ergab sich daher der nachstehende Ansatz.

Ligationsansatz:

- 50 ng Vektor
- 5-10 facher molarer Überschuß an Insert-DNA
- 1 x Ligationspuffer
- 2000 U T 4 DNA-Ligase
- ad 10 µl mit H₂O

2.2.10 Isolation von Nukleinsäuren

2.2.10.1 Isolation genomischer DNA aus Gewebe

Die Isolation der genomischen DNA wurde nach Ausubel¹⁰⁰ durchgeführt. 100 mg Gewebe wurden in 1.2 ml Verdauungspuffer mittels eines Micropistilles zerkleinert und 18-20 h bei 50°C geschüttelt. 1 Vol P/C/I (1:24:1) wurde zugegeben und gemischt. Nach einer Zentrifugation bei 1700 x g für 10 min wurde der wäßrige Überstand mit 0.5 Vol 3 M Na-Acetat pH 5.2 und 2 Vol abs. EtOH versetzt. Die präzipitierte DNA wurde mit 70 % EtOH gewaschen und das DNA-Pellet in 200 µl TE-Puffer resuspendiert. Zum besseren Lösen des Pellets wurde es bei 65°C schüttelnd inkubiert.

2.2.10.2 Genomische DNA-Isolation aus Mausschwanz-Biopsien¹⁰¹

Zur Analyse des Genotyps von Mäusen wurde ein ca. 0.5 cm langes Stück der Schwanzspitze des zu untersuchenden Tieres unter Äthernarkose abgeschnitten und in 500 µl Verdauungspuffer gegeben. Man inkubierte die Schwänze \bar{u} N bei 55°C in einem Schüttelinkubator und führte

anschließend eine Extraktion der DNA mit Phenol und P:C:I durch. Die DNA wurde dann mit 2 Vol abs. EtOH und 1/10 Vol Na Acetat pH 7.0 gefällt und mit 70 % EtOH gewaschen. Das Pellet wurde in TE gelöst und die Fällung wiederholt.

2.2.10.3 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurde eine abgewandelte Version des Protokolls von Chomczynski und Sacchi ¹⁰² verwendet. Alle Schritte erfolgten auf Eis.

0.4 g Gewebe wurden in 4 ml Guanidiniumpuffer in Polypropylen-Zentrifugenröhrchen homogenisiert (Ultra Turrax). 0.4 ml 2 M Na-Acetat pH 4, 0.8 ml Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) und 4 ml Phenol (mit Wasser gesättigt) wurden zugegeben und gemischt. Es folgten eine Inkubation auf Eis für 15 min und eine Zentrifugation bei 4°C, 5000 x g für 40 min. Die obere Phase wurde in 15 ml Corex-Röhrchen überführt und mit 1 Vol Isopropanol gemischt und für 1 h oder üN bei -20°C inkubiert. Die pelletierte RNA (nach einer Zentrifugation für 20-30 min bei 4°C und 7800 x g) wurde mit 70 % EtOH gewaschen und in 800 µl Guanidiniumpuffer aufgenommen und in ein Eppendorftube überführt. 1 Vol Isopropanol wurde zugegeben, gemischt und für 1 h bei -20°C gestellt. Um die RNA erneut zu pelletieren, wurde für 20 min bei 4°C und 15000 x g zentrifugiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Das RNA-Pellet wurde in 50 - 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen und bei 65°C für 10 min inkubiert, um sie zu lösen.

2.2.10.4 DNA/RNA-Isolation aus Zellen

Zur Isolation von Nukleinsäuren aus Zellen wurden diese mit Trizol mittels Zellschaber geerntet und nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Die Zellen wurden in 1 ml Trizol-Reagenz aufgenommen und bei RT für 5 min inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und nach einer weiteren 3-minütigen Inkubation bei RT wurde für 15 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein frisches Eppendorftube überführt und mit 1 Vol Isopropanol versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurde erneut für 10 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 75 % EtOH gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde in einem geeigneten Vol (30-50 µl)

DEPC-Wasser gelöst und die RNA gemessen. Es wurde EtOH zugegeben, so daß eine Endkonzentration von 70 – 80 % vorlag. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.11 Gelelektrophorese

2.2.11.1 DNA-Gel

Die Trennweise des Agarosegels ist in seiner Porengröße begründet. Zur Herstellung des Agarosegels wurde Agarose in TBE eingewogen und aufgeköcht. Die Auftrennung der DNA hängt von der Prozentigkeit des Gels ab, d.h. je höher prozentig ein Gel ist, um so besser werden kleine und um so schlechter werden große Fragmente aufgetrennt. Der Agaroselösung wurde nach Abkühlung auf ca. 50°C Ethidiumbromid zugegeben und in einen Schlitten mit Kamm gegossen. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und RNA und kann später mit UV sichtbar gemacht werden. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde es in eine Kammer mit 1 x TBE gegeben, die DNA mit Proben-Puffer in die Taschen geladen und bei 10 V/cm laufen gelassen. Aufgrund des negativ geladenen Phosphat-Zuckerrückgrates der DNA wandert diese im elektrischen Feld zur Anode.

2.2.11.2 Denaturierendes Formaldehydgel

Prinzip des Formaldehydgelles ist die Auftrennung der RNA in denaturiertem Zustand, d.h. daß die vor dem Auftragen denaturierte RNA im Gel durch die Einwirkung des Formaldehyds einzelsträngig bleibt. Sie wandert aufgrund der negativen Ladung des Phosphat-Zuckerrückgrates zur Anode und trennt sich damit nach ihrem Gewicht bzw. der Größe auf.

Es wurden jeweils 15 µg RNA eingesetzt. Entsprechende Vol wurden in der Vakuumzentrifuge eingetrocknet und in 15 µl Proben-Puffer (14 µl RNA-Proben-Puffer und 1 µl 1 mg/ml Ethidiumbromid) aufgenommen, für 15 min bei 65°C denaturiert und auf ein 1 % Agarosegel in MOPS und 0.66 M Formaldehyd geladen. Es lief bei 10 V/cm und wurde anschließend geblottet.

2.2.11.3 Southern Blot Analyse

Das Agarosegel wurde zur Depurinierung 5 - 15 min in 0.25 N HCl geschwenkt. Das dann in Wasser geschwenkte Gel sollte anschließend für 15 min denaturiert und danach 15 min

neutralisiert werden. Da für den folgenden Blotaufbau als Transferpuffer 20 x SSC verwendet wurde, wurde das Gel ebenfalls in 20 x SSC equilibriert. Die Membran (Duralon UV™, Stratagene, Heidelberg) wurde nach dem Benetzen mit Wasser ebenfalls in 20 x SSC getränkt.

Der Blotaufbau erfolgte im Sandwich-System. Dieser Aufbau ermöglicht es, die DNA gleichzeitig auf zwei Filter zu transferieren. Das Gel wurde hierzu zwischen zwei Filter gelegt und diese wiederum mit Whatman 3 MM - Papier begrenzt. Um die Kapillarkraft zu unterstützen, wurde oben und unten eine Lage Zellstoff aufgebaut. Es wurde $\bar{u}N$ transferiert. Die DNA mußte anschließend mittels UV (120 mJ/cm^2 mit UV Stratalinker 1800) mit der Membran verknüpft werden.

2.2.12 Northern Blot Analyse

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 10 min in H_2O dest. und anschließend in 10 x SSC zur Entfernung des Formaldehyds geschwenkt. Auf zwei Schalen wurde eine Platte als Brücke gelegt, auf die ein Stapel Zellstoff und darauf 3 Lagen 3MM-Papier gelegt wurden. Das obere Papier wurde mit 10 x SSC getränkt, wie auch die Membran, die zuvor mit H_2O äquilibriert wurde. Auf die Membran wurde das Gel gelegt. Der Teil des 3MM-Papiers, der nicht mit der Membran und dem Gel in Kontakt trat, wurde mit Frischhaltefolie abgedeckt, um einen falschen Lauf des Transferpuffers zu verhindern. Auf das Gel wurde eine Brücke aus 2 Lagen in SSC getränktem 3MM-Papier gelegt, welche in die beiden Schalen, die mit 10 x SSC gefüllt waren, ragten und auf dem Gel auflagen. Darauf wurde eine Glasplatte gelegt und der Aufbau beschwert. Der Transfer erfolgte über Nacht. Um die RNA aus dem Gel auf die Membran zu transferieren, wurde die Kapillar- und Schwerkraft genutzt. Nach dem Blotvorgang wurde die Membran in 2 x SSC geschwenkt, um Salz auszuwaschen. Die RNA wurde anschließend durch UV-Licht an die Membran fixiert (120 mJ/cm^2 mit UV-Stratalinker) und die Positionen der 28S und 18S rRNA markiert.

2.2.13 Markierung der Sonden

2.2.13.1 Sondenherstellung

30 µg Plasmid-DNA wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut (s. 2.2.6) und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Insert wurde entweder mittels Elektroelution oder mit dem Geneclean III-Kit (Dianova) aufgereinigt und anschließend die Konzentration des Inserts auf einem Gel im Vergleich zum Größenmarker abgeschätzt.

2.2.13.2 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen durch Elektroelution

Diese Elutionsmethode wurde zur Isolation großer Fragmente eingesetzt. Die zu eluierende Gelbande wurde unter UV-Licht ausgeschnitten und mit einem geringen Vol 1 x TBE Puffer luftblasenfrei in einen Dialyseschlauch gegeben. Der Schlauch sollte in der Gelkammer so platziert werden, daß die DNA aus dem Gelstück in den Puffer im Dialyseschlauch innerhalb des elektrischen Feldes laufen kann. Vor der Entnahme des Dialyseschlauches wurden die Elektroden für 5-10 Sekunden umgepolt, um die DNA von der Wand des Schlauches zu lösen. Der flüssige Schlauchinhalt wurde in ein Eppendorftube überführt und zur Abtrennung von Agaroseresten 5 Min zentrifugiert. Nach einer P/C-Extraktion des Überstandes mit anschließender Fällung wurde die eluierte DNA in einem geeigneten Vol Wasser aufgenommen.

2.2.13.3 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit Geneclean III Kit

Das ausgeschnittene Gelstück wurde bei dieser Methode in 0.5 Vol TBE-Modifizierer und 4.5 Vol NaJ-Lösung bei 55°C gelöst. 7 µl der mitgelieferten Glasmilch wurden zugegeben, gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Dadurch wurde es der DNA ermöglicht an die Silica-Matrix zu binden. Anschließend wurde diese 5 sec bei 15000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde dreimal mit „New Wash“-Lösung gewaschen und zum Schluß in 20 µl H₂O dest. aufgenommen und abzentrifugiert. Dabei erfolgte die Elution der DNA von der Silica-Matrix und der Überstand, der die DNA enthält, konnte in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden.

2.2.13.4 ³²P-Markierung von Sonden

cDNA-Sonden wurden mittels „random priming“ radioaktiv markiert. Es wurden der rediprime II™, RandomPrime Labeling Kit oder der Mega Prime-Kit von Amersham verwendet.

Das Prinzip des random priming¹⁰³ beruht darauf, daß Hexanukleotide verschiedenster Zusammensetzung mit dem zu markierenden DNA-Fragment hybridisieren und dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I als Start dienen. Die Polymerase synthetisiert einen komplementären Strang, wobei radioaktiv markierte Nukleotide eingebaut werden, in diesem Fall das alpha³²P dCTP.

Hierzu wurden 50 ng DNA in einem Vol von 46 µl 5 min gekocht und damit denaturiert, d.h. die doppelsträngige DNA wurde in ihre Einzelstränge getrennt. Anschließend wurde das Pellet des rediprime-Kits, welches das Klenow-Fragment, Hexanukleotide, dATP, dTTP und dGTP enthält, darin resuspendiert; es wurden 4 µl alpha³²P dCTP hinzugefügt und mindestens 10 min bei 37°C inkubiert. Analog dazu wurde auch der Mega Prime-Kit eingesetzt, wobei in diesem Fall alle Reaktionsbestandteile einzeln zusammengegeben wurden.

Zur Quantifizierung der Markierungsreaktion, d. h. zur Messung der Menge an eingebautem radioaktivem Nukleotid, wurde 1 µl des Ansatzes auf einen Streifen Whatman DE81-Papier, welcher zwischen zwei Objektträgern (OT) eingeklemmt wurde, getropft und in eine Pufferwanne mit 0.5 M KH₂PO₄ gehängt. Freie Nukleotide wandern schneller als das zu markierende bzw. das markierte Fragment, daher kann man nach Trocknen des Streifens, diesen unter der Auftragsstelle trennen, oberen und unteren Abschnitt in ein Szintillationsröhrchen geben und die Zerfälle pro min (counts per minute, cpm) messen. Die Einbaurate sollte mindestens 30 % betragen und 1 Mio counts pro ml Hybridisierungslösung eingesetzt werden.

Oligonukleotide wurden am 5'-Ende radioaktiv markiert, indem es durch die T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert wird. Hierzu wurden 10 pmol eines Oligonukleotides mit 20 U der T4-Polynukleotidkinase am 5' Ende phosphoryliert.

Reaktionsansatz:

10 pmol Oligonukleotid
5 µl des 10 x – Kinasepuffers
6µl gamma³²PATP
20 U T4-Polynukleotidkinase

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von 2 µl 0.5 M EDTA oder Erhitzen auf 65°C für 5 min abgestoppt. Mittels Chroma-SpinTM-10 Columns (Clontech, Heidelberg) können die markierten Oligonukleotide von den freien Nukleotiden abgetrennt werden.

2.2.13.5 Hybridisierung mit cDNA-Sonden und Oligonukleotiden

Hybridisierungen von Southern und Northern Blots mit cDNA-Sonden erfolgten nach Hersteller-Anleitung der verwendeten Membran (Stratagene, Heidelberg).

Es wurde bei 42°C prä- und hybridisiert. Die Prähybridisierung erfolgte für mindestens 1 h und die Hybridisierung üN. Nach der Hybridisierung wurde die Membran stringent gewaschen, wobei mit 2 x SSC / 0.1 % SDS bei RT begonnen wurde und je nach Sonde und Stringenz die Salzkonzentration verringert oder die Temperatur erhöht wurde. Die feuchte Membran wurde in Frischhaltefolie eingeschlagen und üN in einer PhosphorImager-Kassette oder auf einem Röntgenfilm exponiert und ausgewertet (2.2.13.6).

Bei der Hybridisierung mit Oligonukleotiden wurde ExpressHyb (Clontech, Heidelberg) eingesetzt.

2.2.13.6 Quantifizierung der Signale

Die Signale konnten mit der ImageQuant-Software des Storm 860 (Molecular Dynamics, Freiburg) ausgewertet werden. Es wurde auf 18S rRNA normiert, um Ladungsunterschiede auszugleichen. Hierzu wurden die Werte der Hybridisierungen durch die der 18S-Werte geteilt. Die Kontrolle wurde 100 % gesetzt und alle Daten wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Gruppen (Minimum von n = 3) wurden statistisch mittels t-test oder Mann-Whitney Rank Sum Test miteinander verglichen und statistische Signifikanz wurde bei $p < 0.05$ akzeptiert. Entsprechend wurden auch die Signale bei der Western Blot Analyse ausgewertet. Die Werte wurden auf das entsprechende GAPDH-Signal und die Ponceau S Färbung normiert (s.2.2.16.4).

2.2.14 Screening von Bibliotheken

Zum Screenen der Bibliotheken wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Die Isolation der Cosmid-DNA wurde entsprechend einer Maxi-Präparation durchgeführt (s. 2.2.4.2). Die Aufreinigung der Lambda-DNA erfolgte nach einem vereinfachten Verfahren zur Isolation von Lambda-DNA aus flüssigem Lysat ¹⁰⁰.

2.2.15 Sequenzierung nach Sanger mit ALF

Zur Sequenzierung wurde der AutoReadTM Sequencing Kit von PharmaciaBiotech verwendet und der A.L.F. DNA Sequencer (Pharmacia LKB, Freiburg) hierfür eingesetzt.

Das Prinzip dieser Sequenzierung ¹⁰⁴ beruht auf dem Einsatz von Didesoxynukleotiden, die aufgrund der fehlenden 3' Hydroxylgruppe zur vorzeitigen Termination der DNA-Synthese führen. Einzelsträngige DNA dient als Matrize. Ein Primer mit freier 3'-OH-Gruppe ist komplementär zu einer kurzen Sequenz. Davon ausgehend synthetisiert eine DNA-Polymerase DNA-Stränge. Der Reaktionsansatz wird in vier Aliquots aufgeteilt. Zu jedem Aliquot wird ein Gemisch zugegeben, das Desoxynukleosidtriphosphate aller vier Basen (dNTPs) und, in einer geringen Konzentration, Didesoxytriphosphat (ddNTPs) von jeweils nur einer der vier Basen enthält. Den Didesoxytriphosphaten fehlt die 3'-OH-Gruppe. Sie werden von der DNA-Polymerase wie die Desoxynucleosidtriphosphate eingebaut, führen dann jedoch zum Kettenabbruch. In jedem Ansatz wird ein anderes ddNTP eingesetzt, so daß alle synthetisierten DNA-Fragmente im jeweiligen Ansatz mit der gleichen Base enden. Durch den statistisch verteilten Kettenabbruch entsteht ein Gemisch aus Fragmenten verschiedener Länge. Alle Fragmente haben das gleiche 5'-Ende, aber verschiedene 3'-Enden.

2.2.16 Proteinanalyse

2.2.16.1 Proteinisolation aus Zellen

Die Zellen wurden für mind. 24 h serumfrei gesetzt und anschließend das Medium abgezogen, 5,7 µl PMSF (aus 1M Stammlösung) in 1 ml Überstand hinzugefügt und mit Ultrafree-4 Units aufkonzentriert.

Zellen wurden mit PBS abgeschabt, bei 300 x g zentrifugiert, in Hepes-Puffer aufgenommen und mit einem Micropistill homogenisiert. Danach wurden die Proteine dreimal in Stickstoff schockgefroren und anschließend bei 37°C aufgetaut.

Die Proteinmengen der einzelnen Proben wurden mit dem DC Protein Assay von Biorad bestimmt.

2.2.16.2 Western Blot Analyse

2.2.16.3 Proteingel

Proteine werden durch das dem Polyacrylamidgel zugesetzte amphipatische SDS negativ geladen und bilden ein Protein-SDS-Komplex, dessen Gesamtladung der Größe des Proteinmoleküls proportional ist. Im elektrischen Feld des SDS-Polyacrylamidgels bewegen sich die Proteinkomplexe daher zur Anode hin. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine ist proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes und wird durch die Konzentration des Polyacrylamids im Gel (Porengröße) und die angelegte Spannung bestimmt. Es wurden die 4-12 % Bis/Tris-Fertiggele der Firma Invitrogen BV verwendet. Die denaturierten Proben in Laemmli-Puffer liefen bei 200 V unter Verwendung des MES-SDS-Laufpuffers und wurden danach auf Nitrozellulosefilter per Naßblot transferiert. Zur Färbung der Western Blots wurde Ponceau S-Lösung verwendet.

2.2.16.4 Detektion des Western Blots

Der Filter wurde 1 h bei RT mit TBS-T/2.5 % BSA (fettsäurefrei) geblockt und anschließend in N mit dem ersten Antikörper bei 4°C inkubiert; der Anti-IGF-II-Antikörper wurde über 2 Nächte bei 4°C inkubiert. Die verschiedenen Antikörper wurden folgendermaßen eingesetzt: Anti-alpha, gamma Aktin, monoklonal (HHF35) 1:300; Anti-GAPDH, monoklonal 1:3000; Anti-GFP, monoklonal 1:1000; Anti-IGF-II, monoklonal (S1F2) 1:1000 in TBS-T/2.5 % BSA. Danach wurde mehrmals mit TBS-T gewaschen. Als zweiter Antikörper wurde der Anti-Mouse Antikörper, gekoppelt mit HRP 1:10000 1 h bei RT eingesetzt oder 1:2500 in TBS-T/2.5 % BSA 15 min bei RT inkubiert.

Zur Detektion der Proteine wurde der ECL-Kit von Amersham verwendet. Hierbei wird das Substrat (Luminol) durch die Peroxidase (HRP), welche an den zweiten Antikörper gekoppelt ist, unter alkalischen Bedingungen katalytisch oxidiert, wodurch eine Chemilumineszenz bei einer Wellenlänge von ca. 428 nm entsteht. Diese kann man mit blaulicht-sensitiven Röntgenfilmen (Hyperfilm ECL, Amersham) detektieren. Der Filter konnte nach dem Strippen bei 50°C mehrmals verwendet werden.

2.2.17 Zellkultur

Als Zellkultursystem wurden L6 (Skelettmuskelzellen aus der Ratte) eingesetzt. Sie wachsen als Monolayer und sind spindelförmig, können bei niedriger Zelldichte auch voluminöser und gedrungener sein. Als Medium wurde DMEM (4 mM L-Glutamin, 1.5 g/l Natriumbicarbonat, 4,5 g/l Glucose) mit 10 % FBS, 1 % Pen/Strep, 1 % Na-pyruvat und 1 % Non-Essential Aminoacids verwendet (Vollmedium). Die Zellen wurden bei 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit und 37°C inkubiert.

2.2.17.1 Passagieren von Zellen und Ansetzen von Zellversuchen

Die als Monolayer wachsenden L6 Zellen sollen im Zustand der Subkonfluenz, d. h. wenn die Zellen einen noch nicht ganz dichten Rasen bilden, passagiert werden. Bei 70 % iger Konfluenz wurden die Zellen daher 1:2 bis 1:20 verdünnt bzw. auf weitere Kulturschalen verteilt. Hierzu wurde den Zellen das Medium entzogen und mit PBS, das auf 37°C vorgewärmt war, gewaschen. Nach kurzzeitigem Benetzen der Zellen mit Trypsin und Inkubation von ca. 5-10 min im Brutschrank, kugeln sich die Zellen ab und können resuspendiert werden. Trypsin als proteolytisches Enzym spaltet die an der Zell-Zell-Bindung beteiligten Proteine, wodurch sich die Zellen von der Schale ablösen. Der Trypsinierungsvorgang wurde mit Vollmedium gestoppt und die Zellen entsprechend der gewünschten Verdünnung verteilt.

2.2.17.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu müssen die Zellen abtrypsiniert und resuspendiert werden. 10 µl wurden hierzu eingesetzt. Alle 16 kleinen Quadrate

wurden ausgezählt. Diese haben eine Fläche von 1mm^2 und ein Vol von $0.1\ \mu\text{l}$, die Zellzahl pro ml erhält man durch Multiplikation des Mittelwertes mit 10^4 .

2.2.17.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen wurden abtrypsinisiert und anschließend in FBS bzw. DMEM mit 10 % FBS aufgenommen. DMSO (mit Medium gemischt) soll langsam, d.h. tropfenweise bis zu einer Endkonzentration von 10 % zugegeben werden, um die Zellen vor Schaden beim Einfrieren und Auftauen zu bewahren, wobei DMSO die Kristallbildung und damit die Lyse der Zellen verhindert. Die Zellsuspension wurde bei -80°C und zur längeren Aufbewahrung in einem Stickstofftank gelagert.

Zum Auftauen wurden die kältestabilen Röhren (Kryo-Röhren) aus dem Stickstofftank genommen und auf Eis gestellt. Für kurze Zeit ließ man sie in einem 37°C -Wasserbad vorsichtig auftauen. In einer Zellkulturflasche wurde vorgewärmtes Medium vorgelegt und die Zellen hinzugegeben. Um das noch verbliebene DMSO vollständig zu entfernen, erfolgte nach 24 h ein Mediumwechsel.

2.2.17.4 Ernte der Zellen

Nach Beendigung des Versuches wurde den Zellen das Medium entnommen und mit 5 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von PBS sollen die Zellen dann mit dem Zellschaber möglichst rasch und gründlich vom Boden der Zellkulturflasche- bzw. schale abgelöst werden. Die resuspendierten Zellen wurden in Eppendorftubes überführt und sofort auf Eis gestellt. Das Zellpellet wurde bei $300 \times g$ und 4°C für 5 min zentrifugiert, das überständige PBS verworfen und das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -80°C tiefgefroren. Analog dazu kann die Ernte auch mit Trizol (s. 2.2.10.4) erfolgen.

2.2.17.5 Transiente und stabile Transfektion

Die Zellen wurden nach Anleitung der Firma Roche, Mannheim mittels FugeneTM6 transfiziert. Zur Selektion der transfizierten Zellen wurde Geniticin (G418) in einer Konzentration von $400\ \mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Daraus können Zellen vereinzelt und Klone weiterkultiviert werden.

2.2.17.6 Auswertung der Morphologie der Zellen

Die Zellen wurden mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Leica) betrachtet und fotografiert. Die Bilder konnten mit dem NIH-Programm ausgewertet werden, wobei neben der Längs- und Querachse auch die Fläche der Zellen errechnet wurde. Die Ergebnisse wurden statistisch mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ausgewertet.

2.2.18 Transgene Mäuse

Zur Herstellung der IGF-II transgenen Mäuse wurden C57BL/6 verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Inzuchtstamm. Die Mäuse sind schwarz und haben ein Gewicht von 20-22/18-20 g (m/w). Die Weibchen tragen 18-21 Tage und der Wurf durchschnittlich bei 5-7 Jungtieren. Die Firma Atugen (Berlin) führte die Mikroinjektion des Konstruktes durch (s. 3.3).

2.2.19 Stunning Protokoll

Folgendes Protokoll der Okklusion / Reperfusion wurde, wie von Kluge²⁷ beschrieben, verwendet.

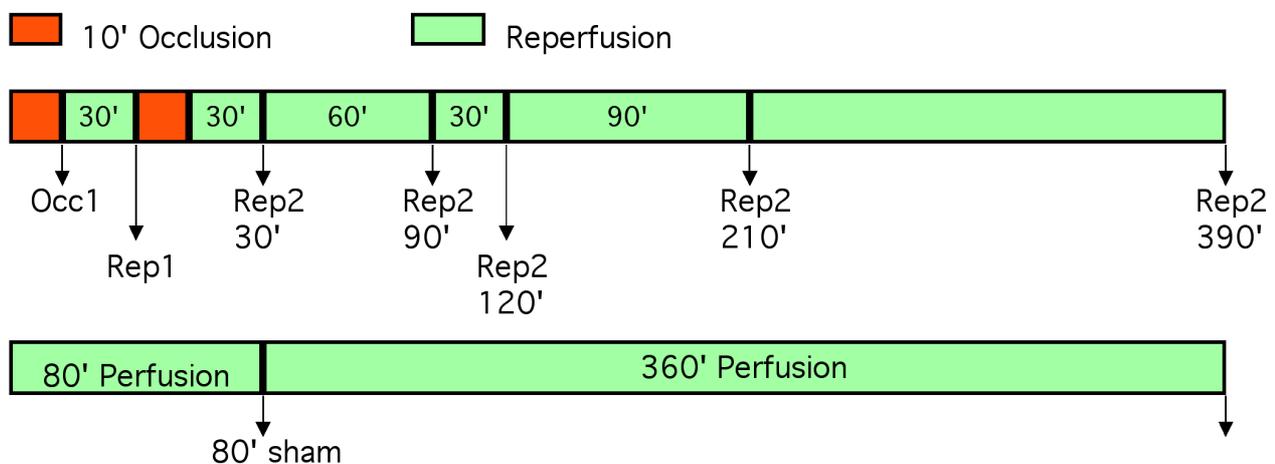


Abb. 7: Stunning Protokoll. Es sind die Zeiträume für Okklusion (Occ) und Reperfusion (Rep) eingezeichnet. Zusätzlich ist die sham-Operation aufgeführt.

3 Resultate

3.1 Restriktionskarte des IGF-II-Gens des Schweins

Um einen Überblick über die genomische Struktur des IGF-II beim Schwein zu bekommen, wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt. Dies ermöglichte es, eine grobe Karte des IGF-II-Gens des Schweins zu erstellen. Weiterhin waren Datenbankeinträge bei der Auswertung der Ergebnisse der Restriktions- und Southern Blot Analyse hilfreich. Es wurden die humane genomische Sequenz (Genbank Accession Nr. X03562 und L15440) und eine bekannte mRNA-Sequenz (Genbank Accession Nr. X56094) des Schweins zur Erstellung der Restriktionskarte des IGF-II-Gens beim Schwein hinzugezogen. Für die Southern Blot Analyse wurde genomische DNA des Schweins aus der Leber isoliert und mit *Bam* H I, *Eco* R I, *Hind* III, *Kpn* I, *Pst* I, *Pvu* II, *Sac* I, *Xba* I, *Xho* I und *Not* I restringiert. Anschließend wurde eine Southern Blot Hybridisierung mit einer cDNA-Sonde (IGF-II/0.46ES) durchgeführt. Bereiche, die homolog zu der verwendeten Sonde sind, ergeben in der Southern Blot Analyse ein Signal und ermöglichen die Erstellung einer Restriktionskarte für den hybridisierten Bereich (Abb. 8; die sich daraus ergebende genomische Struktur ist in Abb. 16 zu finden).

