

Aus dem Institut für Tierzucht
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. Bernhard Aigner
und Prof. Dr. Eckhard Wolf

**Phänotypische und genotypische Charakterisierung der
ENU-induzierten Mausmutante SMA002 als Tiermodell für
Wachstumsdefizit und Hyperaktivität**

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

von
Maike Susanne Howaldt
aus
Glückstadt

München 2004

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. E. Wolf
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. W. Breuer

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis	Seite
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Mutagenesestrategien	2
2.1.1 Physikalische Mutagenese	3
2.1.2 DNA-Konstrukte	3
2.1.3 Chemische Mutagenese	4
2.2 Ethylnitrosourea (ENU) als Mutagen	4
2.2.1 Wirkungsweise und Dosierung	4
2.2.2 Geschlechtsspezifische Wirkung	6
2.2.3 ENU-Protokoll des Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekts	7
2.2.4 Weitere ENU-Mutagenese-Projekte	7
2.3 Etablierung von Mausmutanten als Tiermodelle	8
2.3.1 Charakterisierung des Phänotyps	8
2.3.2 Charakterisierung des Genotyps	9
2.3.2.1 Kandidatengenanalyse	9
2.3.2.2 Spezifischer Locus Test	9
2.3.2.3 Kartierung durch Kopplungsanalyse (Linkageanalyse)	10
2.3.3 Internetressourcen	11
2.4 Die klinische und klinisch-chemische Untersuchung von mutanten Mäusen	12
2.4.1 Untersuchungsspektrum	12
2.4.2 Diagnostische Relevanz	13
2.4.3 Einflussfaktoren auf die untersuchten Parameter	16
2.5 Syndrom „reduziertes Körperwachstum“	17
2.5.1 Hormonelle Wachstumsregulation	17
2.5.1.1 Das Insulin-like Growth Factor System	17
2.5.1.2 Veränderungen im Insulin-like Growth Factor System	19
2.5.2 Mangelernährung	20

2.6 Syndrom „Verhaltensänderungen“	22
2.6.1 Juckreiz (Pruritus)	22
2.6.1.1 Entzündliche Erkrankungen der Haut	22
2.6.1.2 Juckreiz ohne Entzündung der Haut	23
2.6.1.3 Neurophysiologische Aspekte von Juckreiz	23
2.6.2 Hyperaktives Verhalten	24
2.6.2.1 Restless Legs Syndrom	24
2.6.2.2 Verhaltensstörungen	24
2.6.2.3 Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Syndrom	25
3 Material und Methoden	26
3.1 Versuchstiere	26
3.1.1 Versuchstiere	26
3.1.2 Versuchstierzucht	26
3.1.2.1 Erhaltungszucht	26
3.1.2.2 Auszucht (Outcross)	27
3.1.2.3 Rückkreuzung (Backcross)	28
3.1.3 Tierhaltung	28
3.1.4 Tierversuch	29
3.2 Klinische Untersuchung	29
3.2.1 Verhaltensbeobachtung	29
3.2.2 Körpergewichtsentwicklung	30
3.2.3 Gruppenzugehörigkeit	30
3.2.4 Gruppenzuordnung der Auszucht- und Rückkreuzungstiere	30
3.3 Pathologische Untersuchung	31
3.3.1 Sektion	31
3.3.2 Organgewichtsbestimmung und Gewebefixierung	32
3.4 Untersuchung der Blutparameter	32
3.4.1 Blutentnahme und Probenaufbereitung	32
3.4.2 Klinische Chemie	32
3.4.3 Blutzellzählung mit dem Hämatologie-Analyser	34
3.4.4 Weiterführende Untersuchungen	34