3.1.1 Subklone des IGF-II-Genes beim Schwein

Neben der Restriktionsanalyse wurden auch eine Cosmid-Bibliothek und eine Lambda-Bibliothek gescreent. Zusätzlich wurde mittels genomischer PCR versucht, verschiedene Bereiche des IGF-II-Genes zu amplifizieren. Jeder dieser Methoden lag die Annahme zugrunde, daß die Sequenz des Schweine-IGF-II stark homolog zu der des Menschen ist. Dies war in der Tatsache begründet, daß die Sequenzen zwischen Mensch (Genbank Accession Nr. X03562 und L15440), Maus (Genbank Accession Nr. U71085) und Ratte (Genbank Accession Nr. X02213) auch sehr konserviert sind. Beim Schwein ist eine mRNA (Genbank Accession Nr. X56094) beschrieben, die als Referenz bei der Oligonukleotidsuche herangezogen wurde.

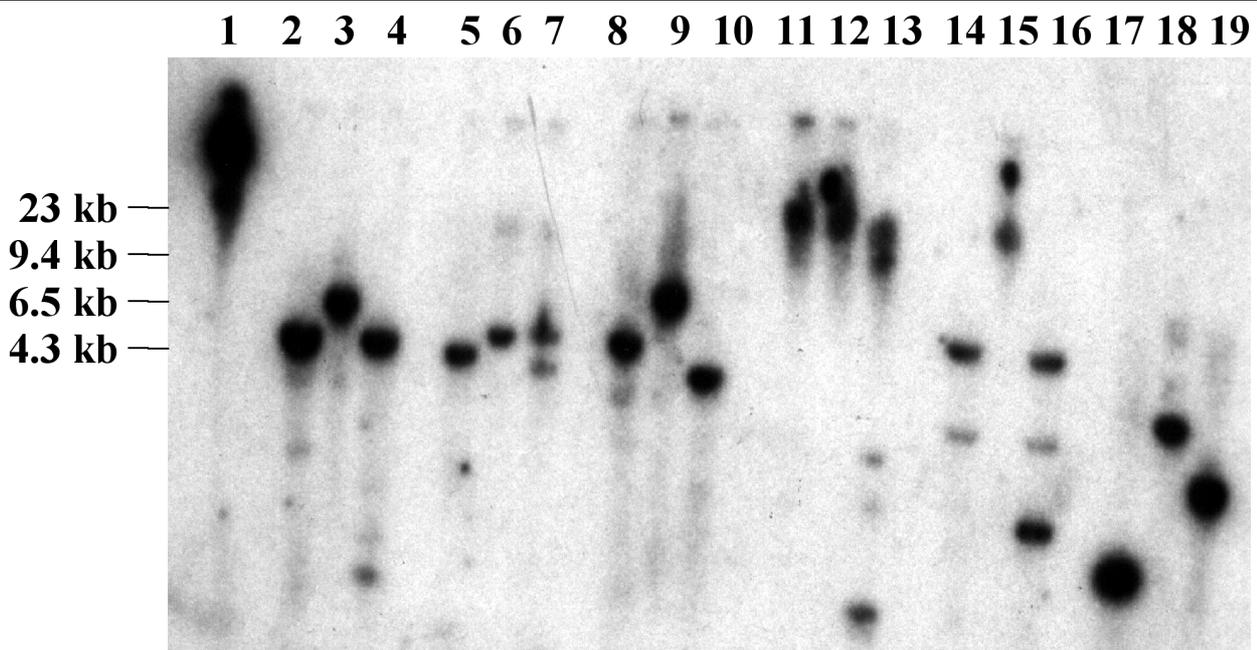


Abb. 8: Southern Blot Analyse des IGF-II des Schweines. 10 µg Genomische DNA wurden mit Bam H I, Eco R I, Hind III, Kpn I, Pst I, Pvu II, Sac I, Xba I, Xho I und Not I verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurde ein Southern Blot durchgeführt, wobei die DNA zuerst depuriniert, dann denaturiert und schließlich neutralisiert wurde. Sie wurde mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung wurde mit IGF-II/0.46ES durchgeführt. Spur 1: unverdaut, Spur 2: Bam H I; Spur 3: Eco R I; Spur 4: Bam H I und Eco R I; Spur 5: Hind III; Spur 6: Kpn I; Spur 7: Hind III und Kpn I; Spur 8: Pvu II; Spur 9: Sac I; Spur 10: Pvu II und Sac I; Spur 11: Xba I; Spur 12: Xho I; Spur 13: Xba I und Xho I; Spur 14: Pst I; Spur 15: Not I; Spur 16: Pst I und Not I, Spur 17: Sac I und Bam H I, Spur 18: Kpn I und Sac I, Spur 19: Eco R I und Sac I.

Es wurde die Cosmid-Bibliothek und die Lambda-Bibliothek mittels radioaktiv markierter Sonde gescreent. Hierbei wurden verschiedene Sonden verwendet: Promotor-Sonden (P1, P2, P3 und P4) und eine zum kodierenden Bereich homologe Sonde (IGF-II/0.46 ES). Positive Klone wurden teilweise subkloniert und sequenziert. Mit genomischer PCR konnten auch Sequenzen aus dem 5' Bereich und dem 3' Bereich amplifiziert werden. Verschiedene Klone mit Homologien zur Insulin / IGF-Familie wurden isoliert.

Es handelte sich hierbei um Sequenzen, die in der Genbank wie folgt bezeichnet waren:

- FSH
- genomische DNA
- humanes Chromosom 11
- humanes IGF-II, Exon 5
- humanes IGF-II, Exon 6

humanes IGF-II, 3' Region/Exon 7
humanes IGF-II, 5' Region (wurde auch als Sonde für Southern Blot Analyse eingesetzt)
humanes IGF-II, Exon 9
humanes IGF-II, 3' von Exon 1
humanes pre - pro - IGF-I, Ib Exon 4
Ovalbumin
Ratten IGF-II, 5' von Exon 1
Ratten IGF-II, Exon 1
Relaxin
Schweine leydig Insulin - like hormon
Schweine SINE
Schweine zentromerspezifische Repeats
Schweine-Mikrosatelliten

Aus diesen Klonen, verglichen dem humanen IGF-II-Gen und der Schweine mRNA (s.3.2), konnte die grobe Struktur des porcinen IGF-II-Gens ermittelt werden (Abb. 16).

Ein durch PCR erzielter Klon der 5' - Region (s. o. humanes IGF-II, 5' Region) läßt die Aussage zu, daß auch das porcine IGF-II ein Exon besitzt, das Homologie zu Exon 1 des humanen IGF-II-Genes hat. Mit diesem Klon wurde auch eine Southern Blot Analyse (Abb. 9) durchgeführt. Die Sonde hybridisierte sowohl mit der restringierten genomischen DNA des Menschen als auch mit der des Schweins. Auch die genomische DNA der Maus ergab ein Signal, obwohl bei der Maus nur Pseudoexons dieser Region beschrieben sind. Es können aufgrund des Southern Blots (Abb. 9) Restriktionsschnittstellen für *Eco* R I und *Pst* I zugeordnet werden. Weiterhin kann man aufgrund des Nachweises dieser Region beim porcinen IGF-II davon ausgehen, daß es wie beim Menschen ein Exon 1 und damit auch den Promotor P1 besitzt. Zusätzlich bestätigen Ergebnisse der Northern Blot Analyse diese Schlußfolgerung (s. 3.2.1).

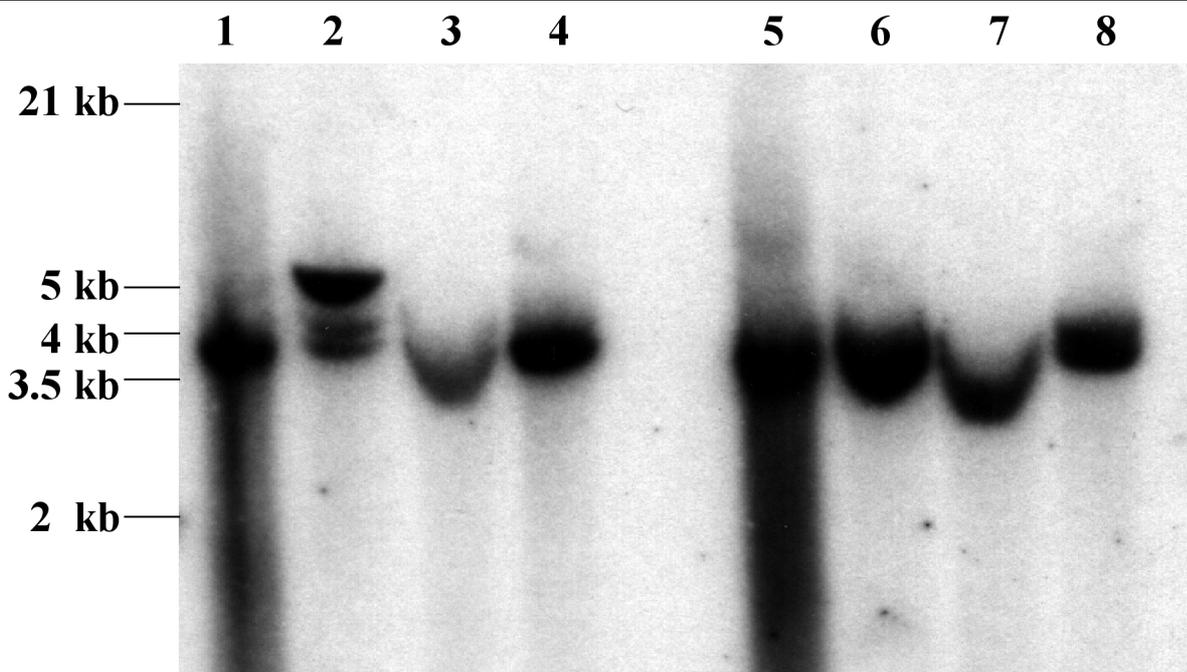


Abb. 9: Southern Blot Analyse der Exon 1 Region des IGF-II. 10 µg Genomische DNA von Mensch, Schwein, Kaninchen und Maus wurden mit Eco R I und Pst I verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt und mit der porcinen Sonde gegen Exon 1 (Klon: humanes IGF-II, 5' Region, s.o.) hybridisiert. Spur 1-4: Eco R I; Spur 5-8: Pst I; Spur 1, 5: Mensch; Spur 2, 6: Schwein; Spur 3, 7: Kaninchen; Spur 4, 8: Maus.

3.2 Promotor-Aktivitäten des porcinen IGF-II-Gens

3.2.1 Northern Blot Analyse als indirekter Nachweis der Promotor-Aktivitäten

Ein Ziel der Arbeit war es, eine Aussage über die Verwendung der Promotoren des porcinen IGF-II zu treffen. Man kann davon ausgehen, daß die sechs unterschiedlichen mRNAs des porcinen IGF-II wie beim Menschen alternativ gespleißt und durch verschiedene Promotoren generiert werden. Der Einsatz der Promotoren wurde indirekt nachgewiesen. Hierzu wurden verschiedene IGF-II-Sonden (Abb. 10) eingesetzt, die für die unterschiedlichen mRNAs spezifisch sind. Oligonukleotide wurden so gewählt, daß sie im Vergleich mit der Struktur des humanen IGF-II im 5' Bereich einer mRNA lokalisiert sind, d.h. 3' des entsprechenden Promotors. Indirekt, d. h. über die Transkription einer mRNA ist es im Vergleich mit der Transkription des humanen IGF-II möglich, zu klären, welcher Promotor eine entsprechende mRNA des porcinen

3.2.1.1 Promotor P1 generiert eine 6.0 kb mRNA

Es wurde die humane cDNA-Sonde IGF-II/P1, welche homolog zu der 5' UTR der humanen 5.3 kb mRNA ist und Exon 1 und Exon 2 enthält, in der Northern Blot Hybridisierung verwendet. Beim Menschen ist der Promotor P1 für eine mRNA von 5.3 kb verantwortlich, die aus den Exons 1, 2, 3, 7, 8 und 9 besteht. Im Schwein konnten bei der Northern Blot Hybridisierung drei mRNAs mit den Größen 6.0, 4.8 und 1.2 kb detektiert werden. Zusätzlich wurde die Existenz der mRNAs unter Verwendung eines Antisense-Oligonukleotides (#119), welches in Exon 1 liegt, überprüft. Es konnten die gleichen Signale wie bei der Hybridisierung mit der cDNA-Sonde detektiert werden (Abb. 11).

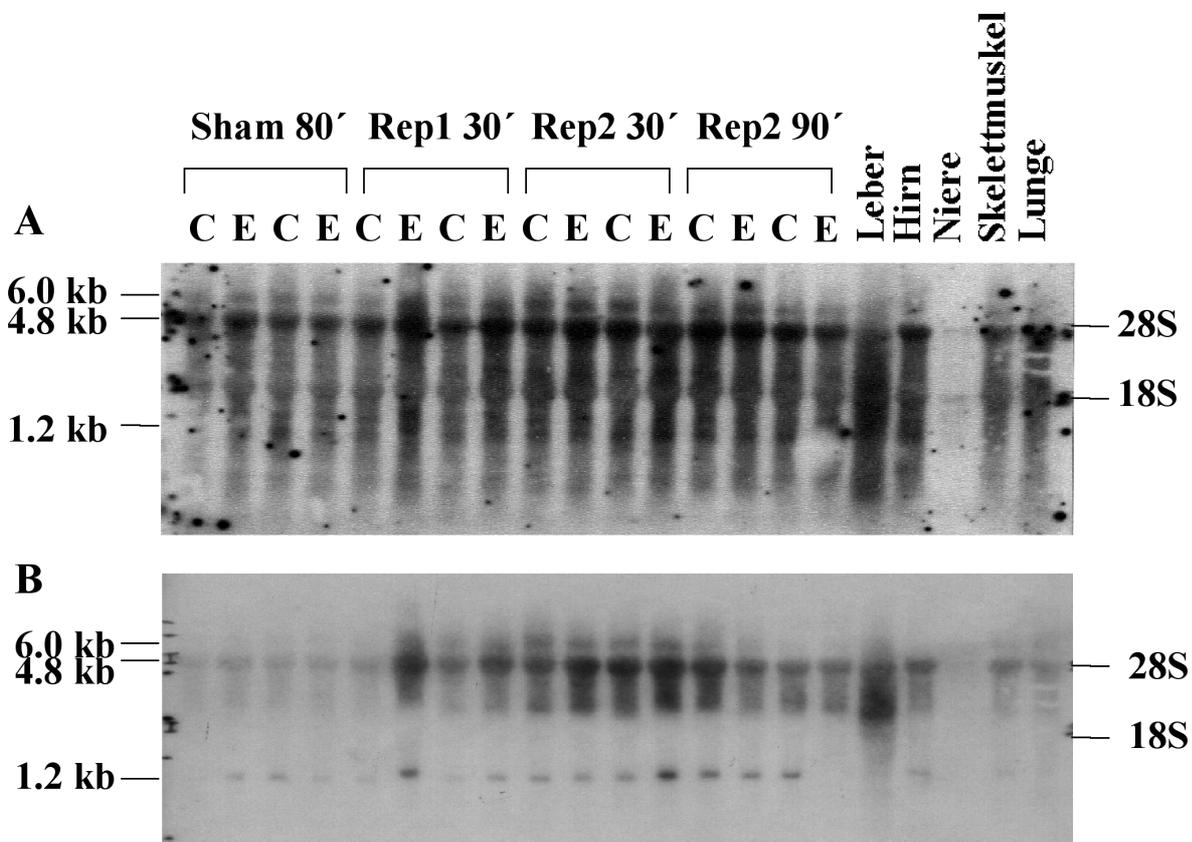


Abb. 11: Northern Blot Analyse des Promotors P1. 15 µg Gesamt-RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. C: Kontrolle, E: Experiment, das Protokoll der zugehörigen Versuche ist im Stunning Protokoll beschrieben (s. 2.2.19). Es wurde mit der cDNA-Sonde P1 (A) und mit dem Antisense-Oligonukleotid #119 (B) hybridisiert.

Aus den Hybridisierungsergebnissen des Northern Blots kann man schließen, daß drei unterschiedlich große mRNAs, darunter eine 6.0 kb mRNA, von einem gemeinsamen Promotor generiert werden, der dem humanen Promotor P1 homolog ist.

3.2.1.2 Zwei mRNAs werden ausgehend von Promotor P2 transkribiert

Zwei deutliche Banden mit den Größen 4.8 und 0.8 kb wurden mit der humanen cDNA-Sonde IGF-II/P2, die gegen das humane Exon 4 gerichtet ist, detektiert.

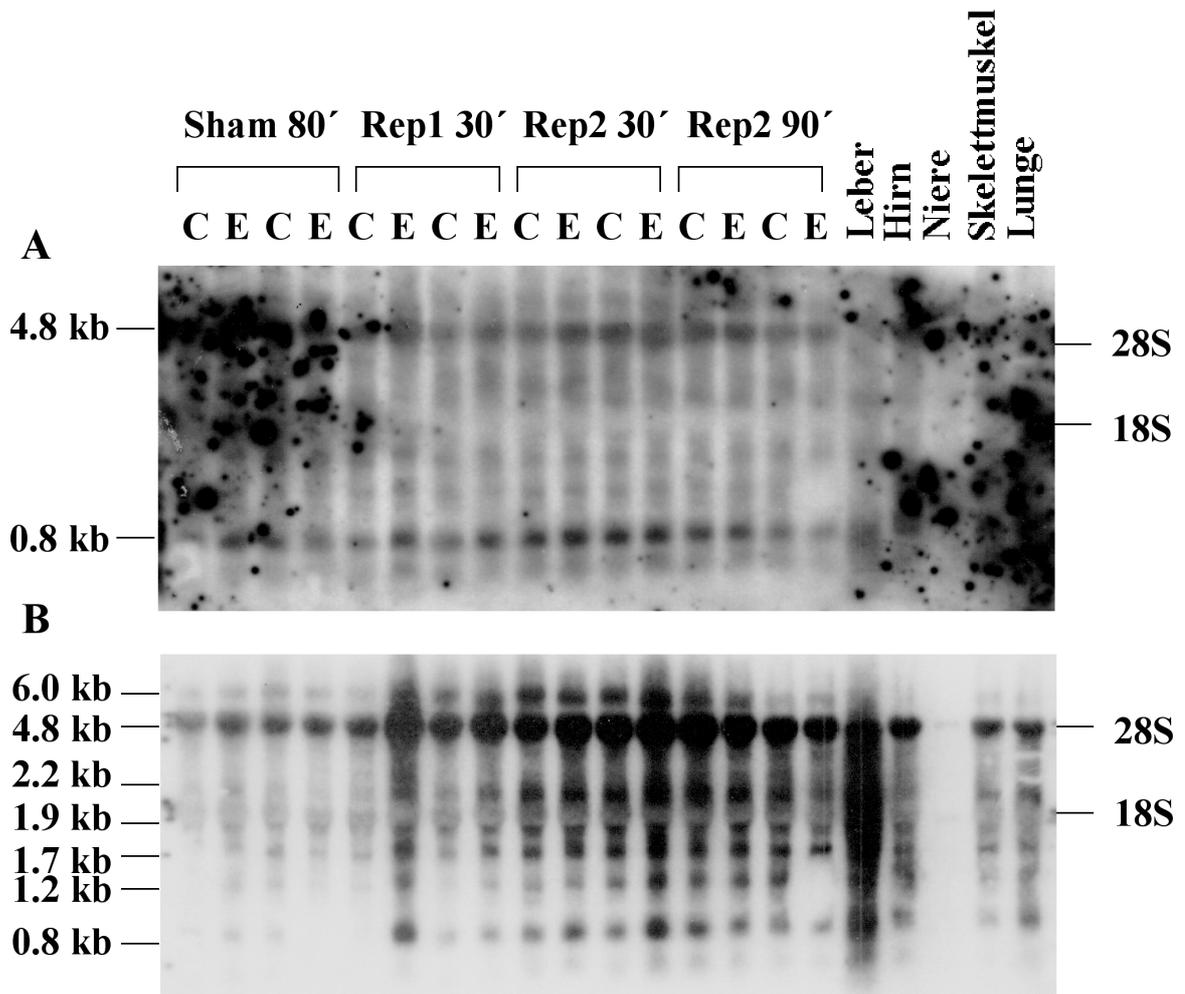


Abb. 12: Northern Blot Analyse des Promotors P2. Der Northern Blot aus Abb. 11 wurde mit cDNA-Sonde P2 (A) und Antisense-Oligonukleotid #155 aus Exon 4 (B) hybridisiert.

Beim Menschen wird von Promotor P2 aus eine mRNA von 5 kb transkribiert, die aus Exon 4, 7, 8 und 9 besteht. Zusätzliche Hybridisierung mit einem Antisense-Oligonukleotid (#155) aus dem gleichen Exon ergab mehrere mRNAs (6.0, 2.2, 1.9, 1.7 und 1.2 kb), darunter auch eine 6.0 kb

mRNA; bei der 6.0 kb mRNA könnte es sich um eine Vorläufer-mRNA handeln, die noch nicht vollständig gespleißt ist. Die kürzeren mRNAs könnten durch Einsatz unterschiedlicher Polyadenylierungssignale, wie es auch beim Menschen der Fall ist, entstehen. Weiterhin ist eine Kreuzhybridisierung mit bisher unbekannt Sequenzen nicht auszuschließen (Abb. 12).

3.2.1.3 Promotor P3 ist verantwortlich für eine 4.8 kb mRNA

Beim Menschen generiert der Promotor P3 zwei unterschiedlich große mRNAs von 6.0 und 2.2 kb. Zum Nachweis der Verwendung des Promotors P3 beim Schwein wurde eine humane cDNA-Sonde (IGF-II/P3) verwendet, die in Exon 5 liegt. Diese cDNA-Sonde gegen Exon 5 ergab jedoch kein Signal. Mit einem Antisense-Oligonukleotid (#156) gegen das humane Exon 5 konnte beim Schwein eine einzelne Bande bei 4.8 kb detektiert werden (Abb. 13).

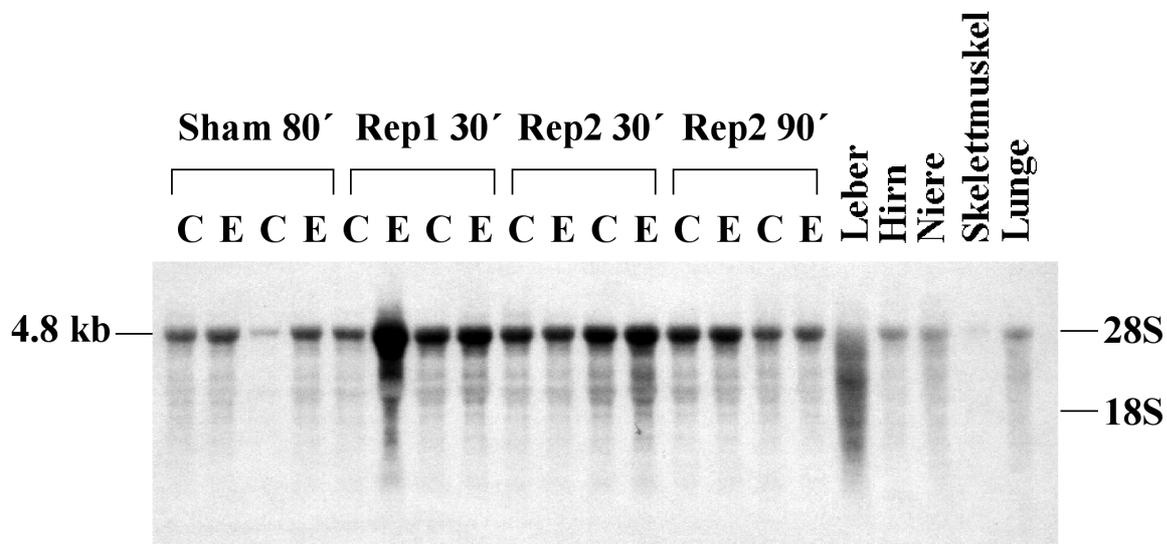


Abb. 13: Hybridisierung mit Antisense-Oligonukleotid gegen Exon 5. Der gleiche Northern Blot wie in Abb. 11 wurde mit dem Antisense-Oligonukleotid #156 hybridisiert. Das Oligonukleotid ist zu Exon 5 homolog. Es wurde eine mRNA von 4.8 kb detektiert.

Es kann davon ausgegangen werden, daß Promotor P3 für die Transkription einer mRNA von 4.8 kb verantwortlich ist, da das verwendete Antisense-Oligonukleotid homolog zum humanen Exon 5 des IGF-II ist und dieses in der mRNA enthalten ist, die beim Menschen von Promotor P3 generiert wird. Dennoch war es nicht möglich, ein Signal mit der cDNA-Sonde (IGF-II/P3) zu

erzielen, was die Frage offenläßt, in wieweit der zuständige Promotor des Schweins dem humanen Promotor P3 homolog ist.

3.2.1.4 Vier mRNAs werden bei Einsatz des Promotors P4 transkribiert

Der Promotor P4 ist beim Menschen für eine mRNA von 4.8 kb verantwortlich. Beim Schwein wurde mit einer humanen cDNA-Sonde gegen Exon 6 (IGF-II/P4), welches 3' des Promotors P4 liegt, eine 2.2 kb mRNA detektiert. Schwächere Banden bei 5.3, 4.4, 2.8 und 1.2 kb waren ebenfalls vorhanden. Bei der Hybridisierung mit einem Antisense-Oligonukleotid (#157), das ebenfalls in Exon 6 liegt, gab es kein Signal (Abb. 14).

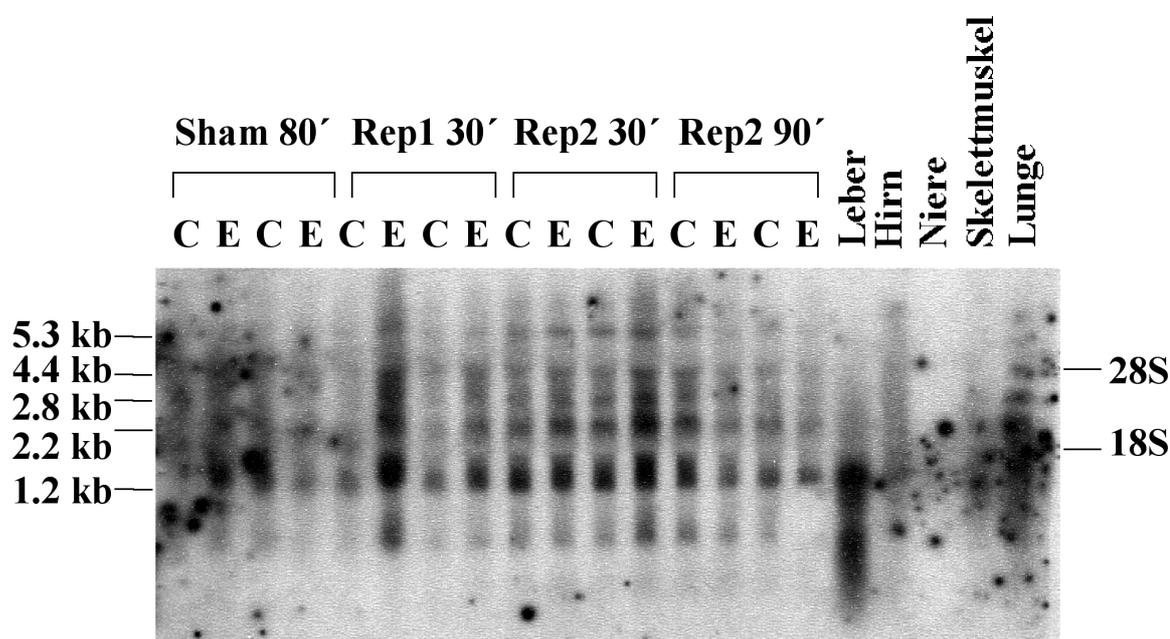


Abb. 14: Einsatz des Promotor P4 wurde mittels Northern Blot Analyse untersucht. Hybridisierung mit der cDNA-Sonde P4 wurde mit dem obigen Blot (Abb. 11) durchgeführt.

Wie auch im Fall des Promotors P2, welcher mehrere mRNAs generiert, könnte es sich bei der 5.3 kb mRNA um eine unvollständig gespleißte Vorläufer-mRNA handeln. Die kleineren mRNAs könnten durch Verwendung verschiedener Polyadenylierungssignale entstehen.

3.2.1.5 In zwei mRNAs kann die 3' UTR Region detektiert werden

Beim Menschen ist eine mRNA von 1.8 kb beschrieben, die aus der 3' UTR besteht. Die Hybridisierung mit einem Antisense-Oligonukleotid aus der 3' UTR des Exon 9 (#93) ergab beim

Schwein zwei Signale bei 1.9 und 1.2 kb (Abb. 15). Daher kann man beim Schwein davon ausgehen, daß die 3' UTR in zwei unterschiedlich großen mRNAs enthalten ist.

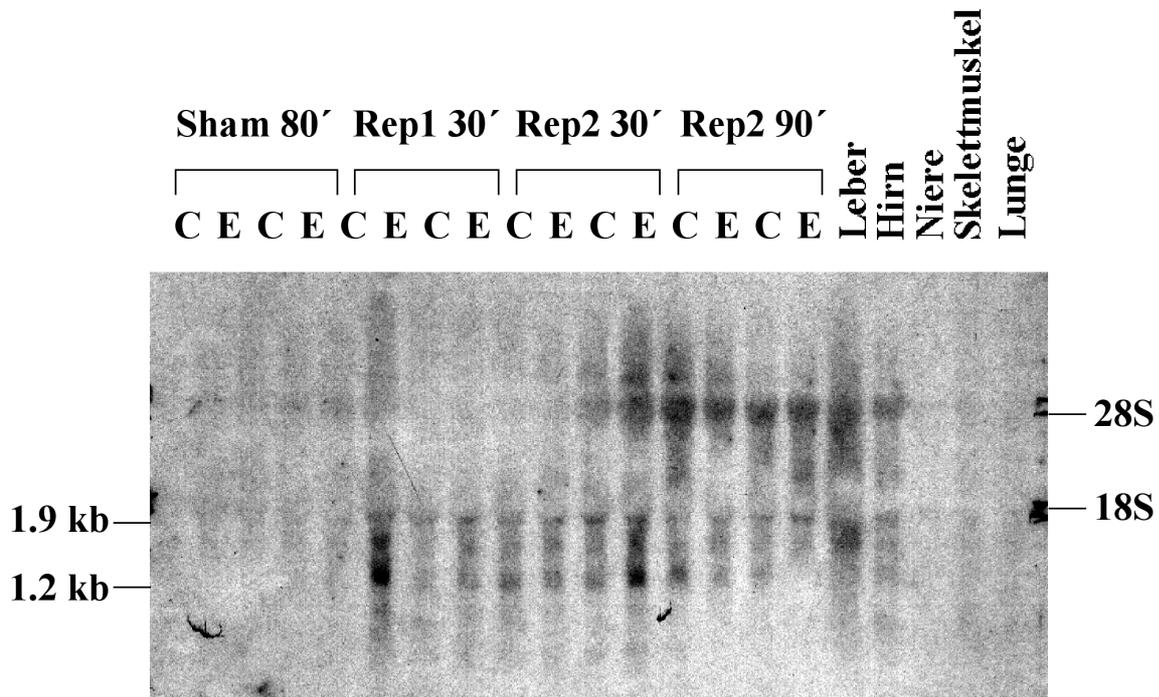
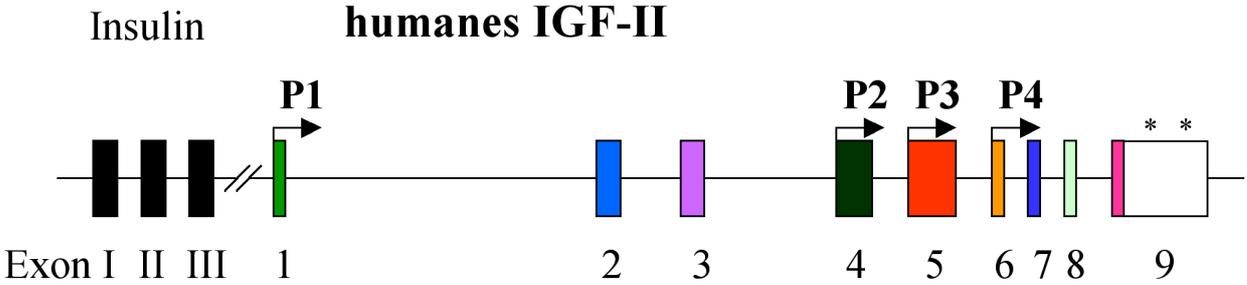
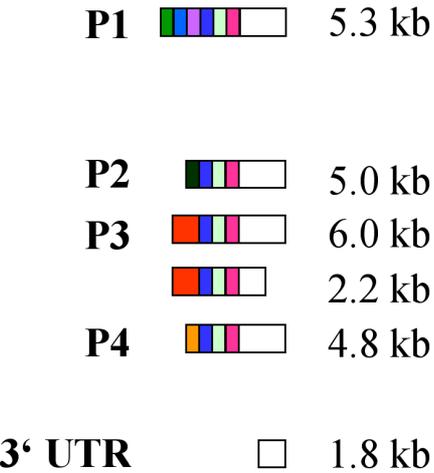


Abb. 15: Analyse der 3' UTR mittels Northern Blot Hybridisierung. Das Antisense-Oligonukleotid #93, welches in der 3' UTR liegt, wurde zur Hybridisierung verwendet.

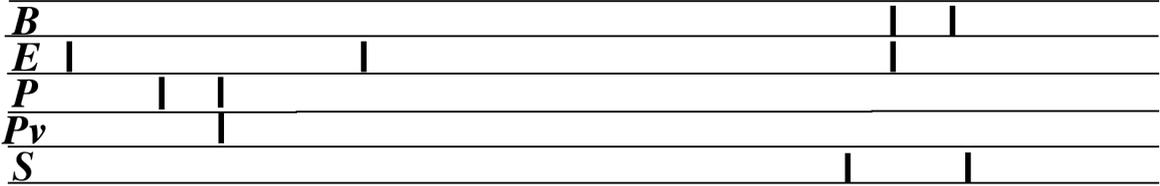
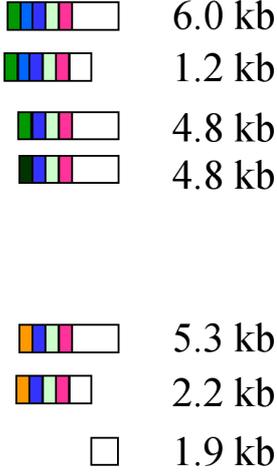
Abb. 16: Struktur des porcinen IGF-II verglichen mit dem humanen Gen. Schematisch dargestellt ist die genomische Organisation des humanen und des Schweine-IGF-II-Gens, welche aus der genomischen Sequenz des Menschen und der mRNA des Schweins abgeleitet wurde. Hinzugezogen wurden die Ergebnisse aus den Sequenzierungen der unterschiedlichen Subklone und der Southern Blot Hybridisierungen. Beim Schwein sind Exon 1 und Exon 2 verknüpft. Die Existenz des Promotors P3 beim Schwein ist noch unklar, da Exon 4 nur mit einem Oligonukleotid nachgewiesen werden konnte. Neben den 9 Exons im humanen Gen sind die vier zugehörigen Promotoren (P) und die beiden Polyadenylierungsstellen(*) in Exon 9 eingezeichnet. Mögliche Zusammensetzung der alternativ gespleißten mRNAs beider Spezies sind aufgeführt. Weiterhin sind die Restriktionsschnittstellen für Bam HI (B), Eco RI (E), Pst I (P), Pvu II (Pv) und Sac I (S) innerhalb des porcinen IGF-II-Gens gekennzeichnet.



humane IGF-II mRNA



porcine IGF-II mRNA



3.2.1.6 Struktur des porcinen IGF-II-Genes

Aus den Ergebnissen der Southern Blot Analyse, der Northern Blot Hybridisierung und den Sequenzen der Subklone im Vergleich zu den schon bekannten Sequenzen wurde folgende Karte des porcinen IGF-II-Genes erstellt (Abb. 16). Die Struktur des porcinen IGF-II-Genes ist dem des Menschen ähnlich und es enthält einen Promotor P1, der neben dem Promotor P2 für die Transkription einer 6.0 kb mRNA verantwortlich ist. Da der Einsatz des Promotors P3 nur mit einem Antisense-Oligonukleotid nachgewiesen werden konnte, ist es nicht klar, ob das porcine IGF-II einen homologen Promotor besitzt. Weiterhin kann man aus Vergleichen der Subklone schließen, daß Exon 1 und 2 nicht durch ein Intron getrennt ist. Weiterhin konnten die Restriktionsschnittstellen für *Bam* H I, *Eco* R I, *Pst* I, *Pvu* II und *Sac* I innerhalb des porcinen IGF-II-Genes im Bereich des Exon 1 und in der kodierenden Region zugeordnet werden.

3.2.2 Antisense-RNA

Bei anderen Spezies wie dem Huhn und der Maus sind Antisense-RNAs beschrieben^{36,37}. Um der Existenz von Antisense-RNA beim Schwein nachzugehen, wurden Sense-Oligonukleotide zur Hybridisierung des Northern Blots eingesetzt. Dabei konnten mehrere Banden detektiert werden. Ein Sense-Oligonukleotid in Exon 2 liegend (#158) detektierte Banden mit den gleichen Größen (6.0, 4.8 und 1.2 kb) wie das Antisense-Oligonukleotid in Exon 1 (#119) und die cDNA-Sonde, welche das Exon 1 und das Exon 2 beinhaltet (cDNA-Sonde P1) (Abb. 17).

Hybridisierung mit einem Sense-Oligonukleotid (#285), welches homolog zum humanen Exon 4 ist, ergab ähnliche Signale wie das Antisense-Oligonukleotid in Exon 4 (#155). Mehrere RNAs (4.8, 2.2, 1.9, 1.7 und 1.2 kb) wurden nachgewiesen. Allerdings wurde keine RNA mit einer Größe von 6.0 kb detektiert (Abb. 17).

Bei Verwendung eines Sense-Oligonukleotides (#286), welches in Exon 5 liegt, konnte eine 6.0 kb RNA gefunden werden. Zusätzlich waren noch weitere Transkripte (4.8, 2.2, 1.9 und 1.7 kb) nachweisbar (Abb. 17). Im Gegensatz dazu ergab die Hybridisierung mit dem Antisense-Oligonukleotid (#156) ein einzelnes Signal von 4.8 kb (Abb. 13).

Daraus kann man schließen, daß es verschiedene Antisense-RNAs des porcinen IGF-II gibt, welche Größen von 6.0, 4.8, 2.2, 1.9, 1.7 und 1.2 kb haben. All diese mRNAs wurden auch mit cDNA-Sonden (u. a. mit IGF-II / 0.46 ES) nachgewiesen, wobei dabei zu beachten ist, daß man bei einer Northern Blot Analyse mit cDNA-Sonden nicht zwischen einer Hybridisierung mit Sense-mRNA oder Antisense-RNA unterscheiden kann. Weiterhin ist hervorzuheben, daß die 6.0 kb RNA nach Okklusion/Reperfusion induziert ist und ebenfalls Antisense-RNAs von 6.0 kb nachgewiesen wurden.

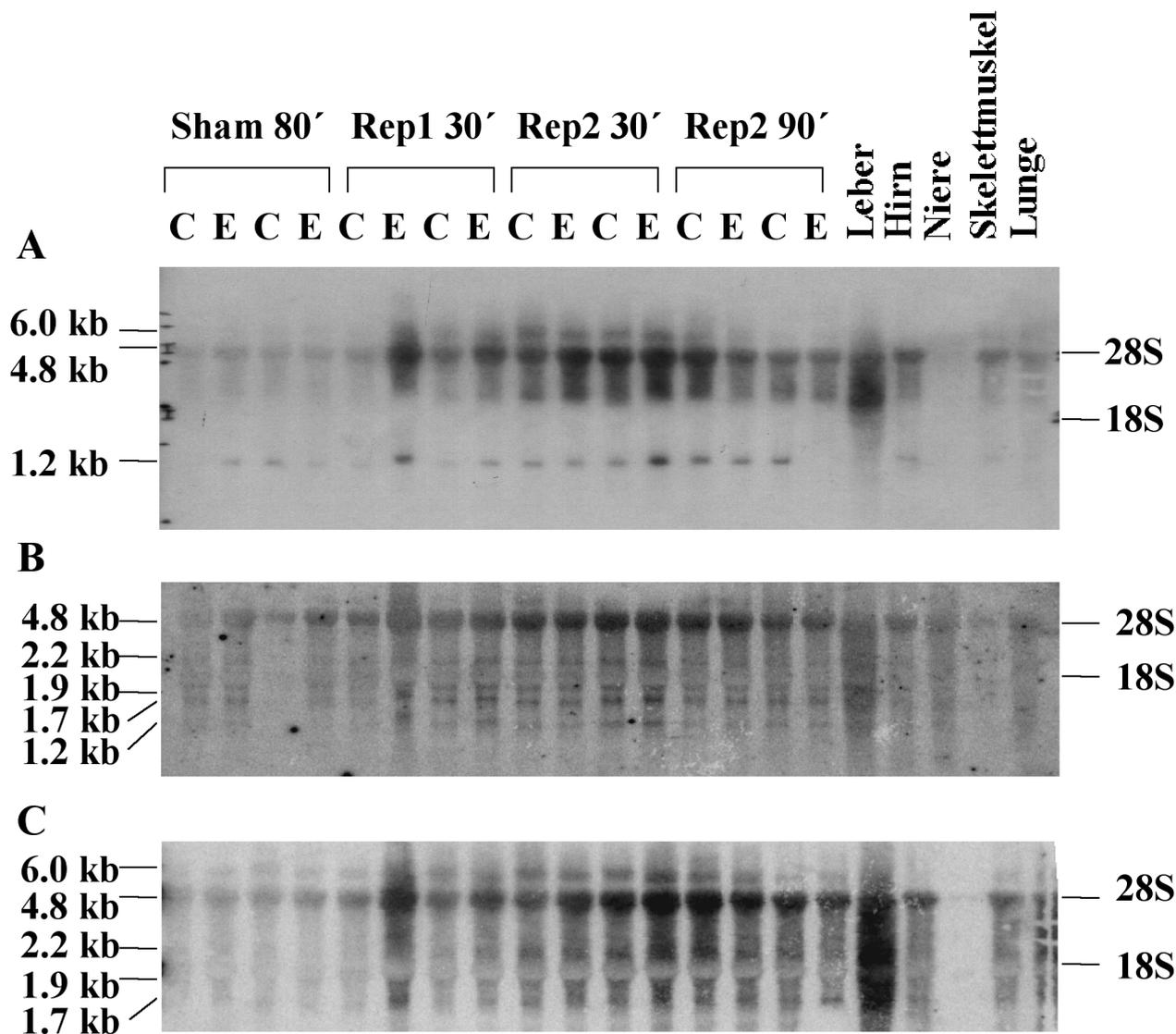


Abb. 17: Detektion von Antisense-RNAs mittels Northern Blot Analyse. 15 µg Gesamt-RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. C: Kontrolle, E: Experiment, das Protokoll der zugehörigen Versuche ist in Material und Methoden beschrieben (s. 2.2.19). Es wurde mit den Sense-Oligonukleotiden #158 (A), #285 (B), #286 (C) hybridisiert.

3.3 Konstruktion IGF-II transgener Mäuse

Transgene Mäuse mit herzspezifischer Überexpression von IGF-II ermöglichen es, die kardioprotektive Funktion des IGF-II²⁶ näher zu betrachten. Mittels Northern Blot Analysen wurde die Expression von IGF-II und H19 untersucht. H19 wurde betrachtet, da es auf dem gleichen Chromosom wie IGF-II liegt, eine inverse Prägung zu IGF-II trägt und gemeinsam mit ihm reguliert wird.

3.3.1 Das Konstrukt

Es wurde ein Konstrukt aus dem MLC2v-Promotor, der IGF-II cDNA (IGF-II/8-1, ATCC Nr. 57482) und dem SV40 – Polyadenylierungssignal in Bluescript als Ursprungsvektor hergestellt (Abb. 18). Der MLC2v-Promotor wurde verwendet, um eine herzspezifische Überexpression des IGF-II zu erzielen¹⁰⁵. Es ergibt sich theoretisch ein Transkript von 1156 bp, welches durch das Polyadenylierungssignal des SV 40 verlängert wird. Für die Überexpression des IGF-II in L6 Zellen wurde die gleiche cDNA verwendet.

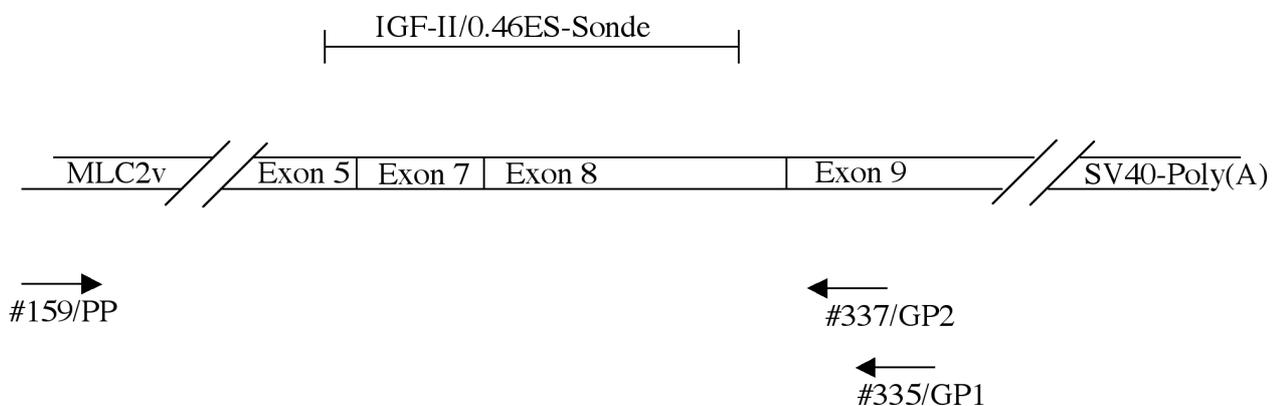


Abb. 18: Konstrukt der IGF-II transgenen Mäuse. Das Konstrukt besteht aus dem MLC2v-Promotor, der IGF-II cDNA (ATCC Nr. 57482) und dem SV40–Polyadenylierungssignal (SV40 Poly(A)) in Bluescript als Ursprungsvektor. Die Lage der verwendeten Oligonukleotide (für PCR) und der cDNA-Sonde IGF-II/0.46ES (für die Hybridisierung) zur Verifizierung des Transgens in den Mäusen sind eingezeichnet (PP, GP1 und GP2).

3.3.2 Mäusestamm

Als genetischer Hintergrund zur Herstellung der IGF-II transgenen Mäuse wurden C57BL/6 verwendet. C57BL/6 ist ein Unterstamm der C57BL-Mäuse. Es handelt sich hierbei um einen Inzuchtstamm, der eine Reproduktionsrate von 5-7 Nachkommen hat.

3.3.3 Herstellung der transgenen Mäuse

Es ist eine Kardioprotektion bei Gabe des IGF-II im Schweine-Modell der Okklusion/Reperfusion beschrieben²⁶. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden IGF-II transgene Mäuse hergestellt, die so konstruiert sind, daß unter Verwendung des MLC2v-Promotors (s. 3.3.1) eine herzspezifische Überexpression des IGF-II entsteht. Die transgenen Mäuse wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Atugen in Berlin hergestellt. Nach der Injektion von 450 Oozyten, konnte allerdings nur ein Founder-Tier, welches für IGF-II transgen ist, gefunden werden. Normalerweise geht man bei der Methode der Mikroinjektion von einer Erfolgsquote von 10-30 % aus. Die Herstellung nur eines Founder-Tieres deutet daher auf einen negativen Effekt der myokardialen Überexpression hin.

3.3.4 Nachweis des Transgens mittels PCR und genomischem Southern Blot

Mittels PCR und Southern Blot Analyse kann das Transgen nachgewiesen werden. Hierzu wurde ein promotorspezifischer Primer (PP, 5'-GCAGGGGCCCGCCAGCAGGCTC-3', Homologie zu Acc. Nr. U26708, Nukleotid 1951-1972) und ein IGF-II spezifischer Primer (GP1, 5'-GATGCTGCTGTGCTTCCTCAGCC-3' oder GP2 5'-GCAGTTTTGCTCACTTCCGATTG-3', beide Oligonukleotide haben Homologie zum humanen Exon 9, Acc. Nr. X03562, Nukleotide 8171-8193 oder 8366-8388) ausgewählt (Abb. 18). Beide Kombinationen wurden mit folgendem Programm auf dem PTC-200 (Biozym) durchgeführt: 94°C 5min; (92°C 20 sec, 55°C 30 sec, 72°C 1 min) 35 Zyklen; 72°C 10 min; 4°C hold. Produkte von 964 bp und 769 bp waren zu erwarten. Mit anschließender Southern Blot Analyse konnte nachgewiesen werden, daß das PCR-Produkt für IGF-II spezifisch ist (Abb. 19). Hierzu wurde die cDNA-Sonde IGF-II/0.46ES-Sonde verwendet, welche innerhalb des PCR-Produktes liegt und nicht mit dem IGF-II-Primer hybridisiert (s. Abb. 18).

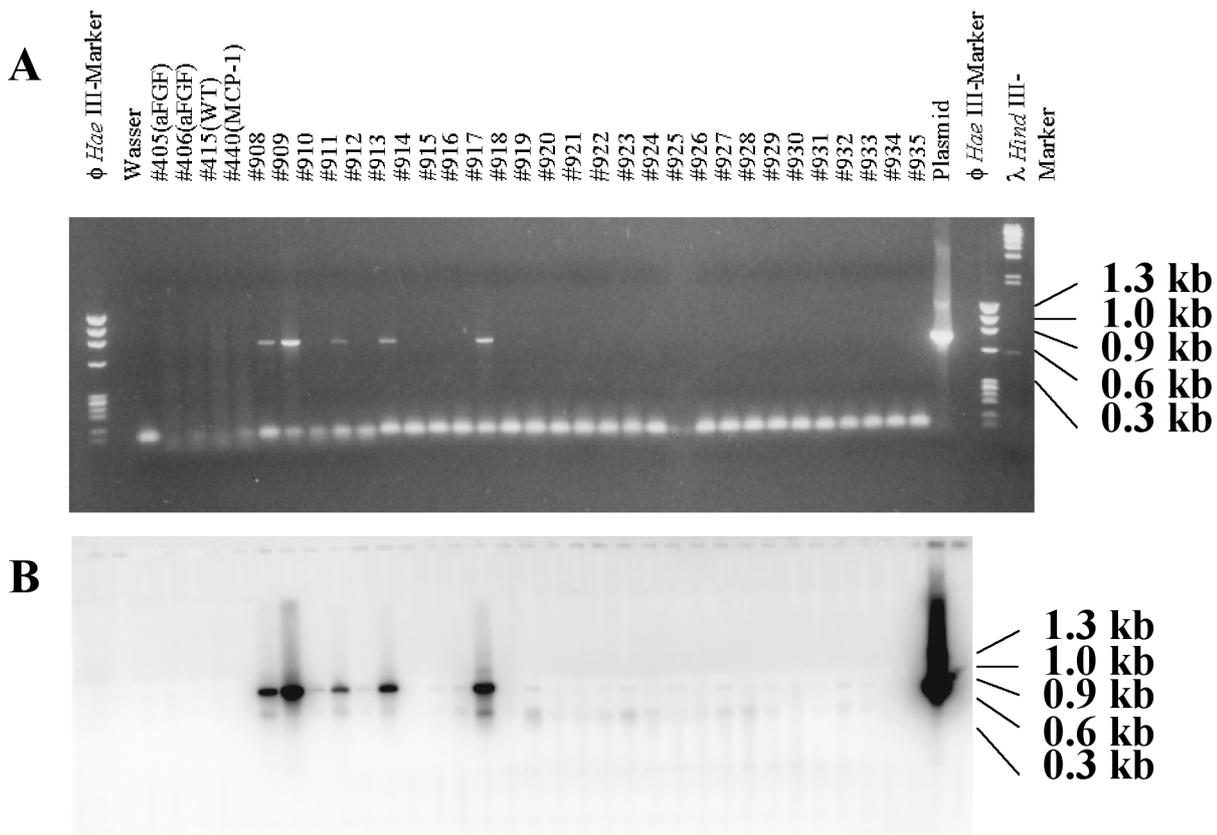


Abb. 19: PCR der transgenen Mäuse und Southern Blot Analyse. Es wurde die in 3.3.4 beschriebene PCR mit den Primern #159 (PP) und #337 (GP2) und anschließend eine Southern Blot Analyse mit der IGF-II/0.46ES-Sonde durchgeführt. A, Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte; geladen sind: Spur 1: phi Hae III-Marker; Spur 2: Wasserkontrolle; Spur 3, 4, 5, 6: Negativkontrolle; Spur 7: #908, Founder-Tier; Spur 8-34: Nachkommen; Spur 35 Konstrukt; Spur 36: phi Hae III-Marker; Spur 37: Lambda Hind III-Marker. B, Southern Blot wurde mit IGF-II/0.46ES-Sonde hybridisiert; phi Hae III-Marker ist angezeichnet.

3.3.5 Expressionsuntersuchungen des Transgens auf mRNA-Ebene

Auf mRNA-Ebene sollte nun überprüft werden, ob das Konstrukt transkribiert wird. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus dem Herzen, dem Skelettmuskel und der Leber isoliert. Der Skelettmuskel wurde als Vergleich zum Herzmuskel und die Leber als starker Syntheseort der IGFs und des Insulins hinzugenommen. Das IGF-II-Transgen wurde ausschließlich im Herzen der transgenen Mäuse transkribiert. In Abb. 20 ist die Northern Blot Hybridisierung mit der IGF-II/0.46ES-cDNA-Sonde dargestellt und die etwa 2 kb mRNA des IGF-II-Transgens zu erkennen. Die Expression des IGF-II Transgens im Herzen entspricht den Erwartungen, da der

MLC2v-Promotor nur im Ventrikel aktiv ist. Man findet neben dem Signal des Transgens auch eine schwache Kreuzhybridisierung mit 18S rRNA in allen Spuren.

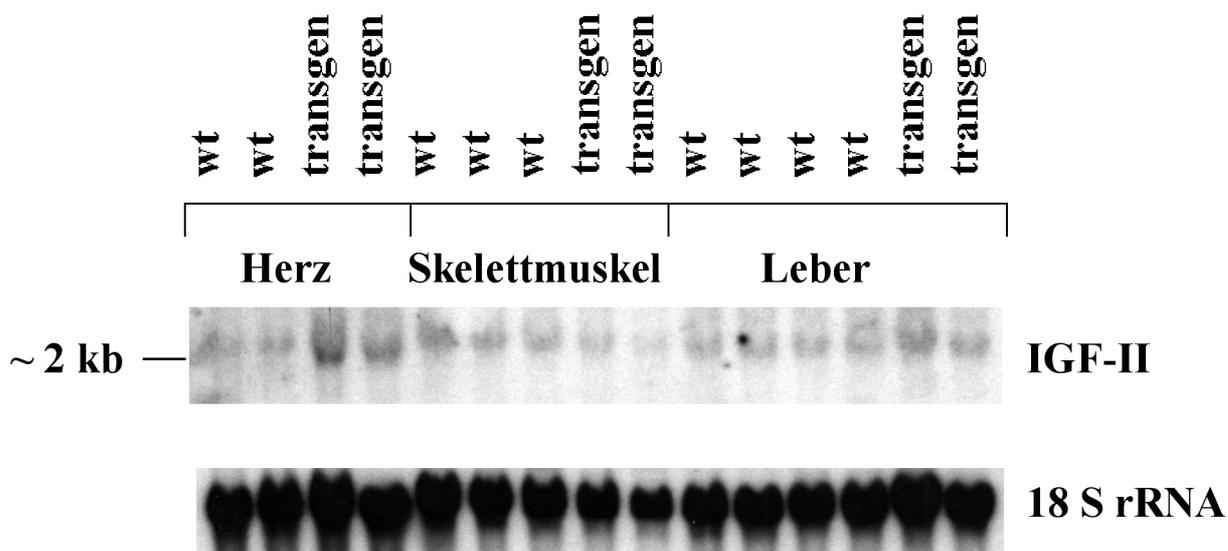


Abb. 20: Northern Blot Analyse zur Überprüfung der herzspezifischen Expression des Transgens. 15 µg RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt und per Kapillarblot auf eine Nylonmembran transferiert. Der Northern Blot wurde mit IGF-II/0.46ES-cDNA-Sonde und mit 18S-Oligonukleotid hybridisiert. Aufgetragen sind: Spur 1-4: Herz, Spur 5-9: Skelettmuskel, Spur 10-15: Leber, Spur 1, 2, 5-7, 10-13: WT, Spur 3, 4, 8, 9, 14, 15: IGF-II transgene Mäuse.

3.3.6 Expression des H19-Gens in IGF-II transgenen Mäusen

Hinsichtlich der komplexen Regulation des IGF-II durch Antisense-RNA und der genomischen Prägung, sollte auch die Expression des H19 Gens, das 3' des IGF-II liegt, analysiert werden.

Im Erwachsenenalter wird H19 nur in Skelett – und Herzmuskelzellen transkribiert. Dies legt eine weitergehende Untersuchung über die Bedeutung und Expression des Gens nahe. Es wurden Northern Blot Analysen mit Sense- und Antisense-Oligonukleotiden durchgeführt. Unter Verwendung des Antisense-Oligonukleotides # 352 homolog zu H19 konnte eine Sense-mRNA von ungefähr 1.8 kb detektiert werden. Diese mRNA wurde in erster Linie im Herzen gefunden und konnte schwach im Skelettmuskel nachgewiesen werden. Weiterhin wurde mit einem Sense-Oligonukleotid (# 351) homolog zu H19 eine Antisense-RNA von etwa 2 kb detektiert, die im Herzen, Skelettmuskel und Leber zu finden war. Zusätzlich wurde nur im Herzen eine Antisense-RNA von 0.9 kb nachgewiesen (Abb. 21).