3.5 Untersuchung von IGF-I, -II und IGF-Bindungsprotein 2	35
3.5.1 Probennahme	35
3.5.2 Radio-Immun-Assay (RIA)	35
3.6 Kartierung der Mutation	35
3.6.1 Tiermaterial	35
3.6.2 Probennahme	36
3.6.3 Isolation von genomischer DNA	36
3.6.4 Konzentrationsbestimmung der DNA	36
3.6.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
3.6.6 Agarose-Gelelektrophorese	37
3.6.7 Grobkartierung der Mutation durch Kopplungsanalyse (Linkageanalyse)	37
3.6.8 Feinkartierung der Mutation	41
3.7 Statistische Auswertung	41
4 Ergebnisse	43
4.1 Zucht	43
4.2 Syndrom „Verhaltensänderungen“	45
4.2.1 Genetischer Hintergrund: C3H	45
4.2.2 Genetischer Hintergrund: B6C3F1 und B6(B6C3) bzw. C3(B6C3)	45
4.3 Syndrom „reduziertes Körperwachstum“	48
4.3.1 Körpergewichtsentwicklung	48
4.3.1.1 SMA002-Tiere vom 0. bis zum 21. Lebenstag	48
4.3.1.2 SMA002-Tiere von der 3. bis zur 26. Lebenswoche	51
4.3.2 Körpermaße und Organgewichte	52
4.3.2.1 Absolute Körpermaße	53
4.3.2.2 Organgewichte	55
4.4 Klinisch-chemische und hämatologische Parameter	62
4.4.1 Ergebnisse der Varianzanalyse	62
4.4.2 Klinisch-chemische Parameter	62
4.4.2.1 Elektrolyte	64
4.4.2.2 Enzymaktivitäten	65

4.4.2.3 Substrate	66
4.4.2.4 Vergleich der klinisch-chemischen Werte der SMA002-Erhaltungszucht mit denen der C3H-Stammzucht	66
4.4.3 Hämatologische Parameter	70
4.4.3.1 Vergleich der hämatologischen Werte der SMA002-Erhaltungszucht mit denen der C3H-Stammzucht	71
4.5 IGF-I, IGF -II und IGFBP-2 Werte	72
4.6 Kartierung der Mutation	73
5 Diskussion	77
5.1 Vererbung und Zucht	77
5.2 Syndrom „Verhaltensänderungen“	78
5.2.1 Einfluss des genetischen Hintergrundes	78
5.2.2 Ausschluss von allergischen Reaktionen	78
5.2.3 Systemische Erkrankungen als Ursache für das veränderte Verhalten	80
5.2.4 Neurologische Störungen als Ursache für das veränderte Verhalten	80
5.3 Syndrom „reduziertes Körperwachstum“	81
5.3.1 Einfluss des genetischen Hintergrundes	81
5.3.2 Das IGF-System	82
5.3.3 Schilddrüsenfunktion	84
5.3.4 Weitere publizierte Wachstums-Mausmutanten	85
5.4 Klinische Chemie und Hämatologie	85
5.5 Kartierung der Mutation	87
5.6 Ausblick	88
6 Zusammenfassung	89
7 Summary	90
8 Literaturverzeichnis	91
9 Anhang	101

Verzeichnis der Abbildungen		Seite
Abbildung 1:	Strukturformel ENU	4
Abbildung 2:	Mechanismus der ENU-induzierten fehlerhaften Basenpaarung	6
Abbildung 3:	Kopplungsanalyse	11
Abbildung 4a-e:	Syndrom Verhaltensänderungen im Nest	46
Abbildung 5a:	SMA002-Wurfgeschwister im Alter von 9 Tagen	47
Abbildung 5b:	SMA002-Wurfgeschwister im Alter von 16 Tagen	47
Abbildung 5c:	Adulte SMA002-Weibchen im Alter von 6 Monaten	47
Abbildung 5d:	SMA002-Mutante (Mut) beim „Putzverhalten“	47
Abbildung 6:	Gewichtsentwicklung Jungtiere	48
Abbildung 7:	Gewichtsentwicklung Adult	51
Abbildung 8:	Körpergewicht weiblicher Hybridtiere	52
Abbildung 9:	Relatives abdominales Körperfett der weiblichen Hybridtiere	53
Abbildung 10:	Signifikante Unterschiede verschiedener Körpermaße	55
Abbildung 11a:	Relative Organgewichte mit signifikanten Unterschieden	60
Abbildung 11b:	Relative Organgewichte mit signifikanten Unterschieden	61
Abbildung 12:	Mittelwert und Standardabweichung der signifikant unterschiedlichen Elektrolytkonzentrationen	64
Abbildung 13:	Mittelwert und Standardabweichung der signifikant unterschiedlichen Enzymaktivitäten	65
Abbildung 14:	Mittelwert und Standardabweichung der signifikant unterschiedlichen Substratkonzentrationen	67
Abbildung 15:	Mittelwert und Standardabweichung der signifikant unterschiedlichen Serumkonzentrationen von IGF-I und IGFBP-2	73
Abbildung 16:	Feinkartierung der Mutation durch gelelektrophoretische Auftrennung	74
Abbildung 17:	Haplotypanalyse	75
Abbildung 18:	Molekulargenetische Kopplungskarte von Chromosom 13	76