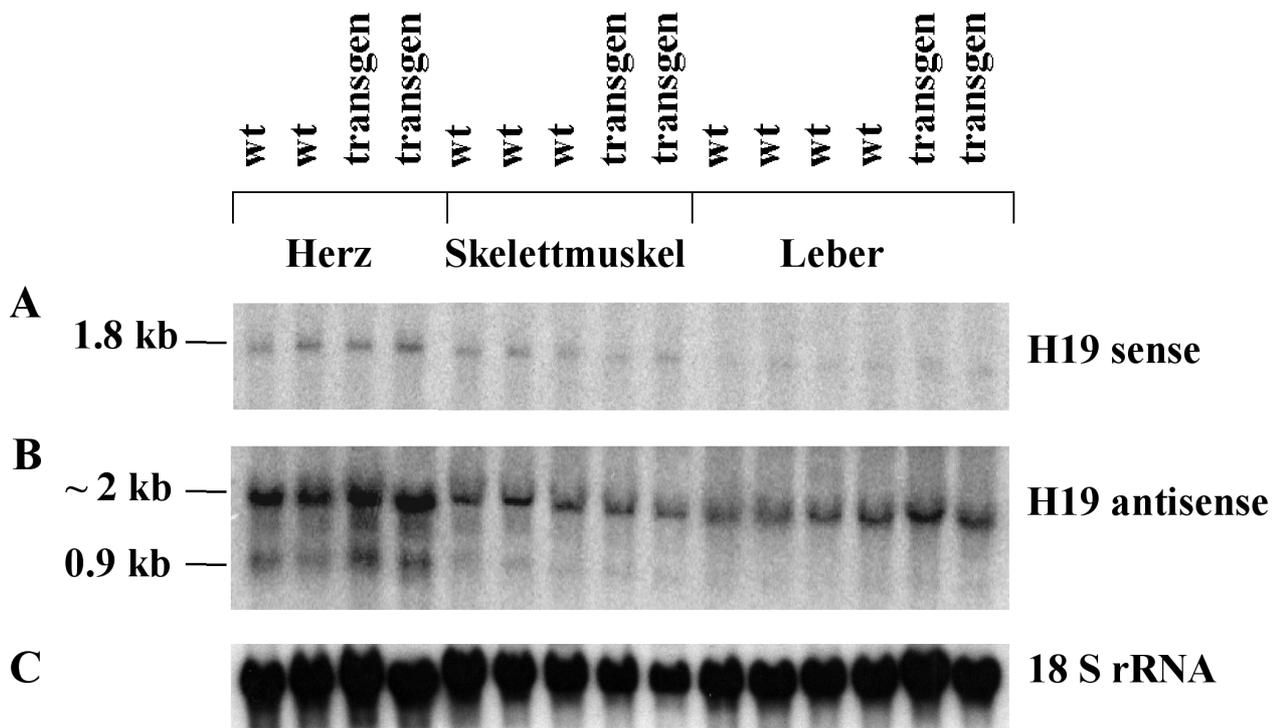


Abb. 21: H19 Expression in IGF-II transgenen Mäusen. Northern Blot Analyse wurde mit 15 µg RNA durchgeführt. Es wurde mit H19-Antisense-Oligonukleotid #352(A) und mit dem Sense-Oligonukleotid #351(B), als auch mit dem 18S-Oligonukleotid hybridisiert (C). Positionen der 18S und 18S rRNAs sind gekennzeichnet. Aufgetragen sind: Spur 1-4: Herz, Spur 5-9: Skelettmuskel, Spur 10-15: Leber, Spur 1, 2, 5-7, 10-13: WT, Spur 3, 4, 8, 9, 14, 15: IGF-II transgene Mäuse (entsprechend dem Northern Blot aus Abb. 20).

3.3.7 Analyse der Paarung (Anzahl der Nachkommen)

Um einen transgenen Mäusestamm zu etablieren, muß dieser weitergezüchtet werden. Dies stellte sich bei den IGF-II transgenen Mäusen als komplizierter heraus als erwartet. Nur ein weibliches Founder-Tier stand nach 450 Injektionen zu Verfügung. Daher ist ein Vergleichen mehrerer Linien nicht möglich. Bei der einen zu Verfügung stehenden Linie war es auffällig, daß sie eine geringe Anzahl an Nachkommen hervorbrachte; pro Wurf lag sie maximal bei vier Jungtieren (im Vergleich zu 5-7 oder auch bis zu 9 Jungtieren beim WT). Oft wurden die Nachkommen resorbiert. Bei den nachstehenden Paarungen gab es folgende Überlebensrate der Jungtiere.

Paarungstabelle:

WT-Weibchen	transgenes Weibchen	WT-Männchen	transgenes Männchen	Nachkommen
	00-820	00-826		resorbierte Embryonen
	00-828	00-830		resorbierte Embryonen
00-841			00-847	4 Embryonen
	00-840	00-826		1 Embryo, 1 kleinerer Embryo und resorbierter Embryo*
	01-004	00-848		2 Embryonen
	00-829	00-830		Beginn der Resorption an Tag 13

* *Ein Embryo war kleiner als der andere (um 3 Tage in der Entwicklung zurück). Hervortretende Adern und eine glänzende Haut wurden festgestellt. Eine Art Bluterguß oder Blutung trat auf. Der Embryo schien hämorrhagisch.*

Aus der Tabelle wird deutlich, daß die gesamte Nachkommenzahl der IGF-II transgenen Tiere geringer war als bei den WT-Tieren üblich. Weiterhin kann man daran erkennen, daß mit der Mutter als Trägerin die Nachkommenzahl besonders gering war und die Embryonen wohl z. T. resorbiert wurden. Auf Grund dieser Problematik wogen wir die Tiere bei der Paarung und beobachteten ihr Verhalten hinsichtlich des Nestbaus. Normale Gewichtsschwankung zwischen zwei Tagen lag bei max. 0.9 g. Gewichtszunahme über 1 g war somit Hinweis auf Gravidität. Die Gewichtszunahme begann ab Tag 8-10 (nach Plaquebestimmung). Die tragenden Mäuse wogen an Tag 11 mind. 1 g mehr als ihr Durchschnittsgewicht. Bei Resorption des Embryos war eine Stagnation des Gewichtes ab Tag 13 und anschließend ein Gewichtsverlust zu erkennen. Alle tragenden Tiere hatten ein Nest. Bei Resorption war allerdings kein Nestbau mehr zu erkennen (Abb. 22). Die transgenen Mäuse konnten bisher bis in die vierte Generation weitergezüchtet werden. Allerdings war es nicht möglich homozygote Tiere zu züchten, da es bei Paarung zweier heterozygoter Tiere keine Nachkommen gab.

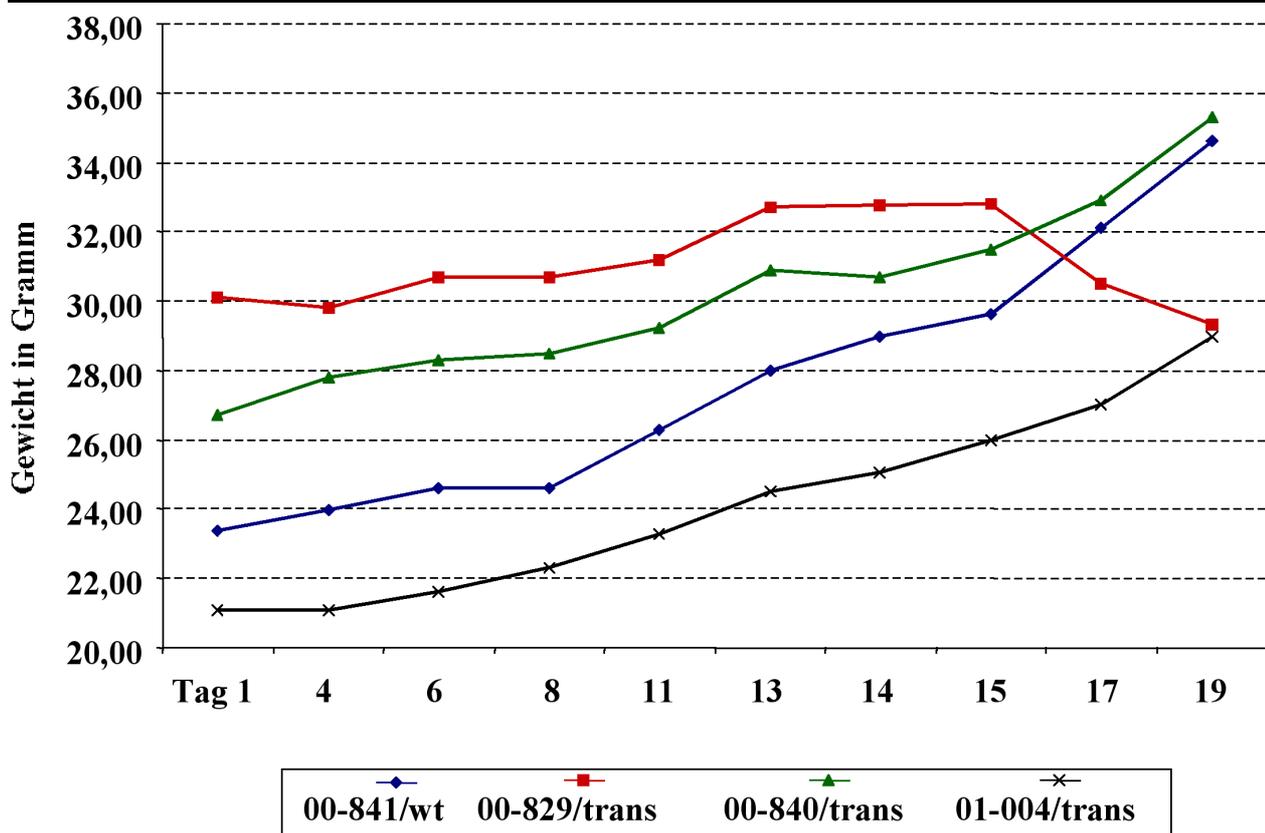


Abb. 22: Gewichtsverlauf bei tragenden transgenen und WT Mäusen. Die gepaarten Mäuse wurden jeden zweiten Tag gewogen. Bei der transgenen Maus 00-829 ist ab Tag 13 keine Gewichtszunahme mehr zu erkennen; das Gewicht reduzierte sich ab Tag 15.

Da es zum Einen nicht möglich war, mehrere Linien IGF-II transgener Mäuse herzustellen und zum Anderen lediglich heterozygote Tiere mit geringer Nachkommenzahl gezüchtet werden konnten, kann man aus diesen Resultaten schließen, daß IGF-II pränatal lethal ist.

3.4 Transfektion des humanen IGF-II in Myoblasten

Neben den *in vivo* Untersuchungen mit den IGF-II transgenen Mäusen sollte IGF-II für *in vitro* Versuche in Myoblasten überexprimiert werden, um einen Einblick in die Regulation des IGF-II in diesen Myoblasten zu bekommen. Es wurde die gleiche cDNA wie bei den transgenen Mäusen verwendet. Neben den Expressionsuntersuchungen des IGF-II wurden auch die anderen Mitglieder der IGF-Familie betrachtet.

3.4.1 Das Konstrukt

Humane IGF-II-cDNA (IGF-II/8-1), die sich über den 3' Bereich des Exon 5, Exon 7, Exon 8 und den 5' Bereich des Exon 9 erstreckt und auch für die Herstellung der transgenen Mäuse verwendet wurde, sollte in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert werden. Hierzu wurde pEGFP-C1 (Clontech) verwendet, da dadurch eine direkte Betrachtung an den lebenden Zellen nach der Transfektion möglich ist. Die IGF-II-cDNA wurde in die *Eco* R I-Schnittstelle (bei 1352 bp) in der MCS kloniert (Abb. 23).

Dadurch wurde der Leserahmen verschoben. Mit *Hind* III mußte restringiert und mit Klenow-Polymerase das überstehende Ende (s. 2.2.8) aufgefüllt werden. Mittels Restriktionsanalyse wurde die Orientierung des Inserts und das Verschwinden der *Hind* III- Schnittstelle und damit das Entstehen einer *Nhe* I-Schnittstelle ermöglicht. Die Sequenzierung bestätigte das Ergebnis (Abb. 23).

3.4.2 Transfektion von pEGFP-C1 in L6 Myoblasten

pEGFP-C1 wurde mittels FugeneTM6 mit einer Effizienz von 5-15 % in die L6-Myoblasten transfiziert. Die Fluoreszenz war nach 24 h sichtbar und konnte 3-4 Tage in den lebenden Zellen beobachtet werden, nach mehreren Passagen wurde sie schwächer und konnte im inversen Fluoreszenzmikroskop nicht mehr nachgewiesen werden. Dennoch war es möglich, nach Anziehen der Zellen auf Objektträger, die Fluoreszenz in einem lichtstärkeren Mikroskop oder mittels konfokalem Mikroskop zu bestätigen. Weiterhin konnte festgestellt werden, daß sich mit zunehmender Passagezahl die Transfektionseffizienz verringerte.

3.4.3 Transfektion der L6 Zellen mit pEGFP/IGF-II

Wurde das Konstrukt bestehend aus pEGFP-C1 und IGF-II (pEGFP/IGF-II) eingesetzt, konnte eine Effizienz der Transfektion von ca. 3 % erreicht werden. Dieser Prozentsatz ist für eine Analyse der transient transfizierten Zellen zu gering. Die Etablierung einer stabil transfizierten Zelllinie war notwendig.

A

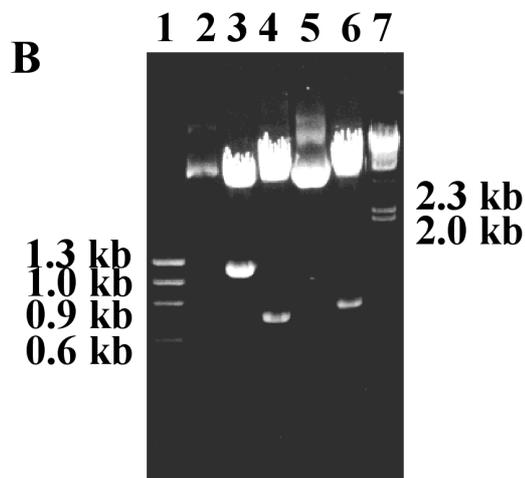
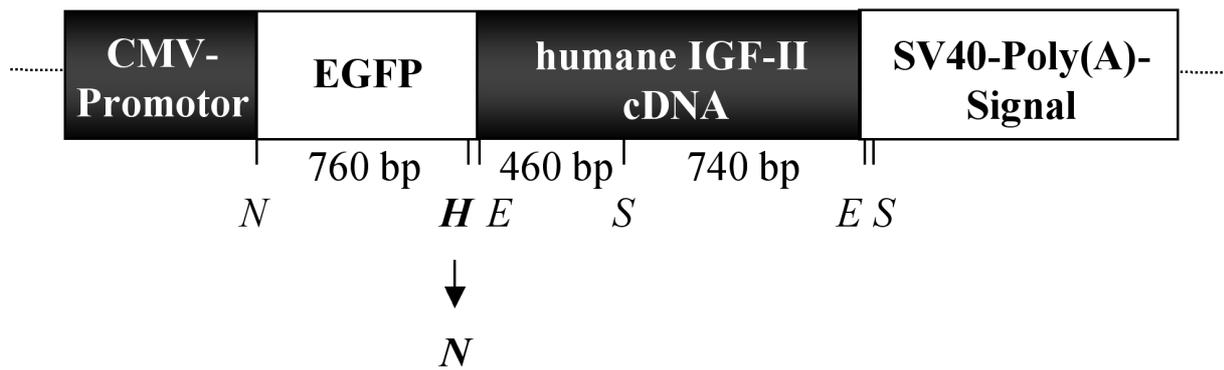


Abb. 23: pEGFP/IGF-II Konstrukt und Überprüfung der Klonierung. IGF-II/8-1 cDNA wurde in den pEGFP-Vektor (Clontech) in die Eco R I-Schnittstelle kloniert. Um den Leserahmen zu erhalten, mußte das Konstrukt mit Hind III (bei 1352 bp) geschnitten und aufgefüllt werden. Nach der Religation entstand daher eine neue Nhe I Schnittstelle zu der bereits vorhandenen Nhe I Schnittstelle bei 592 bp. Mittels Restriktionsanalyse wurde diese bestätigt. Zusätzlich wurde die Plasmid-DNA mit Sal I restringiert, um eine Aussage über die Orientierung zu treffen. A, Konstrukt bestehend aus CMV-Promotor, EGFP, humaner IGF-II cDNA und SV40 Poly(A)-Signal. Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet, wobei E für Eco R I, S für Sal I, H für Hind III und N für Nhe I steht. B, Elektrophoretische Auftrennung der restringierten Plasmid-DNA. Spur 1: phi Hae III-Marker, Spur 2: unverdautes Plasmid, Spur 3: Eco R I, Spur 4: Sal I, Spur 5: Hind III, Spur 6: Nhe I, Spur 7: lambda Hind III-Marker.

3.4.4 Selektion stabil transfizierter Zellen

Zur Selektion der transfizierten L6 Myoblasten wurden sie Geneticin (G418, 400 mg/ml) ausgesetzt. Es können nur die Zellen überleben, die ein Resistenzgen gegen G418 (Neomycin Resistenz Kasette, bestehend aus SV40 early Promotor, Neomycin / Kanamycin Resistenz Gen von Tn5 und Polyadenylierungssignal von Herpes simplex virus thymidine kinase (HSV TK) Gen) besitzen, welches auf dem pEGFP-C1-Plasmid kodiert ist. Resistente Zellen wurden vereinzelt und Klone, die das Konstrukt transkribierten, wurden mittels Northern Blot gesucht.

3.4.5 Expression der Konstrukte

Zur Analyse der Expression wurde zum Einen eine Northern Blot Analyse und zum Anderen Western Blot durchgeführt. Mit der Northern Blot Analyse sollte getestet werden, ob das Konstrukt transkribiert wird und sie ermöglichte die Identifizierung der stabil transfizierten Zellen. Auch das Protein sollte untersucht werden. Mittels Western Blot Analyse sollten die Zellen auf die Expression des endogenen und des exogenen IGF-II getestet werden. Da IGF-II sekretiert wird, war auch der Zellüberstand zu testen.

3.4.5.1 Transkription der Konstrukte

Um feststellen zu können, ob das Konstrukt richtig transkribiert wird, wurde Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und eine Northern Blot Analyse durchgeführt. Als Sonden wurden die humane cDNA-Sonde (IGF-II/0.46ES), welche das IGF-II-Insert in verkürzter Form enthält und eine EGFP-cDNA-Sonde verwendet. Es war bei den mit pEGFP/IGF-II transfizierten Zellen eine mRNA von 2.1 kb zu erwarten. Die pEGFP transfizierten Zellen sollten eine mRNA von 1 kb transkribieren (Abb. 24).

Wurde die IGF-II/0.46ES-Sonde bei der Northern Blot Analyse eingesetzt, erhielt man bei den nicht transfizierten L6 Myoblasten ein starkes Signal bei 4.8 kb, welches für IGF-II spezifisch ist. Bei den mit pEGFP/IGF-II transfizierten Zellen war eine mRNA von 2.1 kb bei Verwendung der IGF-II- oder der pEGFP-Sonde zu erwarten, welche auch detektiert wurde (Abb. 24). Weder in den untransfizierten noch in den pEGFP transfizierten Zellen war diese Bande zu finden. Es handelt sich hierbei um die mRNA, die von dem transfizierten pEGFP/IGF-II-Konstrukt

transkribiert wird. Mit der IGF-II-Sonde (IGF-II/0.46ES) konnte auch die endogene IGF-II-mRNA von 4.8 kb in diesen Zellen nachgewiesen werden. Im Falle der pEGFP transfizierten Zellen ist die 4.8 kb mRNA des IGF-II runterreguliert und nicht oder kaum zu detektieren (Abb. 24).

Bei Verwendung der Sonde gegen das EGFP konnte in den pEGFP/IGF-II transfizierten Zellen wie mit der IGF-II/0.46ES-Sonde die 2.1 kb mRNA detektiert werden und in den pEGFP transfizierten Zellen hybridisierte die EGFP-Sonde mit einer mRNA von 1 kb (Abb. 24).

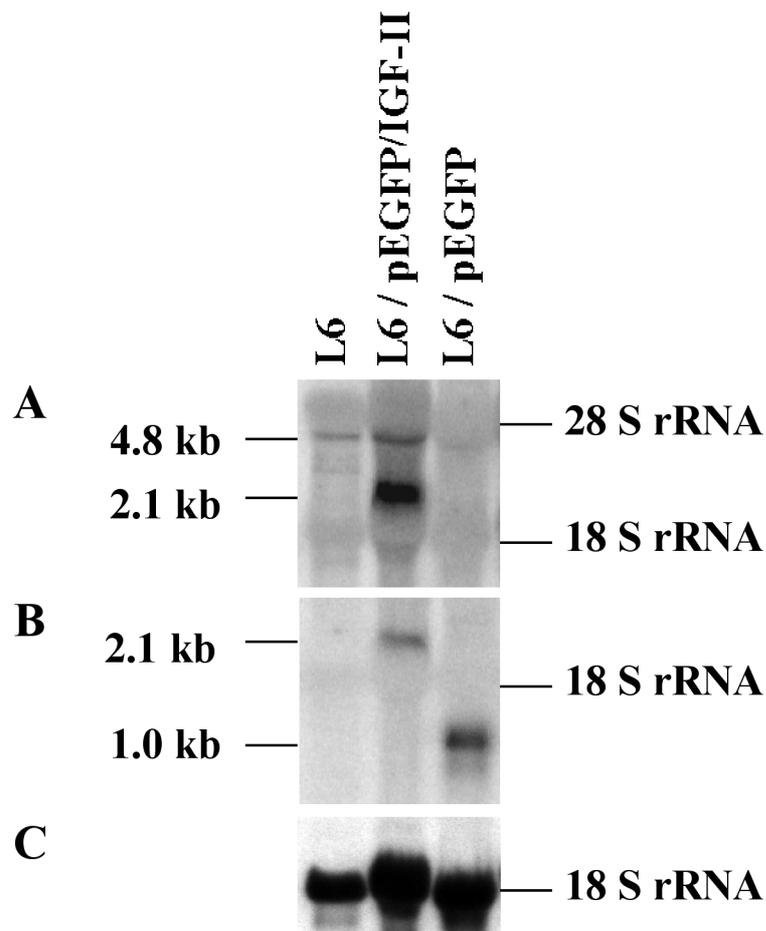


Abb. 24: Northern Blot Analyse zur Überprüfung der Transkription der transfizierten Konstrukte in L6 Zellen. 15 µg Gesamt-RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Es wurde mit einer cDNA-Sonde (IGF-II/0.46ES) gegen den kodierenden Bereich des humanen IGF-II hybridisiert (A). Ebenso wurde eine Sonde gegen EGFP eingesetzt (B) und mit 18S-Oligonukleotid die 18S rRNA detektiert (C). Geladen wurden in Spur 1: L6; Spur 2: L6/pEGFP/IGF-II; Spur 3: L6/pEGFP.

3.4.5.2 Translation der Konstrukte

Neben der Analyse der mRNA wurde auch ihre Translation per Western Blot Analyse untersucht. Proteine aus den Zellen, die für 2 Tage serumfrei gesetzt waren, und die Proteine aus dem zugehörigen Medium wurden gewonnen. Den Zellen mußte Serum entzogen werden, da es zu einem großen Teil aus Proteinen besteht und daher ebenfalls IGF-II enthält, was das Ergebnis verfälschen würde.

EGFP konnte in den Zellen nachgewiesen werden, die mit pEGFP oder mit pEGFP/IGF-II transfiziert wurden. Es wurden Banden im Größenbereich von 30-35 kD detektiert. Dies entsprach den Erwartungen, da IGF-II 7.5 kD und pEGFP 27-29 kD (nach Angaben von Clontech) groß sind (Abb. 25 A, B).

In den pEGFP/IGF-II transfizierten Zellen wurde mit den IGF-II und EGFP Antikörpern eine Bande bei etwa 30-35 kD sichtbar; dies entspricht der Expression des Konstruktes. Die Expression des endogenen IGF-II in den pEGFP/IGF-II transfizierten Zellen war im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen auf 8 % ($p < 0.001$) reduziert. In den pEGFP transfizierten Zellen war kein IGF-II zu detektieren. Als Referenz wurde das Haushaltsgen GAPDH eingesetzt (Abb. 25 C), da seine Expression mit der Ponceau S Färbung, entsprechend der Beladung des Proteingels, vergleichbar war. Statistische Analyse ist im Säulendiagramm in Abb. 25 D veranschaulicht.

IGF-II konnte in den nicht transfizierten Zellen sowohl im Überstand als auch in den Zellen selbst detektiert werden (Abb. 25 A und 26 A). Western Blot Analyse mit den Proteinen aus den Zellen ergab eine Bande von ca. 19 kD mit dem IGF-II Antikörper. Damit wurde das endogene IGF-II detektiert.

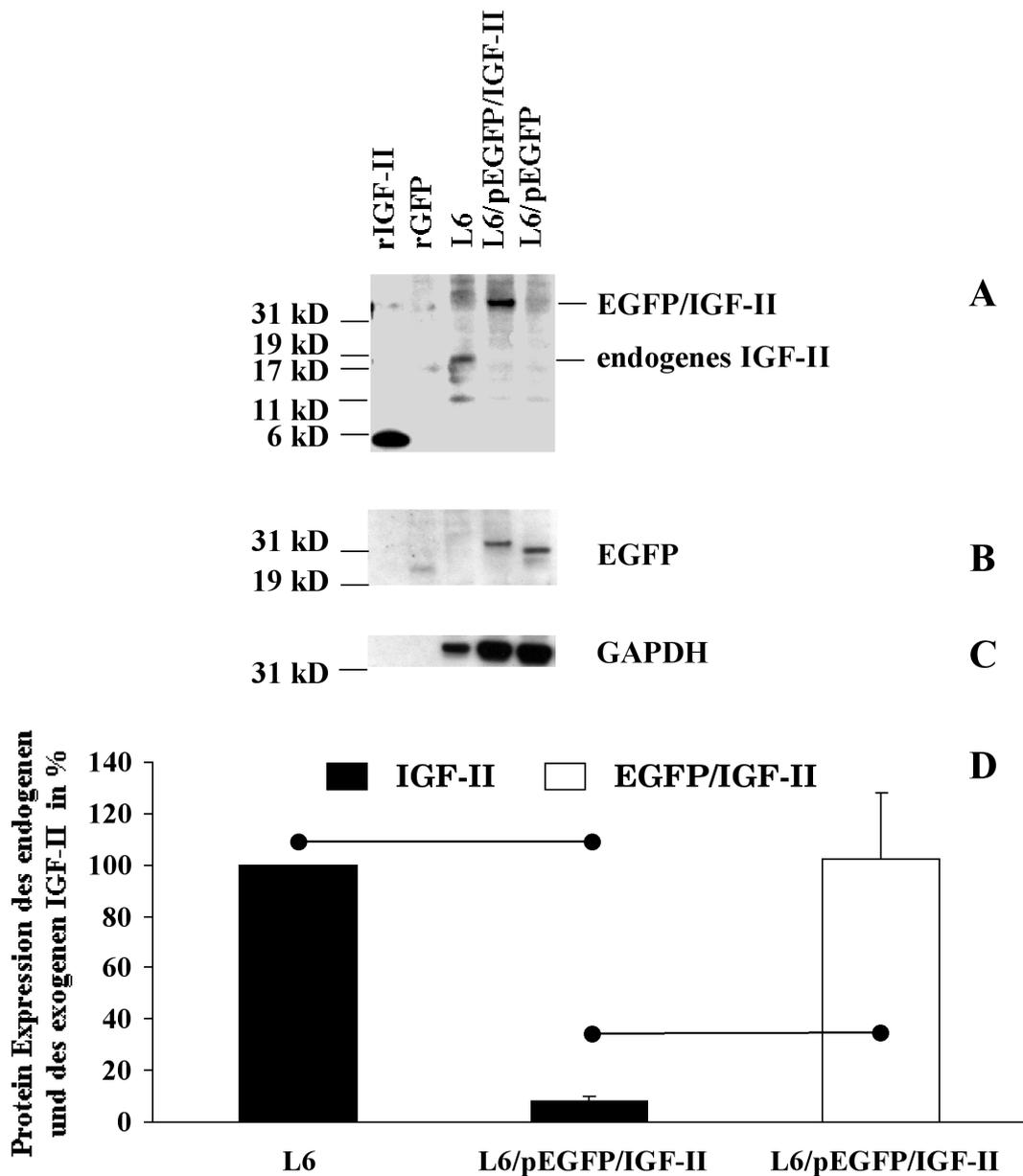


Abb. 25: Western Blot Analyse des IGF-II in den Zellen. Proteine wurden aus transfizierten und nicht transfizierten L6 Zellen nach 2 Tagen Serumentzug isoliert und ein nicht reduzierendes 4-12 % Bis/Tris-Gel (Invitrogen) gefahren. **A**, Monoklonaler Antikörper (AK) gegen humanes IGF-II wurde als erster AK verwendet. Anschließend wurde bei allen Detektionen ein zweiter AK gegen Maus (gekoppelt mit HRP) für die Western Blot Analyse eingesetzt und mit dem ECL-Kit (Amersham) detektiert. **B**, monoklonaler AK gegen GFP; **C**, monoklonaler GAPDH-AK wurde zum Abgleichen der Ladungsunterschiede eingesetzt, zusätzlich wurde diese Normierung mit der Ponceau S Färbung verglichen, die den GAPDH-Werten entsprach. Geladen wurde in Spur 1: 100 ng rIGF-II; Spur 2: 50 ng rGFP; Spur 3: L6 Zellen; Spur 4: pEGFP/IGF-II transfizierte Zellen; Spur 5: pEGFP transfizierte Zellen. **D**, Säulendiagramm zur Darstellung der IGF-II Expression auf Proteinebene. Neben der Expression des endogenen IGF-II (schwarz) ist auch die des exogenen EGFP/IGF-II in den weißen Säulen im Vergleich zu sehen. Ergebnisse sind in Mittelwerten \pm SEM aufgeführt. Statistische Unterschiede ($p < 0.001$) zwischen den Untersuchungen sind mit punktförmig endenden Verbindungslinien gekennzeichnet.

Im Überstand konnten bei den nicht transfizierten Zellen unter Verwendung des IGF-II Antikörpers mehrere Isoformen des IGF-II in einem Größenbereich von 7.5 und 20 kD detektiert werden (Abb. 26 A). Im Überstand der pEGFP/IGF-II transfizierten Zellen lag die Proteingröße des endogenen IGF-II hauptsächlich bei 11 kD, ein schwächeres Signal war bei 19 kD zu finden. Im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen war es auf 10 % ($p < 0.001$) reduziert. Hierbei wurde Ponceau S Färbung als Referenz für die Beladung des Gels verwendet (Statistische Analyse ist im Säulendiagramm in Abb. 26 B dargestellt).

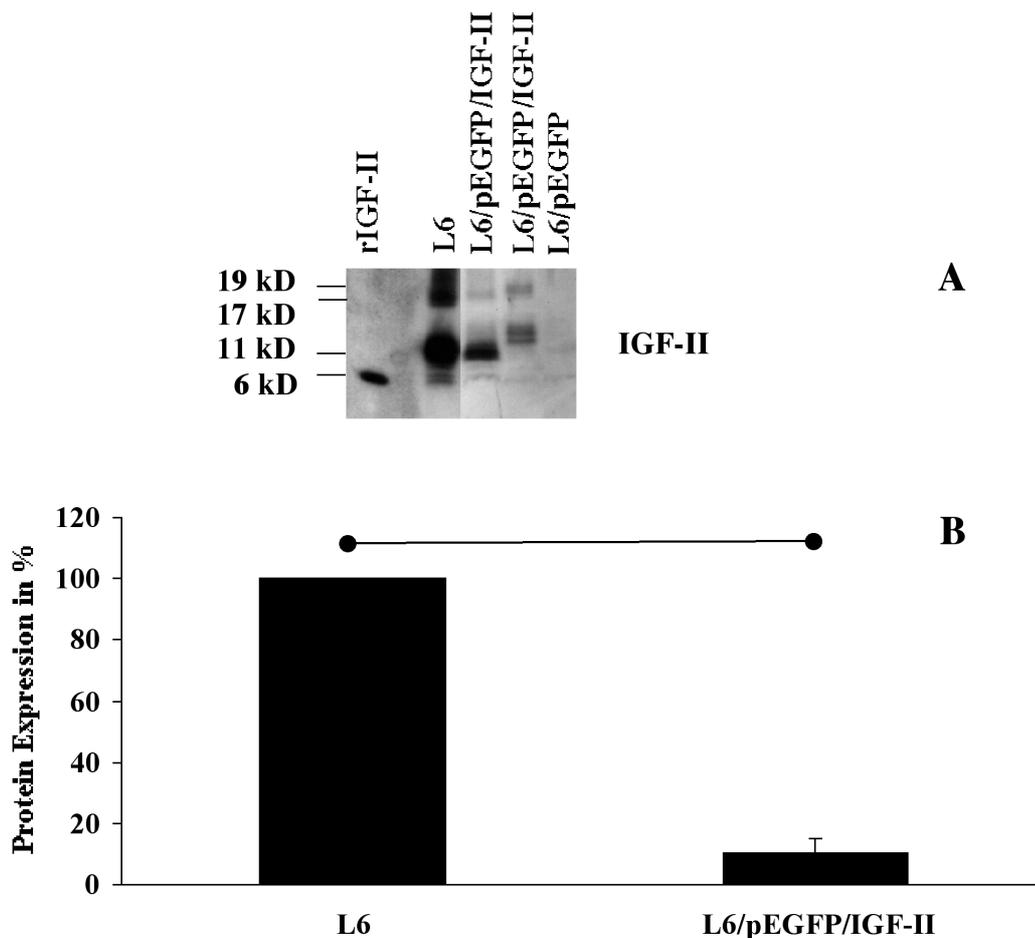


Abb. 26: Western Blot Analyse des Überstandes. Proteine wurden aus den Überständen transfizierter und nicht transfizierter L6 Zellen nach 2 Tagen Serumentzug isoliert und unter nicht reduzierenden Bedingungen über ein 4-12 % Bis/Tris-Gel aufgetrennt. **A**, Monoklonaler AK gegen humanes IGF-II, zweiter AK gegen Maus (HRP gekoppelt) wurden in der Western Blot Analyse eingesetzt, mit dem ECL-Kit (Amersham) wurde detektiert. Geladen wurde in Spur 1: 100 ng rIGF-II; Spur 2: L6 Zellen; Spur 3: pEGFP/IGF-II transfizierte Zellen; Spur 4: pEGFP/IGF-II transfizierte Zellen; Spur 5: pEGFP transfizierte Zellen. Ponceau S Färbung wurde zum Normieren verwendet. **B**, Säulendiagramm stellt die Expression des sekretierten IGF-II dar. Ergebnisse sind in Mittelwerten \pm SEM aufgeführt. Statistische Unterschiede ($p < 0.001$) zwischen den Untersuchungen sind mit punktförmig endenden Verbindungslinien gekennzeichnet.

3.4.6 Lokalisierung des fluoreszierenden Proteins in der Zelle

Neben der Western Blot Analyse wurden die Proteine auch direkt in den Zellen lokalisiert. EGFP kann in lebenden Zellen mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Hierzu wird ein Blaufilter verwendet, der das Protein bei 488 nm anregt, um die Fluoreszenz bei 507 nm im grünen Bereich sichtbar zu machen. pEGFP transfizierte Zellen und nicht transfizierte Zellen wurden betrachtet. Das EGFP ist in der gesamten Zelle zu finden (Abb. 27 B), nicht transfizierte Zellen zeigen zwar eine Eigenfluoreszenz, es können aber eindeutig transfizierte von nicht transfizierten Zellen unterschieden werden. In pEGFP/IGF-II transfizierten L6 Myoblasten wurde das Signal vornehmlich im Nukleus gefunden, wie es in den transient oder stabil transfizierten Zellen zu sehen ist (Abb. 27 A).

Die Fluoreszenz konnte 3-4 Tage in den lebenden Zellen beobachtet werden, wurde allerdings nach mehreren Passagen schwächer und konnte im inversen Fluoreszenzmikroskop nicht mehr nachgewiesen werden. Jedoch war es möglich, durch Anziehen der Zellen auf Objektträger, die Fluoreszenz in einem lichtstärkeren Mikroskop oder mittels konfokalem Mikroskop zu bestätigen. Es zeigte sich, daß nicht alle Zellen zum gleichen Zeitpunkt das Protein exprimierten.

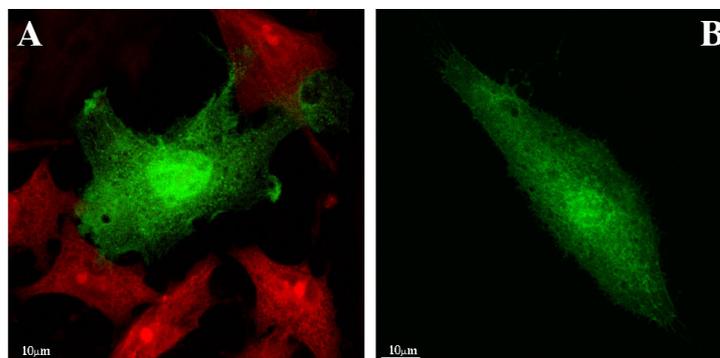


Abb. 27: Lokalisierung der fluoreszierenden Proteine in L6 Zellen. Zellen wurden auf Objektträgern kultiviert und mit blauer Fluoreszenz (488 nm) betrachtet. **A**, L6 Myoblasten mit pEGFP/IGF-II transfiziert, die grüne Fluoreszenz (507 nm) ist hauptsächlich im Kern zu finden; **B**, L6 Myoblasten mit pEGFP-C1 transfiziert, die Fluoreszenz verteilt sich über die gesamte Zelle.

3.4.7 Morphologie transfizierter L6 Myoblasten und ihr Differenzierungsverhalten

L6 Myoblasten, die mit dem humanem pEGFP/IGF-II oder pEGFP transfiziert wurden, wurden auch morphologisch untersucht, um eventuelle Einflüsse der Überexpression des IGF-II auf die Zellstruktur zu charakterisieren. Auch die Differenzierungsfähigkeit der Zellen durch Serumentzug sollte betrachtet werden, da bekannt ist, daß IGF-II in der Differenzierung der Myoblasten zu Myotuben eine Rolle spielt.

L6 Myoblasten haben normalerweise eine spindelförmige, längliche Struktur, welche für Skelettmuskelzellen typisch ist (Abb. 28 A). Mit pEGFP/IGF-II transient transfizierte L6 Myoblasten konnten morphologisch kaum von nicht transfizierten Zellen unterschieden werden. Allerdings wurde ein Unterschied in der Zellstruktur der pEGFP/IGF-II stabil transfizierten Zellen deutlich. Sie waren abgerundeter und breiteten sich eher in alle Richtungen aus. Die transfizierten Zellen waren um 30 % größer als die nicht transfizierten L6 Myoblasten ($p < 0.001$). Die Längsachse der Zellen war unverändert, allerdings waren sie in der Querachse um 50 % breiter ($p < 0.001$) (Abb. 28 B). Dies wurde mit dem NIH-Image-Programm ausgewertet.

Mit pEGFP transfizierte Zellen waren rundlich und wesentlich kleiner als nicht transfizierte L6 Zellen. Sie hatten keine Ähnlichkeit mehr mit ihnen. Das Zytoskelett schien verändert und um/unorganisiert und sie wiesen nekrotische Symptome auf (Abb. 28 C). Apoptose wurde mittels DNA-Laddering untersucht, konnte aber nicht festgestellt werden.

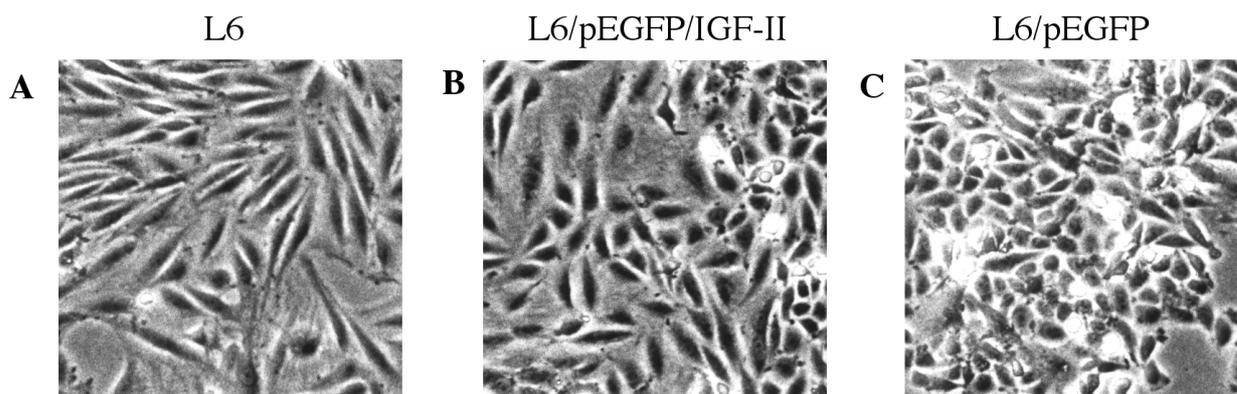


Abb. 28: Transfizierte Zellen während der Proliferation. A, L6 Myoblasten; B, pEGFP/IGF-II transfizierte L6 Myoblasten; C, pEGFP transfizierte L6 Zellen; alle Phasenkontrastbilder wurden mit 100 x facher Vergrößerung aufgenommen.

Weiterhin wurde die Differenzierung der nicht transfizierten und der transfizierten L6 Zellen untersucht. Hierzu wurde den Zellen für eine Woche das Serum entzogen. L6 Zellen, die nicht transfiziert wurden, zeigten nach dieser Woche Serumentzug Myotubenbildung (Abb. 29 A). Die pEGFP/IGF-II transfizierten Zellen zeigten kaum oder keine Myotubenbildung. Im Gegenteil, sie starben teilweise ab und die überlebenden Zellen wuchsen wie während der Proliferation unter Serumgabe weiter (Abb. 29 B). pEGFP transfizierte Zellen wiesen keine Myotuben auf (Abb. 29 C). IGF-II hat im Gegensatz zu seiner kardioprotektiven Wirkung im infarzierten Herzen keine positive Wirkung bei Überexpression in den Myoblasten.

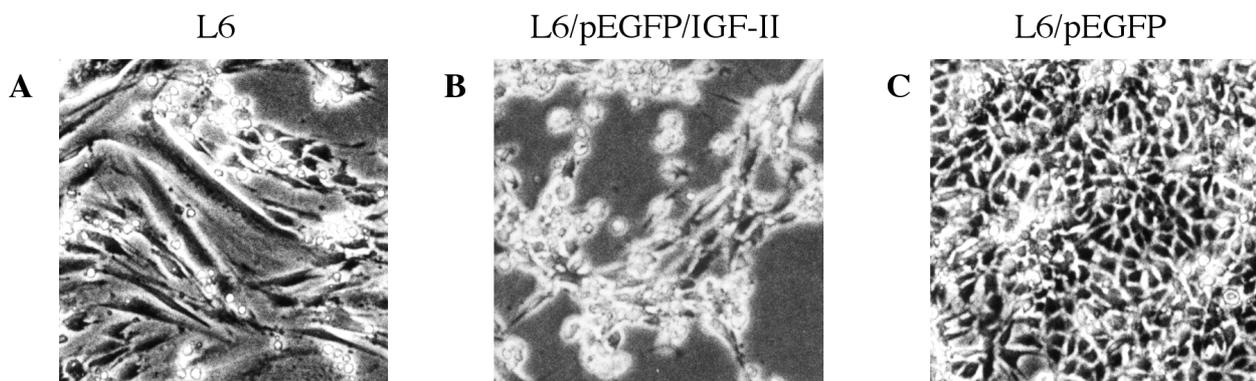


Abb. 29: Differenzierung der Zellen. Zellen wurden für eine Woche serumfrei gesetzt. *A*, L6 Myoblasten; *B*, pEGFP/IGF-II transfizierte L6 Myoblasten; *C*, pEGFP transfizierte L6 Zellen; alle Phasenkontrastbilder wurden mit 100 x facher Vergrößerung aufgenommen.

Es wurde zusätzlich ein Aktin-Antikörper eingesetzt, um überprüfen zu können, daß es sich bei den verwendeten L6-Zellen um Myoblasten handelt und um eine Aussage über die veränderte Morphologie zu erhalten. Hierzu wurde ein Aktin-Antikörper verwendet, der für alpha-Aktin im Skelett,- Herz- und Glatten Muskel und gamma-Aktin im Glatten Muskel spezifisch ist. Er zeigte, daß es sich bei den verwendeten Zellen wirklich um Muskelzellen handelt.

Allerdings war Aktin in den transfizierten Zellen auf 27 % der Expression in den nicht transfizierten Zellen reduziert ($p < 0.001$). Hierbei wurde die Expression des Aktin, wie auch die des IGF-II, auf die des Haushaltsgenes GAPDH und der Ponceau S Färbung bezogen (Abb. 30).

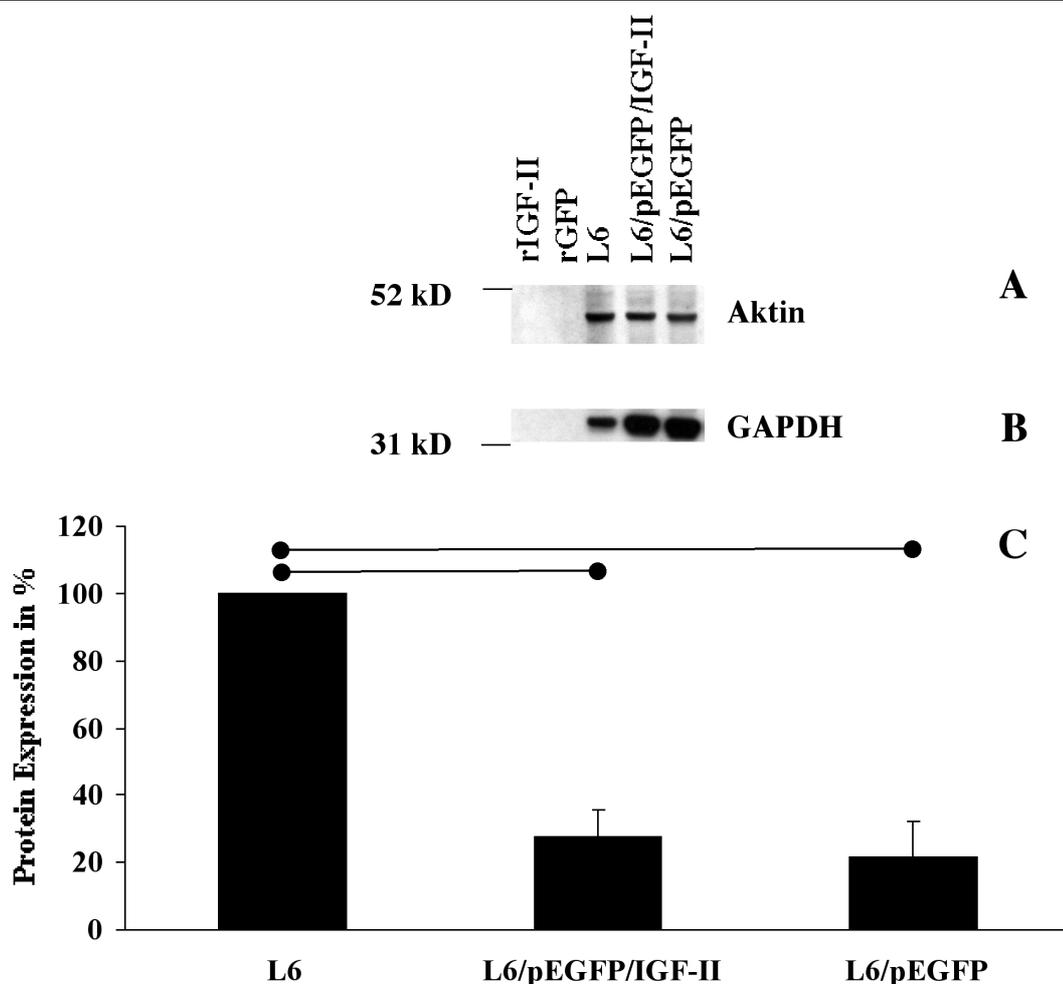


Abb. 30: Aktin Expression in pEGFP/IGF-II transfizierten L6 Myoblasten. Proteine wurden aus transfizierten und nicht transfizierten L6 Zellen nach 2 Tagen Serumentzug isoliert und ein nicht reduzierendes 4-12 % Bis/Tris-Gel (Invitrogen) gefahren. **A**, Monoklonaler Antikörper gegen alpha/gamma Muskel-Aktin und anschließend ein zweiter Antikörper gegen Maus (gekoppelt mit HRP) wurden für die Western Blot Analyse eingesetzt, mit dem ECL-Kit (Amersham) wurde detektiert. **B**, Als erster Antikörper wurde ein monoklonaler GAPDH-AK zum Abgleichen der Ladungsunterschiede eingesetzt. Geladen wurde in Spur 1: 100 ng rIGF-II; Spur 2: 50 ng rGFP; Spur 3: L6 Zellen; Spur 4: pEGFP/IGF-II transfizierte Zellen; Spur 5: pEGFP transfizierte Zellen. **C**, Säulendiagramm zur Darstellung der Expression des Aktin. Die Ergebnisse sind in Mittelwerten \pm SEM aufgeführt. Statistische Unterschiede ($p < 0.001$) zwischen den Untersuchungen sind mit punktförmig endenden Verbindungslinien gekennzeichnet

3.4.8 IGF-II Expression in Abhängigkeit der Zelldichte

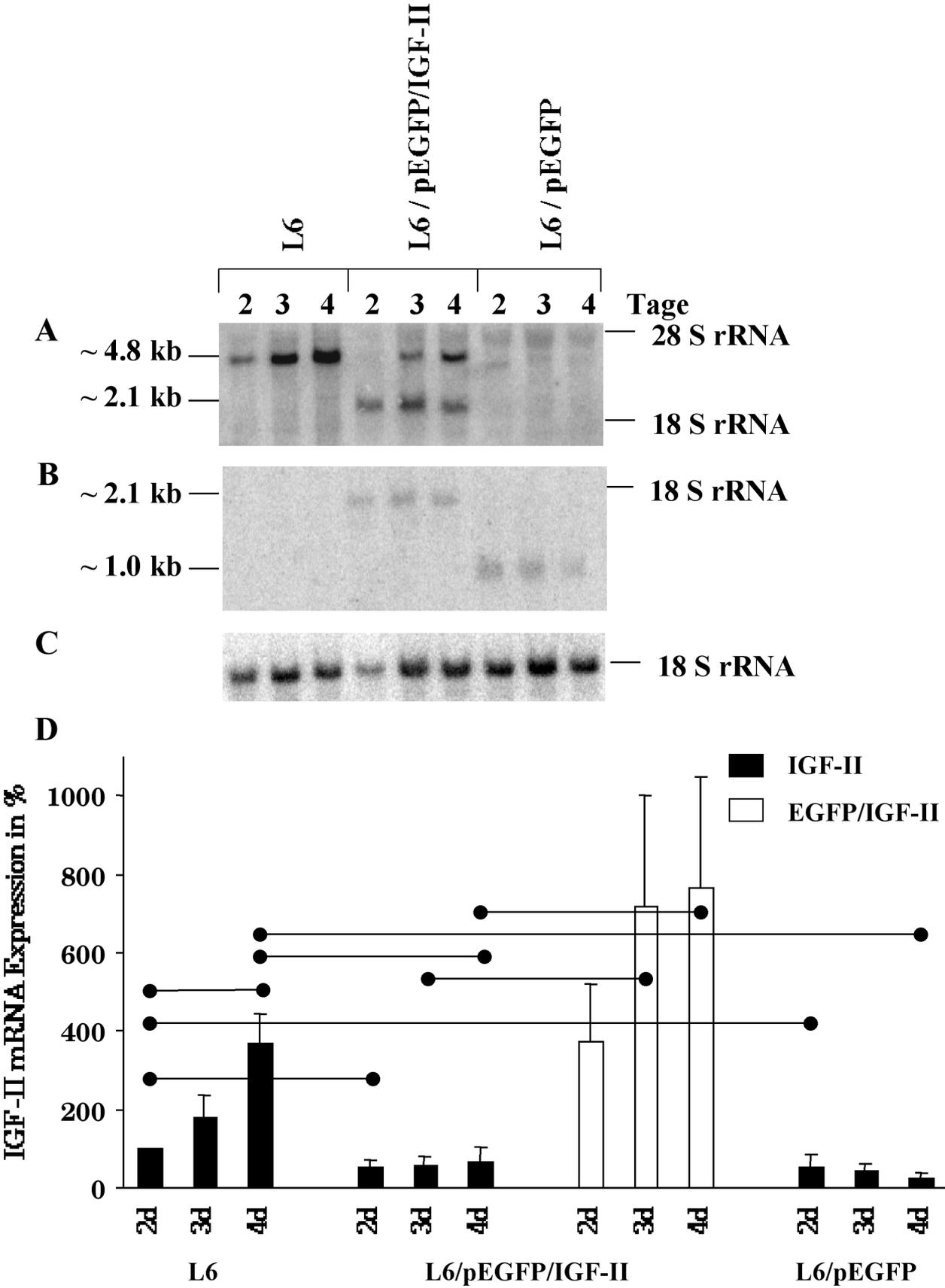
Es sollte untersucht werden, ob die Zelldichte einen Einfluß auf die Expression des IGF-II hat, da dies schon bei anderen Zellen beschrieben wurde und bekannt ist, daß IGF-II im Übergang von der Proliferation zur Differenzierung der Muskelzellen eine wichtige Rolle spielt. Die endogene

IGF-II Expression war anhand der 4.8 kb mRNA nachweisbar (s. 3.4.5.1). Die Expression war in den L6 Zellen bis zum 3.7 fachen ($p < 0.004$) in Abhängigkeit von der Zelldichte induziert (Abb. 31 A). Um Ladungsunterschiede ausgleichen zu können, wurde auch mit 18S rRNA-Antisense-Oligonukleotid hybridisiert, die jeweiligen Werte der IGF-II-Hybridisierung durch die der 18S rRNA geteilt und eine statistische Analyse angeschlossen (Abb. 31 C).

In den pEGFP/IGF-II transfizierten Zellen war das nicht der Fall. Das „exogene“ IGF-II, welches transfiziert ist, wird in allen Fällen gleichmäßig exprimiert, d.h. die Zelldichte hat keinen Einfluß auf die Transkription der pEGFP/IGF-II mRNA. Dies war auch zu erwarten, da ein CMV-Promotor vorgeschaltet ist. Durch die konstitutive Expression des „exogenen“ IGF-II und damit das ständige Vorhandensein von „exogener“ IGF-II mRNA wird die Induktion des „endogenen“ IGF-II gehemmt. Sie war bis zu 50 % herunterreguliert ($p < 0.008$) (Abb. 31 C).

In pEGFP transfizierten L6 Zellen kann die endogene IGF-II mRNA nur schwach nachgewiesen werden. Die Expression war im Vergleich zu nicht transfizierten L6 Myoblasten herunterreguliert.

Abb. 31: IGF-II Expression in Abhängigkeit zu der Zelldichte. Jeweils 15 µg Gesamt-RNA aus Zellen, die zu drei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten, bei steigender Zelldichte, geerntet wurden, wurden in einer Northern Blot Analyse untersucht, wobei mit der cDNA-Sonde gegen den kodierenden Bereich des humanen IGF-II (IGF-II/0.46ES) und somit gegen das IGF-II im pEGFP/IGF-II Konstrukt hybridisiert wurde (A). Ebenso wurde eine Sonde gegen EGFP eingesetzt (B) und mit dem 18S rRNA-Antisense-Oligonukleotid die 18S rRNA detektiert (C). Säulendiagramm entspricht dem der endogenen (schwarze Säulen) oder exogenen (weiße Säulen) IGF-II Expression. Ergebnisse sind in Mittelwerten \pm SEM dargestellt (D). Statistische Unterschiede ($p < 0.001 - 0.038$) zwischen den Versuchen sind mit punktförmig endenden Verbindungslinien gekennzeichnet.



3.4.9 Antisense-Expression des IGF-II

Da in unserem Herzmodell der Okklusion/Reperfusion beim Schwein Antisense-Transkripte gefunden wurden, sollten auch in unserem Zellkulturmodell Untersuchungen mittels Northern Blot Analyse hinsichtlich der Transkription einer Antisense-RNA durchgeführt werden. Es wurde das Sense-Oligonukleotid #286, das zum humanen Exon 5 homolog ist, verwendet.

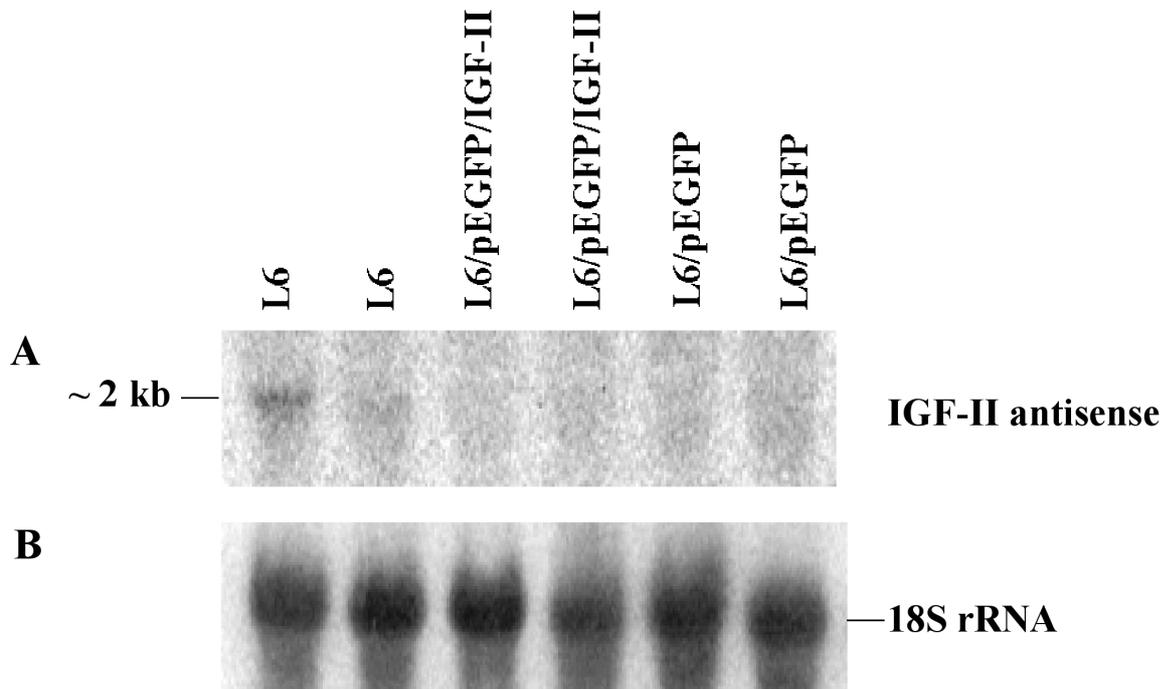


Abb. 32: IGF-II Antisense-RNA. Jeweils 15 µg Gesamt-RNA wurden in einer Northern Blot Analyse untersucht. Es wurde ein Sense-Oligonukleotid homolog zum humanen Exon 5(#286) für die Hybridisierung eingesetzt (A). Ebenso wurde mit dem 18S rRNA-Antisense-Oligonukleotid die 18S rRNA detektiert (B). Aufgetragen wurden in Spuren 1 und 2: L6; Spuren 3 und 4: L6/pEGFP/IGF-II und in Spuren 5 und 6: L6/pEGFP.