Verzeichnis der Tabellen	Seite
Tabelle 1a-c: Überblick über Indikationen und Erkrankungen	
Tabelle 1a: Substrate	14
Tabelle 1b: Enzymaktivitäten	15
Tabelle 1c: Elektrolyte	16
Tabelle 2: Einteilung der Nährstoffe in zwei Kategorien	21
Tabelle 3: Verteilungsschema der Plasma- und Vollblutproben	33
Tabelle 4: Mit dem Hitachi 717 erfasste klinisch-chemische Parameter	33
Tabelle 5: Mit dem Hämatologie-Analyser erfasste Parameter	34
Tabelle 6a/b: Mikrosatellitenmarker der chromosomalen Kartierung	39
Tabelle 7: Mikrosatellitenmarker der Feinkartierung auf Chromosom 13	42
Tabelle 8: Zusammenfassung der Zuchtdaten der Linie SMA002	44
Tabelle 9: Körpergewichtsmittelwerte und Standardabweichung	50
Tabelle 10: Varianzanalyse der Körpermaße der SMA002-Hybriden	53
Tabelle 11: Mittelwert und Standardabweichung der absoluten Körpermaße	54
Tabelle 12: Varianzanalyse der Organgewichte der SMA002-Hybriden	56
Tabelle 13: Mittelwert und Standardabweichung der absoluten Organgewichte	57
Tabelle 14: Mittelwert und Standardabweichung der relativen Organgewichte	59
Tabelle 15: Varianzanalyse der klinisch-chemischen und hämatologischen Parameter der SMA002-Mäuse	63
Tabelle 16: Mittelwert und Standardabweichung der klinisch-chemischen Parameter der SMA002-Mäuse	68
Tabelle 17: Mittelwert und Standardabweichung sowie 5. und 95. Perzentile der klinisch-chemischen Parameter (Kontrolltiere C3H-Stammzucht)	69
Tabelle 18: Mittelwert und Standardabweichung der hämatologischen Parameter der SMA002-Mäuse	70
Tabelle 19: Mittelwert und Standardabweichung sowie 5. und 95. Perzentile der hämatologischen Parameter (Kontrolltiere C3H-Stammzucht)	71
Tabelle 20: Mittelwert und Standardabweichung der Parameter des IGF-Systems	73
Tabelle 21: Feinkartierung der SMA002-Mutation auf Chromosom 13	75
Tabelle 22: Körpergewichtsmittelwerte und Standardabweichung der SMA002-Nachkommen aus der Erhaltungszucht (adult)	101
Tabelle 23: Körpermaße und Organgewichte Hybridtiere	102
Tabelle 24: Körpermaße und Organgewichte Erhaltungszuchttiere	103
Tabelle 25: Gesundheitsüberwachung (Health Monitoring)	104

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AD	Atopische Dermatitis
ADHD	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Syndrom
Ak	Antikörper
ALT	Alanin- Aminotransferase (GPT / ALAT)
AMY	Amylase
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
AST	Aspatat- Aminotransferase (GOT / ASAT)
BC	Rückkreuzung, Backcross
B6	C57BL/6Jlco Mausinzuchtstamm
B6C3F1	erste Filialgeneration der Kreuzung von C57BL/6 ♀ x C3H ♂ (C57BL/6 x C3HeB/FeJ) F1
(B6C3)B6	erste Rückkreuzungsgeneration von B6C3 ♀ x C57BL/6 ♂ [(C57BL/6 x C3HeB/FeJ) F1 x C57BL/6] N2
B6(B6C3)	erste Rückkreuzungsgeneration von C57BL/6 ♀ x B6C3 ♂ [C57BL/6 x (C57BL/6 x C3HeB/FeJ) F1] N2
bzw.	beziehungsweise
Ca	Kalzium
ca.	circa
°C	Grad Celsius
C3H	C3HeB/FeJ Mausinzuchtstamm, -Stammzuchttiere
CHO	Cholesterin
CK	Kreatinkinase
Cl	Chlorid
cm	Zentimeter
cM	centi-Morgan
CREA	Kreatinin
d	Tag
DHGP	Deutsches Humangenomprojekt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
ENU	Ethylnitrosoharnstoff (- urea)
ES-Zellen	embryonalen Stammzellen
et al.	(et alteri, lat.) und andere
F1	erste Filialgeneration
Fa.	Firma