Es konnte eine Antisense-RNA von etwa 2 kb in den nicht transfizierten Zellen detektiert werden. Diese mRNA war nicht in den pEGFP/IGF-II transfizierten Zellen zu finden. Als Referenz wurde auch mit 18S rRNA-Antisense-Oligonukleotid hybridisiert (Abb. 32). Man kann davon ausgehen, daß eine Überexpression des Konstruktes die Transkription von IGF-II-Antisense-RNA unterdrückt.

3.4.10 Transkription des H19-Gens in Sense- und Antisense-Richtung

Eine Untersuchung der H19 Expression wurde, wie zuvor bei den transgenen Mäusen beschrieben, auch in den transfizierten Zellen durchgeführt, um Vergleiche zwischen den beiden Modellen ziehen zu können. Es wurden Northern Blot Analysen mit Sense- und Antisense-Oligonukleotiden durchgeführt.

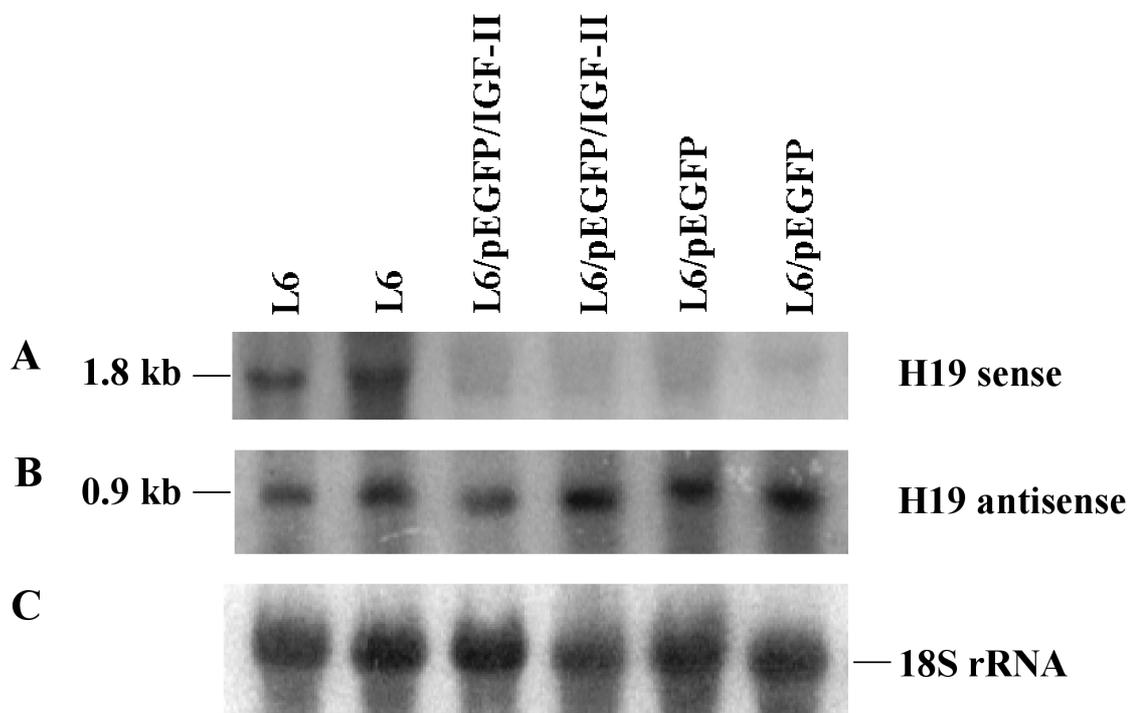


Abb. 33: H19 Sense- und Antisense-RNA. 15 µg Gesamt-RNA wurden in einer Northern Blot Analyse untersucht, wobei mit dem Antisense-Oligonukleotid (# 352) (A), dem Sense-Oligonukleotid (# 351) (B) und mit dem 18S rRNA-Antisense-Oligonukleotid die 18S rRNA detektiert (C) wurden. Aufgetragen wurden in Spuren 1 und 2: L6; Spuren 3 und 4: L6/pEGFP/IGF-II und in Spuren 5 und 6: L6/pEGFP.

Unter Verwendung des Antisense-Oligonukleotides #352 konnte eine Sense-mRNA von 1.8 kb detektiert werden. Diese mRNA wurde nur in den nicht transfizierten L6 Zellen gefunden. Zusätzlich wurde mit einem Sense-Oligonukleotid (# 351) eine Antisense-RNA von 0.9 kb detektiert. Diese mRNA wurde in allen Zellen, d.h. in den transfizierten und in den nicht transfizierten Zellen gefunden (Abb. 33).

Aus der Expression des H19 wird deutlich, daß seine Transkription durch die Überexpression des pEGFP/IGF-II beeinflusst, d. h. gehemmt wird. Die Expression der Antisense-RNA des H19 bleibt unbeeinflusst.

3.4.11 Einfluß der Überexpression auf das IGF-System

Neben der Expression des IGF-II und des H19 sollten auch andere Mitglieder der IGF-Familie untersucht werden und damit geklärt werden, ob die Überexpression des IGF-II Einfluß auf deren Expression ausübt. Beim Vergleich von nicht transfizierten und transfizierten Zellen zeigte die Transkription der 11 kb mRNA des IGF-I Rezeptors einen schwachen Anstieg oder war unverändert. Dahingegen war der IGF-II Rezeptor, der eine mRNA von 9.5 kb hat, in den pEGFP/IGF-II L6 Myoblasten um den Faktor 2 induziert ($p < 0.0029$) (Abb. 34). Der Insulinrezeptor war nicht zu detektieren; ebenso konnte die mRNA für IGF-I nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden die IGFBPs-5 und -6 untersucht, da diese im Skelettmuskel beschrieben wurden. Beide Bindungsproteine waren kaum nachzuweisen; IGFBP-5 wurde nur in den pEGFP transfizierten Zellen detektiert, wohingegen IGFBP-6 nur in den pEGFP/IGF-II transfizierten Zellen nachzuweisen war.

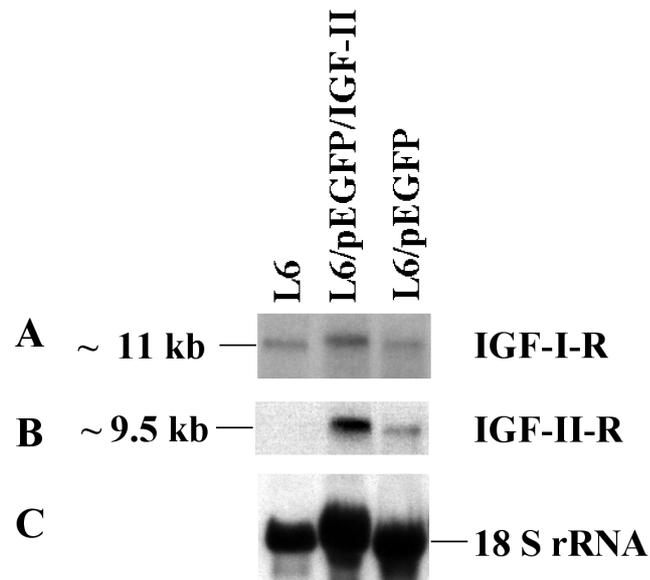


Abb. 34: Expression der Rezeptoren. 15 μ g Gesamt-RNA wurden in einer Northern Blot Analyse untersucht. **A**, IGF-I-R; **B**, IGF-II-R und **C**, 18S rRNA wurden detektiert. Aufgetragen wurden in Spur 1: L6; Spur2: L6/pEGFP/IGF-II und in Spur3: L6/pEGFP

Die Induktion der IGF-II-R Transkription kann im Zusammenhang mit seiner Aufgabe innerhalb der Konzentrationskontrolle des IGF-II gesehen werden. So wird generell davon ausgegangen, daß eine Erhöhung der IGF-II-Menge die Expression des IGF-II-R induziert, welcher wiederum für die Degradation des IGF-II verantwortlich ist.

4 Diskussion

4.1 Struktur des IGF-II-Gens in unterschiedlichen Spezies

Ein Ziel der Arbeit war es, die genomische Struktur des porcinen IGF-II-Gens zu charakterisieren. Die Sequenzen des IGF-II-Gens verschiedener Spezies sind stark konserviert, besonders im kodierenden Bereich, welcher zwischen Mensch, Maus und Ratte eine Homologie von 91 % hat. So sind die Strukturen des humanen IGF-II-Gens und die der Maus und der Ratte gleich, abgesehen von Exon 1, 2 und 3 und dem humanen Promotor P1, welcher nur beim Menschen beschrieben ist (s. 1.2.1.2). Man geht davon aus, daß diese Exons fehlen und es keinen homologen Promotor in der Maus zu dem des humanen P1 gibt. Das IGF-II-Gen beim Menschen und der Maus liegt 3' vom Insulin-Gen ³⁹.

Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen wird deutlich, daß das IGF-II-Gen des Schweins im Aufbau zu dem des Menschen stärker homolog als zu dem der Maus ist; dies bezieht sich in erster Linie auf den 5' Bereich. Im Gegensatz zu den Genen der Maus und der Ratte besitzt es einen Promotor P1. Die Sequenz des IGF-II-Gens des Schweins hat neben Homologien zum humanen Gen aber auch zu anderen Spezies Ähnlichkeit, wie im folgenden Kapitel diskutiert.

4.2 Alternativer Einsatz der Promotoren beim Schwein

4.2.1 Transkription unterschiedlicher mRNAs ermöglicht Aussage über Promotor-Aktivitäten

Das IGF-II-Gen wird alternativ gespleißt. Beim Menschen sind sechs mRNAs mit den unterschiedlichen Größen von 6,0, 5,3, 5,0, 4,8, 2,2 und 1,8 kb bekannt ⁴⁰⁻⁴². Für das porcine IGF-II sind ebenfalls mindestens sechs mRNAs von 6,0, 5,3, 4,8, 2,2, 1,9 und 1,7 kb beschrieben ^{27,43,44}. Die verschiedenen Promotoren des humanen Gens generieren die unterschiedlichen prä-mRNAs, welche zusätzlich noch alternativ gespleißt werden. Bis auf einen Fall ist der 3' Bereich und damit der kodierende Bereich der mRNAs immer gleich und besteht aus

Exon 7, 8 und dem 5' Bereich des Exon 9. Nur die kleinste mRNA von 1.8 kb besteht u.a. nur aus dem 3' Bereich von Exon 9 und entsteht durch posttranskriptionale Prozessierung (s.u.). Alle anderen mRNAs kodieren für das gleiche Protein^{45,46} (Abb. 3). Mittels Northern Blot Analyse wurde die Zusammensetzung der verschiedenen mRNAs beim Schwein untersucht, um damit feststellen zu können, welcher Promotor für die entsprechende mRNA verantwortlich ist.

Im Northern Blot konnten drei mRNAs von 6.0, 4.8 und 1.2 kb mit Sonden gegen die Exons 1 und 2 nachgewiesen werden. Auch in der Southern Blot Analyse erhielten wir sowohl beim Menschen als auch beim Schwein ein Signal mit entsprechender Sonde. Daher kann man davon ausgehen, daß das porcine IGF-II-Gen wie auch das menschliche Gen einen Promotor P1 besitzen. Im Gegensatz dazu ist bei Maus oder Ratte ein entsprechender Promotor nicht bekannt. Es wurden aber von Rotwein¹⁰⁶ bei der Maus zwei Pseudoexons 5' des Promotors P1 (der dem humanen Promotor P2 entspricht) beschrieben. Daher besteht die Möglichkeit, daß auch bei der Maus oder Ratte ein homologer Promotor vorhanden ist, welcher noch nicht beschrieben wurde. Ein Vergleich mit der Expression in der Schweineleber (beim Menschen ist der Promotor P1 in der Leber aktiv), in welcher mRNAs von 4.7 und 1.2 kb nachgewiesen wurden⁴³, zeigt, daß die Größe der mRNAs mit denen von uns beschriebenen übereinstimmt.

Untersuchungen mit einer humanen cDNA-Sonde gegen Exon 4, die zum Nachweis des Promotors P2 diente, zeigten in der Northern Blot Analyse beim Schwein eine mRNA von 4.8 kb. Beim Menschen wird von Promotor P2 eine mRNA von 5 kb und bei der Maus vom entsprechenden Promotor (mP1) eine mRNA von 3.8 kb mRNA generiert. Daher kann man auch hier davon ausgehen, daß der Einsatz des porcinen Promotors P2 dem des Menschen eher entspricht als dem der Maus. Zusätzlich wurde eine mRNA von 0.8 kb detektiert. Eine humane mRNA mit ähnlicher Größe ist bisher nicht bekannt. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde eine Hybridisierung mit einem Antisense-Oligonukleotid (#155) durchgeführt. Zusätzlich zu den beschriebenen Signalen waren weitere Banden zu erkennen. Dies könnte mit nicht vollständiger Prozessierung der prä-mRNA zusammenhängen oder läßt sich mit unterschiedlichen Polyadenylierungsstellen, wie auch beim Menschen beschrieben, erklären.

Mit der humanen cDNA-Sonde gegen Exon 5, die zur Analyse des Promotors P3 diente, konnte beim Schwein im Northern Blot kein Signal detektiert werden. Unter Verwendung eines zum humanen IGF-II homologen Antisense-Oligonukleotides (#156) aus dem gleichen Exon wurde eine mRNA von 4.8 kb mRNA detektiert. In der Maus und der Ratte werden von dem entsprechenden Promotor (mP2 oder rP2) mRNAs von 4.6 kb mRNA transkribiert. Dies weist darauf hin, daß eventuell in diesem Bereich des IGF-II-Genes des Schweins die Homologie zu dem der Maus und Ratte größer ist als zum Menschen. Beim Menschen werden von diesem Promotor mRNAs von 6.0, 2.2 und 1.8 kb transkribiert. Es gibt daher die Möglichkeit, daß es kein dem menschlichen Promotor entsprechendes Gegenstück gibt, sondern die Homologie zu Maus oder Ratte größer ist. Dies hängt wohl auch mit der nicht funktionierenden Hybridisierung der entsprechenden cDNA-Sonde für diesen Bereich zusammen.

Beim Schwein wurden mit der humanen Sonde gegen das Exon 6 mehrere mRNAs detektiert. Sie haben Größen von 5.3, 4.4, 2.8 und 2.2 kb, wobei die 2.2kb mRNA prominent ist. Ein Vergleich mit der Expression in der fetalen Schweineleber zeigte bei Untersuchungen von Hedley⁴³ mRNAs von 5.4 und 2.3 kb. Diese Größen stimmen mit denen von uns beschriebenen mRNAs überein. Promotor P4 ist beim Menschen für die 4.8 und 2.2 kb mRNA verantwortlich und bei der Ratte generiert der entsprechende Promotor (rP3) eine mRNA von 3.6 kb, welche in zwei Teile von jeweils 1.8 kb mRNA gespalten wird⁵¹. Man erhält damit einen 1.8 kb großen 5' Bereich und ein Spaltprodukt aus der 3' Region. Die prominente 2.2 kb mRNA beim Schwein könnte aus einer posttranskriptionellen Spaltung der 5.3 kb mRNA entstanden sein, wie es auch bei der Ratte beschrieben ist.

Mit der 3' UTR-Sonde (Antisense-Oligonukleotid #93) fanden wir bei der Hybridisierung mit Schweine-Proben eine mRNA von 1.9 kb aus dem Bereich der 3' UTR. Dieser Bereich scheint in allen Spezies ähnlich zu sein, da sowohl im Menschen¹⁰⁷ als auch in der Ratte⁵¹ eine mRNA von 1.8 kb mRNA beschrieben ist. Der 3' endonukleolytische Verdau bringt ein stabiles Produkt von 1.8 kb hervor, das aus der 3' UTR und dem Poly(A) besteht. Das entstandene 5' Produkt, aus dem kodierenden Bereich bestehend, ist instabil^{51,107}. Die 1.8 kb mRNA entsteht z.B. bei der Ratte⁵¹ durch die prozessierte 3.6 kb mRNA, wobei die Schnittstelle im Schwanz der mRNA

sitzt, welcher phylogenetisch konserviert und GC-reich ist. Dies erklärt die Existenz der 1.8 kb mRNA im Menschen, der Maus, der Ratte und dem Schwein¹⁰⁷ (s. 3.2). Neben der 1.9 kb mRNA des Schweins konnte auch eine mRNA von 1.2 kb mit der gleichen Sonde detektiert werden. Sie entspricht der Größe der einen bekannten mRNA des porcinen IGF-II (Genbank Accession Nr. X56094), was auch zu erwarten war, da die Sequenz dieses Antisense-Oligonukleotides homolog zu ihr ausgewählt wurde.

4.2.2 IGF-II-Antisense-Transkripte im Schweineherzen

IGF-II unterliegt einer komplexen epigenetischen Regulation, zu der u.a. der genomische Stempel zählt, welcher mit der Methylierung der CpG-Inseln zusammenhängt. Weiterhin wurde in diesem Zusammenhang auch eine Antisense-RNA diskutiert, welche beim „Imprinting“ eine Rolle spielen soll^{58,59}.

Aufgrund dessen sollte auch im Schwein untersucht werden, ob IGF-II Antisense-Transkripte hat. Mittels Northern Blot Analyse unter Verwendung von Sense-Oligonukleotiden konnten verschieden Antisense-Transkripte detektiert werden.

Ein Sense-Oligonukleotid homolog zum humanen Exon 2 detektierte die gleichen RNAs wie das Antisense-Oligonukleotid in Exon 1 und die zugehörige cDNA-Sonde. Die Antisense-RNA könnte mit der entsprechenden Sense-mRNA hybridisieren und würde mit dieser Reaktion die Translation der mRNA unterbinden.

Die Hybridisierung mit dem Sense-Oligonukleotid gegen das humane Exon 4 ergab Signale mit mehreren RNAs. Eine 6.0 kb RNA, wie bei der Hybridisierung mit dem Antisense-Oligonukleotid, wurde nicht gefunden. Auch kürzere Transkripte könnten mit dem Sense-Transkript hybridisieren und seine Translation hemmen.

Ein Sense-Oligonukleotid aus Exon 5 hybridisierte mit mehreren RNAs. Zusätzlich wurde auch eine 6.0 kb RNA im Gegensatz zu der Hybridisierung mit dem Antisense-Oligonukleotid gefunden.

Es besteht daher die Möglichkeit, daß die von Kluge²⁷ beschriebene 6.0 kb mRNA, die mit einer cDNA-Sonde nachgewiesen wurde, auch eine Antisense-RNA sein könnte, da bei der

Hybridisierung mit einer „random Priming“ markierten cDNA-Sonde nicht nur Sense-mRNAs sondern auch homologe Antisense-RNAs detektiert werden.

4.2.3 Rolle der 6.0 kb mRNA im Stunning-Modell

Die Frage nach dem zuständigen Promotor für die Ischämie/Stress induzierte 6.0 kb mRNA kann aufgrund der zuvor diskutierten Ergebnisse bestimmt werden. Die 6.0 kb mRNA wird von den Promotoren P1 und/oder P2 generiert.

Eine 6.0 kb mRNA wurde im Zusammenhang mit 100S-Ribonukleoprotein-partikeln (RNP) von Nielsen beschrieben. Hierdurch war eine Anhäufung der 6.0 kb mRNA festzustellen. Dies könnte mit einer verlängerten Halbwertszeit im 100S-Partikel zusammenhängen. Diese mRNA wird normalerweise nicht translatiert. Wachsen Zellen allerdings exponentiell, ändert sich dies und es findet die Translation der 6.0 kb mRNA statt ¹⁰⁸.

Die 6.0 kb mRNA beim Menschen entspricht aber nach unseren Ergebnissen nicht der 6.0 kb mRNA des Schweins, da beim Menschen die 6.0 kb mRNA von Promotor P3 aus transkribiert wird, dieser Promotor aber beim Schwein nicht für eine 6.0 kb mRNA verantwortlich ist. Die 6.0 kb mRNA des porcinen IGF-II wird durch Promotor P1 oder P2 generiert. Dies schließt aber nicht aus, daß ähnliche Mechanismen auch beim Schwein vorhanden sind und sich diese Art der Regulation auch auf mRNAs beziehen kann, die von anderen Promotoren generiert werden. Dies ist von besonderem Interesse, da bei dem Modell der Okklusion/Reperfusion auch eine Induktion/Anhäufung der 6.0 kb mRNA gefunden wurde.

Bei der 6.0 kb mRNA könnte es sich auch um eine Vorläufer-mRNA handeln, die noch nicht vollständig gespleißt ist. Die kürzeren mRNAs könnten durch Einsatz unterschiedlicher Polyadenylierungsstellen entstehen, wie es auch für den Menschen beschrieben ist. Eine Hybridisierung mit bisher unbekanntenen Sequenzen ist nicht auszuschließen. Weiterhin könnte es sich bei der von Kluge ²⁷ beschriebenen 6.0 kb mRNA, um eine Antisense-RNA handeln (s. 4.2.2).

4.3 Herzspezifische Überexpression des IGF-II in transgenen Mäusen

Es wurde beschrieben, daß IGF-II sowohl im Skelettmuskel als auch im Herzen²⁶ protektiv wirkt. Im Herzen des Schweins wird IGF-II durch Stress und Ischämie induziert²⁷ und vermindert Infarkte²⁶. Allerdings ist über den molekularen Mechanismus, der zu diesen Effekten des IGF-II führt, nichts bekannt. Ausgehend von den genannten Fakten sollte die Regulation des IGF-II in Myoblasten untersucht werden. Zusätzlich wurde auch die Expression des gemeinsam mit IGF-II regulierten H19 Gens untersucht. Zwei Systeme wurden verwendet, ein transgenes Mausmodell mit herzspezifischer Überexpression des humanen IGF-II und eine Myoblastenzellkultur, die ebenfalls IGF-II überexprimiert.

Zur Herstellung der Konstrukte wurde die humane cDNA des IGF-II ausgewählt, welche den gesamten kodierenden Bereich umfaßt, d.h. auch Sequenzen, die durch das posttranslationale Prozessieren des Prä-pro-peptides entfernt werden.

Für *in vivo* Studien wurde IGF-II herzspezifisch in Mäusen überexprimiert. Um eine herzspezifische Expression zu erzielen, wurde der MLC2v-Promotor, welcher in der Ventrikelmuskulatur aktiv ist, ausgewählt. Die transgenen Mäuse wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Atugen in Berlin hergestellt.

4.3.1 Wirkung der Überexpression des IGF-II Transgens

Bei der Herstellung der transgenen Mäuse ergab sich das überraschende Resultat, daß nur ein Foundertier identifiziert werden konnte, obwohl 450 Oozyten injiziert wurden. Unerwartet war auch der Befund, daß es viel weniger Nachkommen gab, als es bei dem Wildtyp der C57BL/6 normal ist. Normalerweise haben diese Mäuse 5-7 Jungtiere pro Wurf. Wurde das Vatertier als Träger des Transgens eingesetzt, gab es maximal vier Nachkommen. Mit der Mutter als Träger des Transgens wurden in 50 % der Fälle die Nachkommen resorbiert. Es gab maximal zwei Nachkommen im Falle der maternalen Trägerin.

Da wir feststellen konnten, daß es bei den IGF-II transgenen Tieren weniger Nachkommen als beim Wildtyp gab, kann man davon ausgehen, daß die Überexpression des IGF-II im Herzen von Nachteil für die Entwicklung ist und u.a. zu der genannten Resorption des Embryos führt.

Ebenfalls scheint die Position des Transgens innerhalb des Genoms eine wesentliche Rolle zu spielen. Außerdem ist nicht auszuschließen, daß das Imprinting, auch im Zusammenspiel mit der Position, eine Rolle inne hat. Dies würde erklären, warum nur ein Founder, welcher wenig Nachkommen liefert, hergestellt werden konnten. Die Integration scheint intrauterin lethal zu sein, wodurch weitere Linien nicht hergestellt werden konnten. Die Überexpression des IGF-II ist für das Tier von Nachteil.

Im Gegensatz dazu wurde beschrieben, daß homozygote IGF-II knock-out Mäuse 60 % kleiner in ihrem Geburtsgewicht sind als der Wildtyp. Die heterozygoten Tiere zeigten eine bemerkenswerte Verteilung in ihrer Größe. Stammt das mutierte Allel vom Vater, waren die Nachkommen wie die homozygoten Tiere in ihrer Größe verringert. Wurde das mutierte Allel von der Mutter vererbt, verhielt sich der Fötus wie ein Wildtyp-Tier. Es konnte gezeigt werden, daß nur das paternale Allel in den meisten Geweben, die dieses Gen exprimieren, aktiv war³⁰. Daher kann man davon ausgehen, daß der Ursprung des Allels eine wichtige Rolle in seiner Expression spielt.

Zusätzlich wird aus DeChiaras^{29,30} Ergebnissen deutlich, daß IGF-II für eine normale Entwicklung der Plazenta und des Fetus essentiell ist und am E 13.5 sich erstmals Wachstumsdefizite zeigen. Die Embryonalentwicklung der Maus läuft in groben Schritten wie folgt ab¹⁰¹. Am embryonalen Tag (E) 4.5 erfolgt die Implantation des Embryos. Daher ist bis zu diesem Zeitpunkt auch keine Gewichtszunahme des Muttertieres zu erwarten. Am E 10 ist die Implantation abgeschlossen und es beginnt die Organogenese. Ab E 14 ist die Organogenese abgeschlossen, man spricht dann von einem Fötus. Sein Herz entwickelt sich ab dem E 8.5 und beginnt mit der Herzkammerbildung an diesem Tag. Ab E 9 beginnt das Herz zu schlagen. Die Herzentwicklung ist am E 15 abgeschlossen. Wir konnten in unserem Tiermodell eine Resorption des Embryos um den E 13 feststellen, was, entsprechend den Ergebnisse von DeChiara^{29,30}, gegen eine normale Entwicklung spricht. Bezüglich der fetalen Entwicklung beschrieb Liu²⁸, daß IGF-II in fetalen Ventrikelmyozyten der Ratte die DNA-Synthese induziert. Diese Wirkung des

IGF-II, welche *in vitro* gefunden wurde, bezieht sich nur auf noch nicht terminal differenzierte Kardiomyozyten. Nach der Differenzierung der Myozyten scheint IGF-II unfähig, die DNA-Synthese wieder zu aktivieren. Es konnte zusätzlich von ihnen gezeigt werden, daß IGF-II auch Hypertrophie fördert. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Lau ¹⁰⁹ überein, die zeigen, daß die lokale Konzentration an IGF-II für ein normales Wachstum des Herzens und dessen Entwicklung kritisch ist. Die Erhöhung der IGF-II-Menge aufgrund des Fehlens des IGF-II-R resultierte in Hyperplasie, Fehlbildung der Herzstruktur und führte zu perinataler Lethalität ¹⁰⁹.

Verglichen mit unseren Ergebnissen kann man daraus schließen, daß generell ein Übermaß an IGF-II im Herzen, sei es durch das Fehlen des regulierenden IGF-II-R oder wie in unserem Modell durch die Überproduktion des IGF-II selbst, lethal ist.

4.3.2 H19 in IGF-II transgenen Mäusen

Da zusammen mit IGF-II auch H19 reguliert wird und hierzu verschiedene Mechanismen bekannt sind, wurde auch die Expression des H19 untersucht. H19 mRNA wurde in den IGF-II transgenen Mäusen im Herzen, im Skelettmuskel und in der Leber detektiert, wobei die stärkste Expression im Herzen zu finden war. Ebenfalls wurde getestet, ob eine Antisense-RNA des H19 in unserem Modell der IGF-II transgenen Mäuse exprimiert wird. Antisense-RNA von 0.9 kb konnte im Herzen nachgewiesen werden. Wie im Herzen konnte auch in den anderen Geweben eine zusätzliche Bande detektiert werden, die größer (2.0 kb) als die beschriebene Antisense-RNA ist.

Im Gegenzug zu den IGF-II transgenen Mäusen sei auch die Herstellung H19 transgener Mäuse erwähnt, bei der Brunkow und Tilgham ¹¹⁰ einen lethalen Effekt, welcher sich am Tag 14 manifestierte, fanden. H19 transgene Mäuse sterben spät in der Embryonalentwicklung. Dies steht sicherlich im Zusammenhang mit der erhöhten H19-Expression.

Daraus kann geschlossen werden, daß quantitative Aspekte entscheiden, ob IGF-II und H19 lethale Effekte haben oder ob, wie in dem Modell der Okklusion/Reperfusion des Schweineherzens, die protektiven Eigenschaften des IGF-II den negativen überwiegen.

4.4 Überexpression des humanen IGF-II in Myoblasten

Parallel zu der Herstellung und Untersuchung der transgenen Mäuse sollten *in vitro* Untersuchungen in der Zellkultur durchgeführt werden, die Aufschluß über die Wirkung und die Regulation des IGF-II in Fusion mit EGFP in Myoblasten geben sollten. Hierzu wurde in L6 Myoblasten humanes IGF-II überexprimiert. Es wurde wie bei den transgenen Mäusen die humane IGF-II cDNA eingesetzt. L6-Myoblasten wurden als Modellsystem ausgewählt, da sie wie Herzmuskelzellen mesodermalen Ursprungs sind und ähnliche morphologische, biochemische und physiologische Eigenschaften besitzen. L6-Zellen sind zur Differenzierung fähig und exprimieren im Vergleich zu anderen Muskelzelllinien wie C2 relativ wenig IGF-II. Dies ist zur Untersuchung der IGF-II-Überexpression von Vorteil.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß pEGFP und pEGFP/IGF-II transient und stabil in den L6 Myoblasten transkribiert werden. Exogene pEGFP/IGF-II mRNA von 2.1 kb konnte mit den Sonden gegen IGF-II oder pEGFP nachgewiesen werden. In den pEGFP/IGF-II transfizierten Zellen war die Expression des endogenen IGF-II verringert oder teilweise nicht vorhanden. Es ist zu vermuten, daß im Falle der pEGFP/IGF-II transfizierten L6 Zellen die konstitutive Expression des „exogenen“ IGF-II die Transkription des „endogenen“ IGF-II hemmt, die normalerweise zusammen durch die Zelldichte (s. 4.4.1) und damit über den Status der Zelle reguliert wird.

4.4.1 Zelldichte-abhängige Expression des IGF-II in Myoblasten

Endogene IGF-II mRNA konnte in untransfizierten L6 Zellen hauptsächlich als 4.8 kb mRNA nachgewiesen werden. Schwache Banden traten auch bei 3.6 und 1.8 kb auf. Dies entspricht den beschriebenen Daten von Nielsen⁵¹, bei denen mRNAs von 4.6, 3.8/3.6 und 1.8 kb charakterisiert wurden. Die Expression der 4.8 kb mRNA ist von der Zelldichte abhängig. Das bedeutet, daß L6 Myoblasten mit zunehmender Zelldichte eine Induktion der IGF-II mRNA zeigen. Auch Ungaro beschrieb in Rattenfibroblasten eine Zelldichteabhängigkeit bezüglich der Expression des IGF-II¹¹¹. In proliferierenden L6 Zellen kann man also von einer positiven Rückkopplung des IGF-II ausgehen.

4.4.2 Lokalisierung des endogenen und exogenen IGF-II in der Zelle und im Überstand

Es wurde die Translation des endogenen und des exogenen IGF-II im Western Blot untersucht. Endogenes IGF-II wurde hauptsächlich im Überstand der Zellen nachgewiesen, wohingegen das Fusionsprotein aus EGFP und IGF-II mit einem GFP-Antikörper nur in den Zellen nachweisbar war.

Weiterhin konnten aufgrund ihrer Fluoreszenz die EGFP-Proteine (EGFP und EGFP/IGF-II) mit einem entsprechenden Mikroskop auch in den lebenden Zellen betrachtet werden. Das Fusionsprotein bestehend aus EGFP und IGF-II war hauptsächlich im Zellkern zu finden, wohingegen EGFP in der gesamten Zelle vorhanden war.

Die Ergebnisse aus Western Blot Analyse und der Fluoreszenzmikroskopie konnten mittels einer Analyse der Proteinsequenz des IGF-II und des EGFP validiert werden. Hierzu wurde die Rheinhardt's Methode für zytoplasmatische/nukleäre Discrimination (Psort II Prediction, <http://psort.nibb.ac.jp/>, ¹¹²⁾ verwendet. IGF-II wurde mit diesem Programm zu 66.7 % extrazellulär, zu 22.2 % nukleär und zu 11.1 % mitochondrial lokalisiert; EGFP wäre nach diesem Programm hauptsächlich im Zytoplasma zu finden. Für das Fusionsprotein aus EGFP/IGF-II ist zu 48.7 % zu erwarten, daß es im Kern zu finden ist.

Diese erhöhte nukleäre Lokalisierung (48.7 % im Vergleich zu 22.2 % des endogenen IGF-II) des EGFP/IGF-II entspricht nicht der natürlichen Situation, bei der man davon ausgehen kann, daß IGF-II hauptsächlich sezerniert wird aber auch zu einem geringeren Anteil (22 %) im Kern zu finden ist. Daher stellt sich die Frage, welche Aufgabe IGF-II im Zellkern erfüllt. Normalerweise wird es sezerniert, bindet an seine Rezeptoren und wirkt damit signalinduzierend oder vermittelnd.

4.4.3 Veränderte Morphologie der IGF-II transfizierten L6-Zellen

Neben der Lokalisierung der EGFP-Proteine wurde auch die Morphologie der Zellen betrachtet, um Unterschiede zu analysieren. Es wurde eine veränderte Morphologie der pEGFP/IGF-II transfizierten Zellen im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen beobachtet. Die Zellen

wachsen vermehrt in die Breite und weisen eine um 30 % größere Fläche ($p < 0.001$) als die untransfizierte Zellen auf.

Zellen, die nur mit pEGFP transfiziert sind, haben einen anderen morphologischen Charakter als normale L6 Myoblasten und pEGFP/IGF-II transfizierte Zellen und scheinen unorganisiert zu sein. Sie zeigen eine Unordnung im Zytoplasma. Die Transfektion mit dem pEGFP alleine, eigentlich als Kontrolle gedacht, hat immensen Einfluß auf die Zellen. Dies wirft die Frage auf, ob man EGFP als Kontrolle verwenden kann und welchen Effekt es innerhalb des Fusionsproteins hat.

pEGFP transfizierte L6 Myoblasten exprimieren kein endogenes IGF-II. Dies konnte auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden. Auch die Expression des H19 Gens ist inhibiert (s. 4.4.6). Dies ist sowohl bei den pEGFP als auch bei den pEGFP/IGF-II transfizierten Zellen der Fall. H19, das auch als Tumorsuppressorgen beschrieben ist, kann in diesen Zellen nicht mehr seine Funktion als solches ausüben. Die Zellen verändern sich und können sich nicht mehr zu Myotuben differenzieren, wie im folgenden Kapitel besprochen (s. 4.4.4).

4.4.4 Überexpression des IGF-II inhibiert Differenzierungsfähigkeit der Myoblasten

Da bekannt ist, daß IGF-II die Differenzierung von Myoblasten induziert, sollte in unserem Zellkultursystem ebenfalls untersucht werden, ob die Überexpression des IGF-II den Ergebnissen entspricht, die ansonsten durch Gabe des IGF-II-Proteins oder durch Serumentzug erzielt wurden¹¹³⁻¹¹⁵. Die Arbeiten von Florini¹¹³⁻¹¹⁵ zeigten, daß IGF-II eine wesentliche Rolle in der Differenzierung von Myoblasten spielt, was an der Expression von Myogenin (MyoD-Familie) und u. a. an der Myotubenbildung zu erkennen ist. Dies wurde zum Einen durch exogene Gabe des IGF-II erreicht. Zum Anderen wurde durch Serumentzug Myoblastendifferenzierung und gleichzeitig eine Erhöhung der IGF-II-Expression nachgewiesen. Das bedeutet, daß die Kontrolle über die Myogenese durch IGFs ein generelles Phänomen ist und unabhängig vom Zusatz des IGF-II im Differenzierungsmedium (wenig Serum) abläuft. Gehen die Myoblasten zur Differenzierung über, verlassen sie den Zellzyklus und verharren in der G0-Phase^{116,117}.

Auch in unserem Modell wurde die Methode des Serumentzuges gewählt, um die Differenzierung der Zellen zu induzieren. Die Zellen wurden in subkonfluentem Zustand für eine Woche serumfrei gesetzt. Die nicht transfizierten Zellen wiesen erwartungsgemäß nach einer Woche Myotuben auf. In den pEGFP/IGF-II transfizierten Zellen war keine Myotubenbildung zu erkennen. Sie starben z.T. unter serumfreien Bedingungen ab. Dennoch waren Zellen vorhanden, die wie zuvor (d.h. mit Serumgabe) proliferierten.

Für IGF-II ist bekannt, daß es eine zentrale Rolle in der Erhaltung der Lebensfähigkeit der Zellen hat, wenn Zellen von der Proliferation in die Differenzierung übergehen. Sie sind für das Überleben der Myoblasten verantwortlich ¹¹⁸⁻¹²¹. Diesen Sachverhalt kann man auch auf unsere Ergebnisse anwenden, denn obwohl sich die transfizierten Zellen nicht differenzieren, haben sie die Fähigkeit zu überleben und proliferieren. Florini beschrieb ¹²² eine von den IGFs biphasische Dosisabhängigkeit in den L6-Zellen. Bei niedrigen Konzentrationen wurden die Zellen zur Differenzierung angeregt, bei höheren Dosen war eine Abnahme zu erkennen. Auch Foulstone ¹²³ beschrieb, daß sich C2 Myoblasten nicht differenzieren, wenn ihnen unter serumarmen Bedingungen (2% Serum) IGF-I oder IGF-II gegeben wurde. Diese Hemmung war konzentrationsabhängig, d.h. mit zunehmender Konzentration an IGF differenzierten sich die Zellen weniger. Nach Angaben von Ewton ¹¹⁶ induziert IGF-II besser als IGF-I die Differenzierung von L6A1 Myoblasten. Die mitogene Wirkung des IGF-I verzögert die Myoblastendifferenzierung. C2-Zellen, die kein IGF-II exprimieren, durchlaufen eine rasche Apoptose, wenn sie einem Medium mit geringer Serummenge ausgesetzt sind, d.h. wenn sie zur Differenzierung angeregt werden sollen ¹¹⁸.

Es ist bekannt, daß die Myogenese und die IGF-II Expression durch hohe Serumkonzentrationen negativ kontrolliert wird. Dies ist darin begründet, daß die Zellen durch Faktoren wie IGF-I, IGF-II und in hohen Konzentrationen Insulin im Serum daran gehindert werden, IGF-II zu sezernieren und damit die terminale Differenzierung nicht stattfinden kann. Magri ¹²⁴ beschrieb 1994 dieses Phänomen der negativen Rückkopplung und damit der Hemmung der eigenen Expression des IGF-II. Diese Rückkopplung erfolgt über den IGF-I-R und ist nicht an die Proliferation gebunden. Auch sich differenzierende L6 Zellen sind dafür empfindlich. Diese

Rückkopplung kann durch IGFBPs während der Differenzierung (geringe Serummengen) gehemmt werden. Rosenthal beschrieb 1994 ¹²⁵ eine IGF-II-R abhängige Stimulation der Differenzierung durch IGF-II. Es werden zwei verschiedene Signaltransduktionswege für die Proliferation und die Differenzierung von Skelettmuskelzellen, wie z.B. in L6 Zellen, verwendet. Der MAP-Kinase-Weg spielt eine wesentliche Rolle während der Proliferation und inhibiert den myogenen Weg, wohingegen der PI3-Signaltransduktionsweg essentiell für die IGF-II stimulierte Differenzierung ist. Beide Wege werden über der IGF-I-R übermittelt ¹²⁶.

All diese Ergebnisse ergeben die gleiche Schlußfolgerung; IGF-II induziert die Differenzierung bei einer bestimmten Konzentration und ist innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches wirksam. Ein Überschreiten diesen Spektrums scheint schädlich zu sein. Die Zellen sterben teilweise ab, wie es auch im Fall der pEGFP/IGF-II transfizierten L6-Zellen zu beobachten war.

Es stellt sich die Frage, ob dies mit der Expression des exogenen IGF-II zusammenhängt. Weiterhin ist ein Zusammenspiel mit der IGF-II Antisense-RNA und der H19 RNAs möglich (s. 4.4.6, 4.5).

Zelluläre Differenzierung wurde nur in den nicht transfizierten Zellen gefunden, welche auch H19 Sense-mRNA transkribieren. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen von Davis ¹²⁷. Er konnte zeigen, daß nur die Zellen H19 exprimieren, die auch die Fähigkeit haben, sich zu differenzieren. Daher kann H19-Expression dazu herangezogen werden myogene Loci zu identifizieren (s. 4.4.6).

4.4.5 Expression anderer Mitglieder des IGF-Systems

Andere Mitglieder der IGF-Familie wurden auch auf ihre Expression hin untersucht. Dies sollte es ermöglichen, einen Einblick in den Einfluß der IGF-II-Überexpression auf die anderen Komponenten des IGF-Systems zu bekommen. IGFBP-5 und IGFBP-6 waren nur sehr schwer nachzuweisen. IGFBP-5 wurde nur in den pEGFP transfizierten Zellen detektiert und IGFBP-6 konnte nur in den pEGFP/IGF-II transfizierten Zellen nachgewiesen werden.

Es wurden auch in anderen Zellsystemen Veränderungen im IGF-System untersucht. James ¹²⁸ beschrieb eine Myoblastenzelllinie, die IGFBP-5 stabil überexprimiert (C2BP5) und daher

minimale Differenzierung bei 2% Serum im Medium zeigen. Allerdings können diese Zellen zur Differenzierung angeregt werden, indem ihnen ein IGF-I-Analogon verabreicht wird, welches an den IGF-I-R, aber mit verminderter Affinität an das IGFBP-5 binden kann¹²⁹. In L6 Zellen werden IGFBP-4 und -6 exprimiert und IGFBP-5 zu geringen Mengen¹³⁰. In unserem Zellkulturmodell konnte auch nur eine geringe Expression des IGFBP-5 nachgewiesen werden. Die mRNA-Menge scheint an der Detektionsgrenze zu liegen.

Die Transkription der 11 kb mRNA des IGF-I Rezeptors war unverändert. Es ist bekannt, daß die IGFs durch ihre Bindung an den IGF-I-Rezeptor ihre mitogene Wirkung vermitteln (Abb. 6). Daher kann man daraus schließen, daß die Zellen, ob transfiziert oder nicht, identisch proliferieren. Dies konnte auch bei Zellzählungen bestätigt werden. Im Gegensatz dazu war der IGF-II Rezeptor in den pEGFP/IGF-II transfizierten L6 Myoblasten um den Faktor 2 induziert ($p < 0.0029$). Dieser Rezeptor reguliert die IGF-II-Konzentration. Die Bindung von IGF-II an den M6P/IGF-II-Rezeptor führt zur Internalisierung in die Zelle, in der IGF-II zu den Lysosomen transportiert und abgebaut wird⁷⁰⁻⁷². Da in den pEGFP/IGF-II transfizierten Zellen auch zusätzlich zum endogenen IGF-II das „exogene“ IGF-II exprimiert wird, muß ein Gleichgewicht mit Hilfe des IGF-II-R geschaffen werden.

4.4.6 Expression des H19-Gens

Es wurde auch die Expression des H19-Gens untersucht, da es zusammen mit dem IGF-II reguliert wird. Seine Expression wurde im Modell der transgenen Mäuse und der Zellkultur analysiert. Weiterhin wurde untersucht, ob das H19-Gen eine Antisense-RNA transkribiert, da es gemeinsam mit dem IGF-II genomisch geprägt ist und eine Antisense-Regulation dabei eine Rolle spielen könnte.

L6 Zellen exprimierten H19 mRNA, die allerdings nicht mehr nachgewiesen werden konnte, wenn die Zellen mit pEGFP/IGF-II transfiziert waren. Dies war zu erwarten, da beschrieben ist, daß die Expression des IGF-II und H19 invers korreliert¹³¹. Dahingegen konnte eine IGF-II-Antisense-RNA in allen Fällen, d.h. in transfizierten und nicht transfizierten L6 Zellen detektiert werden.

Im fetalen Muskel der Ratte wird H19 nicht exprimiert. Dahingegen wurde in der Maus die H19 Transkription in einer Reihe von Organen in einer bestimmten Periode der fetalen Entwicklung gefunden⁶³. Aber erst im Erwachsenenalter wird H19 deutlich transkribiert⁶². Diese findet im Herzmuskel und im Skelettmuskel statt. In der Maus wurde eine RNA von 2.5 kb beschrieben, die keinen offenen Leserahmen aufweist. Das Gen liegt 90 kb 3' des IGF-II⁶⁴ und wird in die gleiche Richtung transkribiert. Unter Verwendung einer cDNA-Sonde der Ratte konnte auch das menschliche H19-Gen lokalisiert und auf seine Expression hin untersucht werden. Das humane H19-Gen ist 2.7 kb groß. Leibovitch⁶² beschrieb als Einziger eine Translation des H19-Gens in adulten humanen Skelettmuskelzellen.

Auch in unseren Modellen der IGF-II transgenen Mäuse und der L6 Zellen konnte eine H19 mRNA von 2.0 kb im Herzen und im Skelettmuskel detektiert werden. Im Schweineherzen konnte H19 allerdings nicht nachgewiesen werden. Mögliche Erklärungen sind, daß das ausgewählte Oligonukleotid keine Homologie zum porcinen H19 hat oder dieses nicht exprimiert wird.

In mehreren Zellen wurde beschrieben, daß H19 nicht invers sondern positiv mit IGF-II reguliert wird. Koordinierte Regulation wurde für H19 und IGF-II in embryonalen Mauszellen (Somatische Zellkultur) von Eversole-Cire¹³² wie auch für Rattenfibroblasten¹¹¹ beschrieben. Weiterhin konnte Kiess¹³³ anhand einer IGF-II-Überexpression in humanen embryonalen Nierenfibroblasten zeigen, daß die Überexpression des IGF-II keinen Einfluß auf die Expression des H19 hat. Dahingegen zeigte Li¹³⁴ Daten, die belegten, daß H19 die zytoplasmatische Menge an IGF-II mRNA verändern kann. Weiterhin fand er eine verringerte Assoziation der IGF-II mRNA mit Polysomen. Aufbauend auf diesen Ergebnissen transfizierten Wilkin und Mitarbeiter¹³⁵ diHepG2 Zellen mit Sense - oder Antisense-Konstrukten des H19 und untersuchten die Expression des IGF-II. In Antisense-transfizierten Zellen wurde das meiste IGF-II (6.0 und 2.3 kb mRNAs, generiert durch Promotor P3) detektiert. H19 mRNA wurde nur in H19 Sense-transfizierten Zellen detektiert. Die H19 Antisense-Expression war geringer als die der Sense-Konstrukte, dennoch war die IGF-II-Menge in diesen Klonen am höchsten. Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der H19-Antisense-RNA und der IGF-II-Expression.

In unserem System der IGF-II transfizierten Zellen wurde eine Abnahme der H19 Sense-Expression in den transfizierten Zellen gefunden, wohingegen die Antisense-RNA konstitutiv exprimiert wurde. Dies entspricht umgekehrt den von Li¹³⁴ beschriebenen Ergebnissen. Differenzierung zu Myotuben war nur in den nicht transfizierten Zellen zu verzeichnen. In diesen Zellen wurde auch H19 Sense-mRNA transkribiert. Dies ist mit den Resultaten von Davis¹²⁷ vergleichbar.

H19, das auch als Tumorsuppressorgen beschrieben ist, kann in den transfizierten Zellen diese Funktion nicht mehr wahrnehmen. Die transfizierten Zellen sind verändert und können sich nicht zu Myotuben differenzieren. Es wurde von Steenman¹³¹ beschrieben, daß im Wilms' Tumor die H19 Transkription durch ein LOI des IGF-II und damit durch die erhöhte Expression des IGF-II um 80 % reduziert wurde. Außerdem ist eine Überexpression an IGF-II in vielen Tumoren beschrieben, wohingegen H19 Eigenschaften eines Tumorsuppressorgens zugeschrieben werden. Im Gegensatz zur reziproken Kopplung des IGF-II und H19 (in Wilms' Tumor) hat in der Plazenta eine biallelische Transkription des H19 keinen Effekt auf die Expression des IGF-II. Han⁶¹ konnte zeigen, daß H19 Expression in Muskelzellen mit bestimmten Differenzierungsprozessen einhergeht. Die H19 Expression wurde nur in nicht-proliferierenden, Aktin-positiven Zellen gefunden. H19 scheint das „Imprintor gene“ bezüglich IGF-II zu sein und arbeitet damit als Repressor *in cis*⁵⁴. Auf der einen Seite ist die H19 mRNA nicht notwendig, um die geprägte Expression des IGF-II zu erhalten und auf der anderen Seite spielt die Abwesenheit der H19 Transkription nicht immer eine Rolle bei der Induktion einer biallelischen Expression des IGF-II¹³⁶⁻¹³⁹.

Auch in den IGF-II transfizierten Zellen, die das „exogene“ EGFP/IGF-II exprimieren, ist die Expression des H19 reduziert. Zusammen mit der veränderten Morphologie und der Unfähigkeit zur Differenzierung passen diese Ergebnisse ins Bild eines Tumorsuppressorgens. Die Zellen proliferieren auch unter Differenzierungsbedingungen und zeigen eine veränderte Morphologie. Umgekehrt betrachtet ist IGF-II an Tumorentstehung beteiligt. In den hier beschriebenen Zellen ist das endogene IGF-II reduziert und die Expression des exogenen IGF-II entspricht nicht der

Menge des endogenen IGF-II in den nicht transfizierten Zellen. Man könnte also davon ausgehen, daß das Protein selbst nicht unbedingt der ausschlaggebende Faktor dafür ist.

Genauere Expression des IGF-II und H19 wurde in embryonalen Leberzellen an Tag 13.5 der Embryonalentwicklung in der Maus mit einer RNA-FISH-Technik von Jouvent et al.¹³⁹ untersucht. Sie konnten zeigen, daß die RNAs von H19 und IGF-II unterschiedlich transkribiert werden. Jede Zelle durchläuft unterschiedliche Transkriptionsstadien während des Zellzykluses und enthält damit unterschiedliche Zusammensetzungen der H19- und IGF-II-Transkripte. Ein Großteil der Zellen transkribieren nur ein Allel von H19 oder von IGF-II, 20 % haben entweder monoallelische oder biallelische Expression eines der beiden Gene und nur 24 % zeigen eine H19-abhängige Expression des IGF-II. H19 Expression hat somit einen negativen Effekt auf die des IGF-II. Die biallelische Expression war höher als aus anderen Arbeiten zu erwarten gewesen wäre. Zusätzlich konnten sie zeigen, daß das paternale Transkript des H19 hauptsächlich im Kern vorhanden war und im Zytoplasma das maternale Transkript vorherrschte. Es besteht die Möglichkeit, daß das paternale Allel weniger stabil als das maternale ist. Dafür könnten RNA-bindende Proteine verantwortlich sein.

Schlußfolgerungen aus unseren Befunden sind, daß IGF-II einen Einfluß auf die Expression der H19 Sense-mRNA und der IGF-II-Antisense-RNA hat. Es hat aber keinen Einfluß auf die Transkription der Antisense-RNA des H19. Umgekehrt scheint IGF-II in seiner Expression nicht von H19 beeinflusst zu sein. Die Überexpression des IGF-II in den Zellen reduziert somit die Transkription des H19, welches nicht mehr als Tumorsupressorgen wirken kann. Die Zellen verändern sich und gleichzeitig wirkt das IGF-II als „Protooncogen“, was einhergeht mit der Unfähigkeit zur Differenzierung der Zellen.

4.4.7 Einfluß des IGF-II auf die Expression von Aktin

IGFs sind auch als Motilitätsfaktoren beschrieben. Viele Zellen, wie z. B. Osteoblasten¹⁴⁰, wandern in Richtung einer IGF-II-Quelle. IGF kann Tumorzellen^{141,142} zur Wanderung anregen wie auch eine Verlängerung von Axonen induzieren^{143,144}. Die IGF-II-Stimulation läuft über zwei verschiedene Rezeptoren. So ist der IGF-I-R für den Bereich der Proliferation zuständig und

der Typ II-Rezeptor übermittelt die Zellbewegung. Aktin gibt es in verschiedenen Isoformen. Beta-Aktin und gamma-Aktin liegen im Zytoplasma vor, während alpha-Aktin eine Komponente der Muskelfilamente ist. In Muskelzellkulturen werden beta- und gamma-Aktin synthetisiert, während alpha-Aktin ein Hauptprodukt in Myotuben ist ¹⁴⁵⁻¹⁴⁸. Levinovitz zeigte 1992 ¹⁴⁹, daß die IGFs eine wesentliche Rolle bei der Differenzierung von Skelettmuskelzellen haben und dies einhergeht mit der beschriebenen Veränderung in der Expression der unterschiedlichen Aktin-Isoformen ¹⁴⁹. Muskeldifferenzierung beinhaltet einen deutlichen Wechsel in der Zellarchitektur. Hierbei wird die nicht-muskelspezifische Isoform des Aktin gegen die muskelspezifische Isoform getauscht.

In unserem Zellkultursystem der pEGFP/IGF-II transfizierten Zellen konnte eine Abnahme der muskelspezifischen Expression des Aktin in den transfizierten Zellen im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen im Western Blot gefunden werden. Der verwendete Antikörper erkennt muskuläres alpha- und gamma-Aktin, das bedeutet, daß er in erster Linie das gamma-Aktin in den nicht differenzierten Myoblasten erkennt. Gamma-Aktin liegt im Zytoplasma vor, welches in den transfizierten Zellen im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen verändert scheint. Diese morphologische Veränderung findet auch im Zytoplasma statt, was die Veränderung in der Aktin Expression erklären könnte.

4.5 Imprinting und Antisense-Regulation des IGF-II / H19-Systems

IGF-II wird auf unterschiedliche Weise reguliert. Es ist bekannt, daß ein genomischer Stempel bei IGF-II und bei H19 vorliegt. Das IGF-II-Gen hat einen genomischen Stempel auf dem maternalen Allel, d.h. nur das paternale Allele wird transkribiert, das H19-Gen ist umgekehrt geprägt. Neben diesem epigenetischen Mechanismus kann die Genexpression auch auf Transkriptionsebene gehemmt werden. Es gibt genetische Mechanismen wie Antisense-RNA, die mit der Sense-mRNA hybridisieren kann und daher eine Translation verhindert; "Silencer" sind bekannt, die von vornherein die Transkription verhindern. Es wurde beschrieben, daß die Anwesenheit von

Antisense-RNA ein zusätzlicher Faktor sein kann, um die Verfügbarkeit der Sense-mRNA zu regulieren.

Im Schweineherzen konnten mehrere und in unserem Zellkulturmodell konnte eine 2 kb IGF-II Antisense-RNA nachwiesen werden. Bei Überexpression des IGF-II in den L6 Myoblasten war sie nicht zu detektieren. Unsere Ergebnisse weisen auf eine Antisense-RNA abhängige Regulation des IGF-II hin. Hybridisierung der Antisense-RNA an eine wachsende mRNA führt zu einem vorzeitigen Ende der Transkription ¹⁵⁰. Die Ziel-mRNA wird durch einen RNase II-abhängigen Mechanismus abgebaut. Antisense-RNA hybridisiert mit der Sense-mRNA und die Translation kommt zum Erliegen ¹⁵¹ oder Antisense-RNA induziert irreversible Modifikationen der Ziel-mRNA ¹⁵². Daher können wir auch im Falle des IGF-II davon ausgehen, daß neben der epigenetischen Regulation des Imprinting auch die Antisense-RNA in diese Regulation eingreift und diesen Mechanismus reguliert. Außerdem wurden sowohl H19 Sense-mRNA als auch Antisense-RNA in unseren Systemen der IGF-II transgenen Mäuse und der transfizierten Zellen nachgewiesen. Neben der gegensätzlichen Prägung des IGF-II und des H19 scheint eine Regulation der beiden Gene auf RNA-Ebene zu erfolgen.

5 Literatur

1. Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem.* 1978;253:2769-2776.
2. Rinderknecht E, Humbel RE. Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett.* 1978;89:283-286.
3. Valenzano KJ, J. R, P. L. Soluble insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor carries multiple high molecular weight forms of insulin-like growth factor II in fetal bovine serum. *J Biol Chem.* 1995;270:16441-16448.
4. Valenzano KJ, Heath-Monnig E, Tollefsen SE, Lake M, Lobel P. Biophysical and biological properties of naturally occurring high molecular weight insulin-like growth factor II variants. *J Biol Chem.* 1997;272:4804-4813.
5. Yang G-H, Kim H-S, Wilson EM, Rosenfeld RG, Oh Y. Identification of Glycosylated 38-kDa Connective Tissue Growth Factor (IGFBP-Related Protein 2) and Proteolytic Fragments in human Biological Fluids, and Up-Regulation of IGFBP-rP2 Expression by TGF-beta in Hs578T Human Breast Cancer Cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1998;83:2593-2596.
6. Kim H-S, Nagalla SR, Oh S, Wilson E, Roberts J, C.T, Rosenfeld RG. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): Characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:12981-12986.
7. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The Insulin-like Growth factor-binding Protein (IGFBP) Superfamily. *Endocrine Reviews.* 1999;20:761-787.
8. Humbel RE. Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem.* 1990;190:445-462.
9. Froesch ER, Zapf J. Insulin-like growth factors and insulin: comparative aspects. *Diabetologia.* 1985;28:485-493.
10. Cohick WS, Clemmons DR. The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol.* 1993;55:131-153.
11. Bar RS, Siddle K, Dolash S, Boes M, Dake B. Actions of insulin and insulinlike growth factors I and II in cultured microvessel endothelial cells from bovine adipose tissue. *Metabolism.* 1988;37:714-720.
12. Bar RS, Boes M, B.L. D, B.A. B, Henley SA, Sandra A. Insulin, insulin-like growth factors, and vascular endothelium. *Am J Med.* 1988;85:59-70.
13. Nakao-Hayashi J, Ito H, Kanayasu T, Morita I, Murota S. Stimulatory effects of insulin and insulin-like growth factor I on migration and tube formation by vascular endothelial cells. *Atherosclerosis.* 1992;92:141-9.
14. Noveral JP, Bhala A, Hintz RL, Grunstein MM, Cohen P. Insulin-like growth factor axis in airway smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1994;267:L761-765.