g	Gramm
GH	Growth hormone, Somatotropin, Wachstumshormon
GLS	Glukose
HGP	Humangenomprojekt
HSR	Harnsäure
HST	Harnstoff
Ig	Immunglobulin
IgA/-E/-M/-G3	Immunglobulin A/-E/-M/-G3
IGFBP 1-6	IGF-Bindungsproteine 1 bis 6
IGF-I/-II	Insulin-like-growth-factor-I/-II (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor I/II)
K	Kalium
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
Lbw	Lebenswoche
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol	Millimol
MUT	Mutante der Mauslinie SMA002
MW	Mittelwert
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
n	Anzahl
Na	Natrium
n.d.	nicht durchgeführt
nm	Nanometer
NRL	Nasentrumpflänge
n.s.	nicht signifikant
N2	erste Rückkreuzungsgeneration
OCD	Zwangshandlungen, (obsessive compulsive disorder)
OD	optische Dichte
P	Parentalgeneration
P	Anorganisches Phosphat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Ph	Phänotyp
pmol	Pikomol
pp	post partum, nach der Geburt
QTL	Quantitative Trait Locus

Rf	Rheumafaktor
RLS	Restless Legs Syndrom
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SLT	Spezifischer Locus Test, (specific-locus test)
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris/Borsäure/EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TGL	Triglyceride
TP	Gesamteiweiß (Total Protein)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TS	Gilles de la Tourette-Syndrom
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
vs.	versus
WT	Wildtypier der Mauslinie SMA002
z.B.	zum Beispiel
♀/♂	weiblich/ männlich
(+ / +)	Homozygot: Wildtyp / Wildtyp
(- / +)	Heterozygot: Mutant / Wildtyp
(- / -)	Homozygot: Mutant / Mutant

1 Einleitung

Das 1990 gestartete internationale Humangenomprojekt (HGP) hatte das Ziel, die Erbinformation des Menschen zu entschlüsseln. Nach der Kartierungs- und Sequenzierungsphase steht nun die Erforschung der Genfunktionen und der Beziehungen der einzelnen Gene untereinander im Vordergrund. Über das erlangte Verständnis sollen neue Wege der Vorbeugung, frühzeitigen Diagnostik und gezielten Therapie von erblichen Erkrankungen oder Krankheiten mit genetischer Komponente aufgezeigt werden. Aufgrund ethischer und experimenteller Aspekte ist eine Funktionsanalyse am Menschen nur bedingt durchführbar. Aus diesem Grund wird die Funktion von Genen in der Regel am Tier untersucht. Die Maus hat in den letzten Jahren als ein wichtiges Modellsystem für genetisch bedingte Erkrankungen des Menschen zunehmend an Bedeutung gewonnen. Das "Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekt" im Deutschen Humangenomprojekt (DHGP) hat das Ziel, durch chemische Mutagenese neue Mausmutanten zu produzieren und diese im Hinblick auf ihre Eignung als Tiermodell für Humanerkrankungen näher zu untersuchen (Hrabé de Angelis et al., 2000; Rathkolb et al., 2000b).

Die mutante Mauslinie SMA002 wurde im Rahmen des Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekts etabliert (Soewarto et al., 2000). Das weibliche Foundertier dieser Linie, ein F1-Nachkomme eines ENU-behandelten C3H-Bocks, fiel durch ein geringeres Körpergewicht und eine geringere Körpergröße auf. Nach erfolgreicher Verpaarung zeigten die mutanten Nachkommen neben der Wachstumsdepression als zweites Hauptsyndrom eine Verhaltensauffälligkeit, die sich in verstärktem Putzverhalten, häufigem Kratzen und allgemeiner Unruhe äußerte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den klinischen Phänotyp der mutanten Mauslinie SMA002 umfassend zu charakterisieren. Parallel dazu sollte die genotypische Untersuchung Aufschluss über die ursächliche Mutation erbringen.

2 Literaturübersicht

2.1 Mutagenesestrategien

Mutanten von Modellorganismen spielen eine wichtige Rolle für die Aufklärung von Genfunktionen (Woychik et al., 1998). Zur Erforschung grundlegender Mechanismen wurden niedere Organismen, wie der Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) (Brenner, 1974), die Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) (Nüsslein-Volhard & Wieschaus, 1980) und der Zebrafisch (*Danio rerio*) (Driever et al., 1994; Solnica-Krezel et al., 1994) herangezogen. Für das Studium krankheitsrelevanter Gene bietet die Maus als Tiermodell aufgrund ihrer näheren evolutionsgenetischen Beziehung zum Menschen entscheidende Vorteile (Woychik et al., 1998). Die Genome von Mensch und Maus enthalten nach neuesten Schätzungen 30.000-40.000 Gene. Ungefähr 99% der Mausgene haben ein homologes Gen im menschlichen Genom (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002). Im Hinblick auf die Genzahl ist die Zahl der verfügbaren Mausmutanten sehr gering. Da die unter natürlichen Bedingungen auftretende spontane Mutationsrate von ca. 5×10^{-6} pro Locus für experimentelle Zwecke zu niedrig liegt, wurden verschiedene Möglichkeiten der Erzeugung von Mausmutanten entwickelt.

Die von einer bekannten Gensequenz ausgehende Vorgehensweise zur Erforschung der Genfunktion bezeichnet man als „reverse genetics“. Gängige Verfahren in diesem Zusammenhang sind die funktionelle Inaktivierung oder gezielte Variation von Genen durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) mit anschließender phänotypischer Analyse der Tiere (Rijkers, 1994; Hardouin & Nagy, 2000).

Der zweite Ansatzpunkt geht vom Phänotyp aus. Dabei werden entweder auf physikalischem Wege oder durch chemische Mutagene Mutationen in der Keimbahn induziert (Silver, 1995). Die mutanten Nachkommen der so behandelten Tiere werden auf relevante phänotypische Abweichungen hin untersucht. Die Vererbbarkeit interessanter Phänotypen wird anschließend durch gezielte Verpaarung und Untersuchung der Nachkommen geprüft. Im Anschluss daran erfolgt die Suche nach der ursächlichen Mutation (forward genetics).

2.1.1 Physikalische Mutagenese

Bei der physikalischen Mutagenese werden die Tiere ionisierender Strahlung (Röntgen-, Gamma- oder Neutronenstrahlen) ausgesetzt. Durch den Einsatz von Röntgenstrahlen wurde das 20- bis 100-fache der spontanen Mutationsfrequenz erreicht. Da strahleninduzierte Mutationen oft zu großen Deletionen oder anderen chromosomalen Veränderungen wie Translokationen, Inversionen oder anderen komplexen Rearrangements führen, sind sie für die gezielte Erforschung von Genfunktionen nicht geeignet (Russell et al., 1979; Silver, 1995).

2.1.2 DNA-Konstrukte

Unter einem transgenen Organismus versteht man ein Lebewesen, in dessen Erbgut eine neue DNA-Sequenz eingeführt worden ist, und das in der Lage ist, diese Erbinformation an seine Nachkommen weiterzugeben. Es existieren verschiedene Gentransferverfahren, die zu einem Transfer definierter DNA-Abschnitte mit zufälliger Integration im Wirtsgenom führen (Hogan et al., 1994; Wolf et al., 2000).

Das „Gene-trapping“ ist eine effektive Methode zur Identifizierung und Funktionsanalyse von unbekanntem Genen mit Hilfe der Transgen-Technik. Es handelt sich um eine nicht gerichtete Insertionsmutagenese, die auf der zufälligen Integration eines Reportergens in das Genom von embryonalen Stammzellen beruht. Dies erlaubt die Selektion erfolgreicher Integrationsereignisse *in vitro* und den einfachen Nachweis der Sequenz des betroffenen Gens. Aus den Zellen der so etablierten mutierten Stammzelllinien können nachfolgend mutante Tiere hergestellt werden, in denen eine *in vivo* Analyse des Phänotyps der Mutation möglich ist. Dieses Verfahren wurde bereits erfolgreich in verschiedenen Tierspezies, z.B. Fruchtfliege, Zebrafisch und Maus, angewandt (Wurst et al., 1995; Stanford et al., 2001).

Die Entwicklung der embryonalen Stammzelltechnologie der Maus hat es zudem ermöglicht, gezielte Mutationen zum Studium des Säugetiergenoms zu erzeugen. Das „Gene-Targeting“ durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen ist zur Methode der Wahl gereift, um die Funktion bereits bekannter Gene zu untersuchen. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, jedes klonierte Gen in ES-Zellen auszuschalten und dann die entsprechende Maus-Mutante, die sogenannte „Knockout-Maus“, zu erzeugen, der ein spezifisches Genprodukt fehlt. Der resultierende Phänotyp gibt Aufschluss über die ursprüngliche Genfunktion (Capecchi, 2001).

2.1.3 Chemische Mutagenese

Bei der chemischen Mutagenese werden den Tieren mutagene Substanzen, z.B. Procarbazin (PCR), Chlorambucil (CHL) oder Ethylnitrosoarea (ENU), verabreicht, die auch die Keimzellen auf unterschiedlichen Stufen ihrer Entwicklung mutagenisieren. Die Substanzen Ethylnitrosoarea und Chlorambucil haben sich bei der Maus als besonders effektiv erwiesen (Russell et al., 1979; Rinchik, 1991; Silver, 1995). Mit diesen beiden Chemikalien wurden höhere Mutationsraten (ENU: 150×10^{-5} pro Locus, CHL: 127×10^{-5} pro Locus) als durch Bestrahlung (Röntgenstrahlen: $13\text{-}50 \times 10^{-5}$ pro Locus) erreicht. Hinsichtlich der erzielbaren Mutationsfrequenz haben CHL und ENU eine vergleichbare Effektivität. Sie wirken jedoch auf verschiedene Entwicklungsstadien der Keimzellen ein und induzieren unterschiedliche Mutationstypen. So wirkt ENU bei männlichen Tieren vor allem auf prämeiotische Stammspermatogonien und induziert Punktmutationen (hauptsächlich an A-T Basenpaaren) und kleinere Deletionen. CHL mutagenisiert dagegen überwiegend postmeiotische Spermatozoen, wo es hauptsächlich Deletionen mehrerer Loci und andere größere Läsionen verursacht (Russell et al., 1990).

2.2 Ethylnitrosoarea (ENU) als Mutagen

2.2.1 Wirkungsweise und Dosierung

ENU gilt als das wirksamste Mutagen bei der Maus (Russell et al., 1979) (**Abb. 1**).

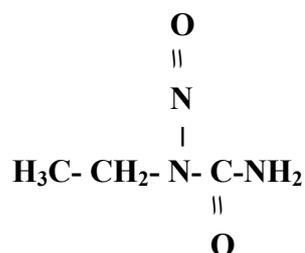


Abb. 1: Strukturformel von ENU

Für das detaillierte Studium der Funktion spezifischer Gene bzw. von Genabschnitten wird ENU als Mutagen der Wahl verwendet. Im Vergleich zu Mutationsfrequenzen, die mit anderen physikalischen und chemischen Mutagenen erzielt werden, hat ENU den höchsten Wirkungsgrad. Es ist unter anderem fünfmal effektiver als die wirkungsvollste

Röntgenbestrahlung und 15-mal effektiver als das chemische Mutagen Procarbazin in seiner wirksamsten Dosis (600 mg/kg KGW) (Russell et al., 1979).

Die Wirkungsweise des ENU (Erzeugung von Punktmutationen) erlaubt das Erforschen von singulären dominanten wie rezessiven Mutationen (Hrabé de Angelis & Balling, 1998; Brown & Nolan, 1998). Der mutagene Wirkungsgrad von ENU hängt von der verwendeten Dosis und dem Behandlungsprotokoll ab. Zahlreiche Untersuchungen deckten die Korrelation zwischen der Dosis und der Mutationsfrequenz bei einmaliger intraperitonealer Injektion von 80 bis 250 mg/kg KGW auf (Russell et al., 1982a; Charles & Pretsch, 1987; Lewis et al., 1991). Das Schwellenmodell von Favor et al. (1990) zeigt am deutlichsten die Dosis-Wirkungs-Beziehung der ENU-Mutagenese. Die Effektivität des ENU zur Generierung von Mutationen kann, durch wiederholte Gabe kleinerer Dosen (80-100 mg/kg KGW) in wöchentlichem Rhythmus, gesteigert werden (Hitotsumachi et al., 1985). Die fraktionierte Gabe von 100 mg/kg KGW (10 x 10 mg/kg in wöchentlichen Abständen) hingegen führt zu einer Wirkung, die unter der Effektivität einer einmaligen Gabe von 100 mg/kg KGW liegt (Russell et al., 1982b). Die ENU-Applikation bedingt eine Sterilitätsphase, in welcher die mutagenisierten Spermatogonien ihre Teilungsaktivität vorübergehend einstellen. Die Dauer dieser Phase schwankt zwischen 6 und 45 Wochen, abhängig von der Dosierung, dem verwendeten