15. Kuemmerle JF. Endogenous IGF-I regulates IGF binding protein production in human intestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;278:G710-717.
16. Froesch ER, Schmid C, Schwander J, Zapf J. Actions of insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol.* 1985;47:443-67.
17. Clemmons DR, Van Wyk JJ. Evidence for a functional role of endogenously produced somatomedinlike peptides in the regulation of DNA synthesis in cultured human fibroblasts and porcine smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1985;75:1914-8.
18. Clemmons DR. IGF binding proteins: regulation of cellular actions. *Growth Regul.* 1992;2:80-7.
19. Conover CA, Rosenfeld RG, Hintz RL. Insulin-like growth factor II binding and action in human fetal fibroblasts. *J Cell Physiol.* 1987;133:560-566.
20. Akaogi K, Sato J, Okabe Y, Sakamoto Y, Yasumitsu H, Miyazaki K. Synergistic growth stimulation of mouse fibroblasts by tumor-derived adhesion factor with insulin-like growth factors and insulin. *Cell Growth Differ.* 1996;7:1671-1677.
21. Schmid C, Steiner T, Froesch ER. Preferential enhancement of myoblast differentiation by insulin-like growth factors (IGF I and IGF II) in primary cultures of chicken embryonic cells. *FEBS Lett.* 1983;161:117-121.
22. Schmid C, Steiner T, Froesch ER. Insulin-like growth factor I supports differentiation of cultured osteoblast-like cells. *FEBS Lett.* 1984;173:48-52.
23. Magri KA, Ewton DZ, Florini JR. The role of the IGFs in myogenic differentiation. *Biology Department, Syracuse University, NY 13244.* 1991;57-76.
24. Mangiacapra FJ, Roof SL, Ewton DZ, Florini JR. Paradoxical decrease in myf-5 messenger RNA levels during induction of myogenic differentiation by insulin-like growth factors. *Mol Endocrinol.* 1992;6:2038-44.
25. Battler A, Goldberg DHI, Ohad D, Di Segni E, Bor A, Varda-Bloom N, Vered Z, Kornowski R, Lake M, Nass D, Savion N. Exogenous insulin-like growth factor II enhances post-infarction region myocardial function in swine. *European Heart Journal.* 1995;16:1851-1859.
26. Vogt AM, Htun P, Kluge A, Zimmermann R, Schaper W. Insulin-like growth factor II delays myocardial infarction in experimental coronary artery occlusion. *Cardiovasc Res.* 1997;33:469-477.
27. Kluge A, Zimmermann R, Munkel B, Verdouw PD, Schaper J, Schaper W. Insulin-like growth factor II is an experimental stress inducible gene in a porcine model of brief coronary occlusions. *Cardiovasc Res.* 1995;29:708-716.
28. Liu Q, Yan H, Dawes NJ, Mottino GA, Frank JS, Zhu H. Insulin-like growth factor II induces DNA synthesis in fetal ventricular myocytes in vitro. *Circ Res.* 1996;79:716-726.

29. DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature*. 1990;345:78-80.
30. DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*. 1991;64:849-859.
31. Kittur SD, Hoppener JWM, Antonarakis SE, Daniels JDJ, Meyers BD, Maestri NE, Jansen M, Korneluk RG, Nelkin BD, Kazazian J, H. H. Linkage map of the short arm of human chromosome 11: Location of the genes for catalase, calcitonin, and insulin-like growth factor II. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82:5064-5067.
32. Brissenden JE, Ullrich A, Francke U. Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. *Nature*. 1984;310:781-784.
33. Tricoli JV, Rall LB, Scott J, Bell GI, Shows TB. Localization of insulin-like growth factor genes to human chromosome 11 and 12. *Nature*. 1984;310:784-786.
34. de Pagter-Holthuizen P, Hoppener JW, Jansen M, Geurts van Kessel AH, van Ommen GJ, Sussenbach JS. Chromosomal localization and preliminary characterization of the human gene encoding insulin-like growth factor II. *Hum Genet*. 1985;69:170-173.
35. Bell GI, Gerhard DS, Fong NM, Sanchez-Pescador R, Rall LB. Isolation of the human insulin-like growth factor genes: insulin-like growth factor II and insulin genes are contiguous. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82:6450-4.
36. Taylor ER, Seleiro EAP, Brickell PM. Identification of antisense transcripts of the chicken insulin-like growth factor-II gene. *J Mol Endocrinol*. 1991;7:145-154.
37. Moore T, Constancia M, Zubair M, Bailleul B, Feil R, Sasaki H, Reik W. Multiple imprinted sense and antisense transcripts, differential methylation and tandem repeats in a putative imprinting control region upstream of mouse IGF2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:12509-12514.
38. Wentworth BM, Schaefer IM, Villa-Komaroff L, Chirgwin JM. Characterization of the two nonallelic genes encoding mouse preproinsulin. *J Mol Evol*. 1986;23:305-312.
39. Sasaki H, Shimozaki K, Zubair M, Aoki N, Ohta K, Hatano N, Moore T, Feil R, Constancia M, Reik W, Rotwein P. Nucleotide sequence of a 28-kb mouse genomic region comprising the imprinted Igf2 gene. *DNA Research*. 1996;3:331-335.
40. de Pagter-Holthuizen P, Janse M, van der Kammen RA, van Schaik FM, Sussenbach JS. Differential expression of the human insulin-like growth factor II gene. Characterization of the IGF-II mRNAs and an mRNA encoding a putative IGF-II-associated protein. *Laboratory for Physiological Chemistry*. 1988;950:282-95.
41. Holthuizen PE, Cleutjens CBJM, Veenstra GJC, van der Lee FM, Koonen-Reemst AMCB, Sussenbach JS. Differential expression of the human, mouse and rat IGF-II genes. *Regulatory Peptides*. 1993;48:77-89.
42. Sussenbach JS, Steenbergh PH, Holthuizen P. Structure and expression of the human insulin-like growth factor genes. *Growth Regulation*. 1992;2:1-9.

43. Hedley PE, Dalin AM, Engstromm W. Developmental regulation of insulin like growth factor II gene expression in the pig. *Cell Biol Int Rep.* 1989;13:857-862.
44. Nilsson C, Blay P, Nielsen FC, Gammeltoft S. Gene Expression and Receptor Binding of Insulin-Like Growth Factor-II in Pig choroid Plexus Epithelial Cells. *J Neurochem.* 1992;58:923-930.
45. Bell GI, Merryweather JP, Sanchez-Pescador R, Stempien MM, Priestley L, Scott J, Rall LB. Sequence of a cDNA clone encoding human preproinsulin-like growth factor II. *Nature.* 1984;310:775-777.
46. Dull TJ, Gray A, Hayflick JS, Ullrich A. Insulin-like growth factor II precursor gene organization in relation to insulin gene family. *Nature.* 1984;310:777-781.
47. Morison IM, Reeve AE. Insulin-like growth factor 2 and overgrowth: molecular biology and clinical implications. *Mol Med Today.* 1998;1998:110-115.
48. de Pagter-Holthuisen P, Jansen M, van Schaik FM, van der Kammen R, Oosterwijk C, Van den Brande JL, Sussenbach JS. The human insulin-like growth factor II gene contains two development-specific promoters. *FEBS Lett.* 1987;214:259-64.
49. Gray A, Tam AW, Dull TJ, Hayflick J, Pintar J, Cavenee WK, Koufos A, Ullrich A. Tissue-specific and developmentally regulated transcription of the insulin-like growth factor 2 gene. *DNA.* 1987;6:283-95.
50. Irminger JC, Rosen KM, Humbel RE, Villa-Komaroff L. Tissue-specific expression of insulin-like growth factor II mRNAs with distinct 5' untranslated regions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84:6330-4.
51. Nielsen FC, Christiansen J. Endonucleolysis in the Turnover of Insulin-like Growth Factor II. *The Journal of Biological Chemistry.* 1992;267:19404-19411.
52. Decker RS, Cook MG, Behnke-Barclay M, Decker ML. Some growth factors stimulate cultured adult rabbit ventricular myocyte hypertrophy in the absence of mechanical loading. *Circ Res.* 1995;77:544-555.
53. Barlow DP. Imprinting: a gamete's point of view. *Trends Genet.* 1994;10:194-9.
54. Barlow DP. Competition--a common motif for the imprinting mechanism? *EMBO J.* 1997;16:6899-905.
55. Issa J-PJ, Vertino PM, Boehm CD, Newsham IF, Baylin SB. Switch from monoallelic to biallelic human IGF2 promoter methylation during aging and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:11757-11762.
56. Vu TH, Hoffman AR. Alterations in the Promoter-specific Imprinting of the Insulin-like Growth Factor-II Gene in Wilms' Tumor. *Journal of Biological Chemistry.* 1996;271:9014-9023.
57. Wu H-K, Weksberg R, Minden MD, Squire JA. Loss of imprinting of human Insulin-like Growth Factor II gene, IGF2, in acute myeloid leukemia. *Biochemical and Biophysical research communication.* 1997;231:466-472.

58. Reik W, Constancia M. Making sense or antisense. *Nature*. 1997;389:669-671.
59. Reik W, Walter J. Evolution of Imprinting mechanism: the battle of the sexes begins in the zygote. *Nature Genetics*. 2001;27:255-256.
60. Banerjee S, Smallwood A. A chromatin model of IGF2/H19 imprinting. *Nat Genet*. 1995;11:237-238.
61. Han DK, Khaing ZZ, Pollock RA, Haudenschild CC, Liau G. H19, a marker of developmental transition, is reexpressed in human atherosclerotic plaques and is regulated by the insulin family of growth factors in cultured rabbit smooth muscle cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1996;97:1276-1285.
62. Leibovitch MP, Nguyen VC, Gross MS, Solhonne B, Leibovitch SA, Berheim A. The human ASM (adult skeletal muscle) gene: expression and chromosomal assignment to 11p15. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;180:1241-1250.
63. Bartolomei MS, Zemel S, Hochberg A. Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature*. 1991;351:153-155.
64. Zemel S, Bartolomei MS, Tilghman SM. Physical linkage of two mammalian imprinted genes, H19 and insulin-like growth factor 2. *Genet*. 1992;2:61-65.
65. O'Dell SD, Day INM. Molecules in focus, Insulin-like growth factor II (IGF-II). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1998;30:767-771.
66. Terasawa H, Kohda D, Hatanaka H, Nagata K, Higashihashi N, Fujiwara H, Sakano K, Inagaki F. Solution structure of human insulin-like growth factor II; recognition sites for receptors and binding proteins. *EMBO J*. 1994;13:5590-7.
67. Stempien MM, Fong NM, Rall LB, Bell GI. Sequence of a placental cDNA encoding the mouse insulin-like growth factor II precursor. *DNA*. 1986;5:357-361.
68. Steele-Perkins G, Turner J, Edman JC, Hari J, Pierce SB, Stover C, Rutter WJ, Roth RA. Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem*. 1988;263:11486-92.
69. Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen Eea. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J*. 1986;5:2503-12.
70. Oka Y, Rozek LM, Czech MP. Direct demonstration of rapid insulin-like growth factor II Receptor internalization and recycling in rat adipocytes. Insulin stimulates 125I-insulin-like growth factor II degradation by modulating the IGF-II receptor recycling process. *J Biol Chem*. 1985;260:9435-42.
71. Nielsen FC, Wang E, Gammeltoft S. Receptor binding, endocytosis, and mitogenesis of insulin-like growth factors I and II in fetal rat brain neurons. *J Neurochem*. 1991;56:12-21.
72. Auletta M, Nielsen FC, Gammeltoft S. Receptor-mediated endocytosis and degradation of insulin-like growth factor I and II in neonatal rat astrocytes. *J Neurosci Res*. 1992;31:14-20.

73. Clemmons DR, Jones JJ, Busby WH, Wright G. Role of insulin-like growth factor binding proteins in modifying IGF actions. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;692:10-21.
74. Clemmons DR. IGF binding proteins and their functions. *Mol Reprod Dev.* 1993;35:368-74.
75. Drop SL, Schuller AG, Lindenbergh-Kortleve DJ, Groffen C, Brinkman A, Zwarthoff EC. Structural aspects of the IGFBP family. *Growth Regul.* 1992;2:69-79.
76. Schuller AG, Groffen C, van Neck JW, Zwarthoff EC, Drop SL. cDNA cloning and mRNA expression of the six mouse insulin-like growth factor binding proteins. *Mol Cell Endocrinol.* 1994;104:57-66.
77. Martin JL, Ballesteros M, Baxter RC. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and transforming growth factor-beta 1 release IGF-binding protein-3 from human fibroblasts by different mechanisms. *Endocrinology.* 1992;131:1703-10.
78. Martin JL, Baxter RC. Inhibition of human fibroblast insulin-like growth factors binding protein (IGFBP) production by IGFBP-3. *Endocrinology.* 1992;131:1568-70.
79. Liu L, Delbé J, Blat C, Zapf J, Harel L. Insulin-like Growth Factor Binding Protein (IGFBP-3), an Inhibitor of Serum Growth Factors other than IGF-I and IGF-II. *Journal of Cellular Physiology.* 1992;153:15-21.
80. Conover CA, Clarkson JT, Bale LK. Phorbol ester tumor promoters regulate insulin-like growth factor-binding protein-4 proteolysis. *Endocrinology.* 1993;133:1347-51.
81. Fowlkes J, Freemark M. Evidence for a novel insulin-like growth factor (IGF)-dependent protease regulating IGF-binding protein-4 in dermal fibroblasts. *Endocrinology.* 1992;131:2071-6.
82. Ogawa O, Becroft DM, Morison IM, Eccles MR, Skeen JE, Mauger DC, Reeve AE. Constitutional relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting associated with Wilms' tumour and gigantism. *Nat Genet.* 1993;5:408-412.
83. Ogawa O, Eccles MR, Szeto J, McNoe LA, Yun K, Maw MA, Smith PJ, Reeve AE. Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature.* 1993;362:749-751.
84. Morison IM, Becroft DM, Taniguchi T, Woods CG, Reeve AE. Somatic overgrowth associated with overexpression of insulin-like growth factor II. *Nat Med.* 1996;2:311-6.
85. Brown KW, Gardner A, Williams JC, Mott MG, McDermott A, Maitland NJ. Paternal origin of 11p15 duplications in the Beckwith-Wiedemann syndrome. A new case and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet.* 1992;58:66-70.
86. Weksberg R, Shen DR, Fei YL, Song QL, Squire J. Disruption of insulin-like growth factor 2 imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet.* 1993;5:143-150.
87. Han VK, D'Ercole AJ, Lund PK. Cellular localization of somatomedin (insulin-like growth factor) messenger RNA in the human fetus. *Science.* 1987;236:193-7.

88. Rall LB, Scott J, Bell GI. Human insulin-like growth factor I and II messenger RNA: isolation of complementary DNA and analysis of expression. *Methods Enzymol.* 1987;146:239-48.
89. Leaman DW, Simmen FA, Ramsay TG, White ME. Insulin-like growth factor-I and -II messenger RNA expression in muscle, heart, and liver of streptozotocin-diabetic swine. *Endocrinology.* 1990;126:2850-7.
90. Murphy LJ, Bell GI, Friesen HG. Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology.* 1987;120:1279-82.
91. Turner JD, Rotwein P, Novakofski J, Bechtel PJ. Induction of mRNA for IGF-I and -II during growth hormone-stimulated muscle hypertrophy. *Am J Physiol.* 1988;255:E513-7.
92. Beck F, Samani NJ, Penschow JD, Thorley B, Tregear GW, Coghlan JP. Histochemical localization of IGF-I and -II mRNA in the developing rat embryo. *Development.* 1987;101:175-84.
93. Park GH, Buetow DE. Genes for insulin-like growth factors I and II are expressed in senescent rat tissues. *Gerontology.* 1991;37:310-6.
94. Reimer KA, Jennings RB. Myocardial ischemia, hypoxia, and infarction. In: Fozzar HA, Haber E, Jennings RB, eds. *The heart and cardiovascular research.* New York: Raven Press, Ltd.; 1992: 1875-1973.
95. Heyndrichx GB, Baig H, Nellens P, Leusen I, Fishbein MC, Vattner SF. Depression of regional blood flow and wall thickening after brief coronary occlusion. *Am J Physiol.* 1979;234:H653-H659.
96. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74:1124-1136.
97. Schaper W. Development and role of coronary collaterals. *Trends Cardiovasc Med.* 1991;1:256-261.
98. Akada R. Quick-check method to test the size of Escherichia coli plasmids. *BioTechniques.* 1994;17:58.
99. Wang L-F, Voysey R, Yu M. Simplified large-scale alkaline lysis preparation of plasmid DNA with minimal use of phenol. *BioTechniques.* 1994;17:26-28.
100. *Current protocols in Molecular Biology*; Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, Ed.; John Wiley & Sons: New York, 1995; Vol. 1, 2, 3.
101. Hogan B, Beddington R, Constantini F, Lacy E. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994
102. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-159.
103. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 1983;132:6-13.

104. Sanger F, Niklen S, Coulson AR. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1977;74:5463-5467.
105. Franz WM, Breves D, Klingel K, Brem G, Hofschneider PH, Kandolf R. Heart-specific targeting of firefly luciferase by the myosin light chain-2 promoter and developmental regulation in transgenic mice. *Circ Res.* 1993;73:629-638.
106. Rotwein P, Hall LJ. Evolution of insulin-like growth factor II: characterization of the mouse IGF-II gene and identification of two pseudo-exons. *DAN Cell Biol.* 1990;9:725-735.
107. van Dijk EL, Sussenbach JS, Holthuisen PE. Distinct RNA Structural Domains Cooperate to Maintain a Specific Cleavage Site in the 3'UTR of IGF-II mRNAs. *JMB.* 2000;300:449-467.
108. Nielsen FC, Østergaard L, Nielsen J, Christiansen J. Growth-dependent translation of IGF-II mRNA by a rapamycin-sensitive pathway. *Nature.* 1995;377:358-362.
109. Lau MMH, Stewart CEH, Liu Z, Bhatt H, Rotwein P, Stewart CL. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes Dev.* 1994;8:2953-2963.
110. Brunkow ME, Tilghman SM. Ectopic expression of the H19 gene in mice causes prenatal lethality. *Genes Dev.* 1991;5:1092-1101.
111. Ungaro P, Casola S, Vernucci M, Pedone PV, Bruni CB, Riccio A. Relaxation of insulin-like growth factor-2 imprinting in rat cultured cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1997;135:153-163.
112. Rheinhardt A, Hubbard T. Using neural networks for prediction of the subcellular localisation of proteins. *Nucleic Acids Research.* 1998;26:2230-2236.
113. Florini JR, Magri KA, Ewton DZ, James PL, Grindstaff K, Rotwein PS. "Spontaneous" differentiation of skeletal myoblasts is dependent upon autocrine secretion of insulin-like growth factor-II. *J Biol Chem.* 1991;266:15917-15923.
114. Florini JR, Ewton DZ, Magri KA, Mangiacapra FJ. IGFs and muscle differentiation. *Adv Exp Med Biol.* 1993;343:319-326.
115. Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev.* 1996;17:481-517.
116. Ewton DZ, Roof SL, Magri KA, McWade FJ, Florini JR. IGF-II is more active than IGF-I in stimulating L6A1 myogenesis: greater mitogenic actions of IGF-I delay differentiation. *J Cell Physiol.* 1994;161:277-284.
117. Rosenthal SM, Cheng ZQ. Opposing early and late effects of insulin-like growth factor I on differentiation and the cell cycle regulatory retinoblastoma protein in skeletal myoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:10307-10311.
118. Stewart CE, Rotwein P. Insulin-like growth factor-II is an autocrine survival factor for differentiating myoblasts. *J Biol Chem.* 1996;271:11330-11338.
119. Lawlor MA, Feng X, Everding DR, Sieger K, Stewart CE, Rotwein P. Dual control of muscle cell survival by distinct growth factor-regulated signaling pathways. *Mol Cell Biol.* 2000;20:3256-3265.

120. Lawlor MA, Rotwein P. Coordinate control of muscle cell survival by distinct insulin-like growth factor activated signaling pathways. *J Cell Biol.* 2000;151:1131-1140.
121. Lawlor MA, Rotwein P. Insulin-like growth factor-mediated muscle cell survival: central roles for Akt and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Mol Cell Biol.* 2000;20:8983-8995.
122. Florini JR, Ewton DZ, Falen SL, Van Wyk JJ. Biphasic concentration dependency of stimulation of myoblast differentiation by somatomedins. *Am J Physiol.* 1986;250:C771-778.
123. Foulstone EJ, Meadows KA, Holly JMP, Stewart CEH. Insulin-like Growth Factors (IGF-I and IGF-II) Inhibit C2 Skeletal Myoblast differentiation and Enhances TNF alpha-Induced Apoptosis. *Journal of Cellular Physiology.* 2001;189:207-215.
124. Magri KA, Benedict MR, Ewton DZ, Florini JR. Negative feedback regulation of insulin-like growth factor-II gene expression in differentiating myoblasts in vitro. *Endocrinology.* 1994;135:53-62.
125. Rosenthal SM, Hsiao D, Silverman LA. An insulin-like growth factor-II (IGF-II) analog with highly selective affinity for IGF-II receptors stimulates differentiation, but not IGF-I receptor down-regulation in muscle cells. *Endocrinology.* 1994;135:38-44.
126. Coolican SA, Samuel DS, Ewton DZ, McWade FJ. The mitogenic and myogenic actions of Insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *JBC.* 1997;272:6653-6662.
127. Davis RL, Weintraub H, Lasser AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell.* 1987;51:987-1000.
128. James PL, Stewart CE, Rotwein P. Insulin-like growth factor binding protein-5 modulates muscle differentiation through an insulin-like growth factor-dependent mechanism. *J Cell Biol.* 1996;133:683-693.
129. Tureckova J, Wilson EM, Cappalonga JL, Rotwein P. Insulin-like Growth Factor-mediated Muscle Differentiation. *JBC.* 2001;276:39264-39270.
130. Silvermann LA, Cheng ZQ, Hsiao D, Rosenthal SM. Skeletal muscle cell-derived insulin-like growth factor (IGF) binding proteins inhibit IGF-I-induced myogenesis in rat L6E9 cells. *Endocrinology.* 1995;136:720-726.
131. Steenman MJC, Rainier S, Dobry CJ, Grundy P, Horon IL, Feinberg AP. Loss of imprinting of IGF2 is linked to reduced expression and abnormal methylation of H19 in Wilms' tumour. *Nature Genetics.* 1994;7:433-439.
132. Eversole-Cire P, Ferguson-Smith AC, Surani MA, Jones PA. Coordinate regulation of Igf-2 and H19 in cultured cells. *Cell Growth Differ.* 1995;6:337-345.
133. Kiess W, Paquette J, Koepf G, Wolf E, Deal C. Proinsulin-like Growth Factor-II Overexpression Does Not Alter Monoallelic H19 Gene Expression in Transfected Human Embryonic Kidney Fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;255:226-230.

134. Li YM, Franklin G, Cui HM, Svensson K, He XB, Adam G, Ohlsson R, Pfeifer S. The H19 transcript is associated with polysomes and may regulate IGF2 expression in trans. *J Biol Chem.* 1998;273:28247-28252.
135. Wilkin F, Paquette J, Ledr E, Hamelin C, Pollak M, Deal CL, Mamelin C. H19 sense and antisense transgenes modify insulin-like growth factor-II mRNA levels. *Eur J Biochem.* 2000;267:4020-4027.
136. Schmidt JV, Levorse JM, Tilghman SM. Enhancer competition between H19 and Igf2 does not mediate their imprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:9733-9738.
137. Thorvaldsen JL, Duran KL, Bartolomei MS. Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2. *Genes Dev.* 1998;12:3693-3702.
138. Khosla S, Aitchison A, Gregory R, Allen ND, Feil R. Parental allele-specific chromatin configuration in a boundary-imprinting-control element upstream of the mouse H19 gene. *Mol Cell Biol.* 1999;19:2556-2566.
139. Jouvenot Y, Poirier F, Jami J, Paldi A. Biallelic transcription of Igf2 and H19 in individual cells suggests a post-transcriptional contribution to genomic imprinting. *Curr Biol* 1999 Oct 21;9(20):1199-202. 1999;9:1199-1202.
140. Panagakos FS. Insulin-like growth factors-I and -II stimulate chemotaxis of osteoblasts isolated from fetal rat calvaria. *Biochimie.* 1993;75:991-994.
141. Stracke ML, Engel JD, Wilson LW, Rechler MM, Liotta LA, Schiffmann E. The type I insulin-like growth factor receptor is a motility receptor. *JBC.* 1989;264:544-549.
142. Minniti CP, Kohn EC, Grubb JH, Sly WS, Oh Y, Muller HL, Rosenfeld RG, Helman LJ. The insulin-like growth factor II (IGF-II)/mannose 6-phosphate receptor mediates IGF-II-induced motility in human rhabdomyosarcoma. *JBC.* 1992;267:9000-9004.
143. Recio-Pinto E, Rechler MM, Ishii DN. Effects of insulin, insulin-like growth factor-II, and nerve growth factor on neurite formation and survival in cultured sympathetic and sensory neurons. *J Neurosci.* 1986;6:1211-1219.
144. Recio-Pinto E, Ishii DN. Insulin and insulin-like growth factor receptors regulating neurite formation in cultured human neuroblastoma cells. *Brain Res.* 1988;302:232-234.
145. Hunter T, Garrels JI. Characterization of the mRNAs for alpha-, beta- and gamma-actin. *Cell* 1977. 1977;12:767-781.
146. Katcoff D, Nudel U, Zevin-Sonkin D, Carmon Y, Shani M, Lehrach H, Frischauf AM, Yaffe D. Construction of recombinant plasmids containing rat muscle actin and myosin light chain DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77:960-964.
147. Shani M, Zevin-Sonkin D, Saxel O, Carmon Y, Katcoff D, Nudel U, Yaffe D. The correlation between the synthesis of skeletal muscle actin, myosin heavy chain, and myosin light chain and the accumulation of corresponding mRNA sequences during myogenesis. *Dev Biol.* 1981;86:483-492.

148. Caravatti M, Minty A, Robert B, Montarras D, Weydert A, Cohen A, Daubas P, Buckingham M. Regulation of muscle gene expression. The accumulation of messenger RNAs coding for muscle-specific proteins during myogenesis in a mouse cell line. *J Mol Biol.* 1982;160:59-76.
149. Levinovitz A, Jennisch E, Oldfors A, Edwall D. Activation of insulin-like growth factor II expression during skeletal muscle regeneration in the rat: correlation with myotube formation. *Molecular Endocrinology.* 1992;6:1227-1234.
150. Okamoto K, Freundlich M. Mechanism for the autogenous control of the crp operon: transcriptional inhibition by a divergent RNA transcript. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:5000-5004.
151. Krinke L, Wulff DL. OOP RNA, produced from multicopy plasmids, inhibits lambda cII gene expression through an RNase III-dependent mechanism. *Genes Dev.* 1987;1:1005-1013.
152. Kimelman D, Kirschner MW. An antisense mRNA directs the covalent modification of the transcript encoding fibroblast growth factor in *Xenopus* oocytes. *Cell.* 1989;59:687-696.

Abkürzungsverzeichnis

% w/v	Gewichtsvolumenprozent
μ	mikro
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AK	Antikörper
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
C	Grad Celsius
C/I	Chloroform / Isoamylalkohol
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie (1Ci = 3,7 x 10 ¹⁰ Bq)
cpm	counts per minutes (Zerfall pro Minute)
d(NTP)	Desoxyribonukleotid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Mischung aus Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	Et alii (lat.: und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal Bovine Serum
h	Stunden
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	Horseradish (Meerrettich)-Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IGF-I	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I
IGF-I-R	IGF Rezeptor Typ I
IGF-II	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor II
IGF-II	IGF Rezeptor Typ II
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactosid
K	Kontrolle
kb	Kilobasen

Abkürzungsverzeichnis

kD	Kilodalton
LAD	left anterior descending coronary artery
LOI	Loss of Imprinting
M	Molar
mA	Milliampère
MCS	Multiple cloning site
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger (Boten-) RNA
OD	Optische Dichte
P / C / I	Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SSC	standard saline citrat (Natriumchlorid-Citrat-Puffer)
ssDNA	salmon sperm DNA
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
ün	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolettes Licht (200-400 nm)
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen
Verd.	Verdünnung
Vol	Volumen
w/v	Gewicht zu Volumen
w/w	Gewicht zu Masse
WT	Wildtyp
xg	Erdbeschleunigung (9.81 m/s ²)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid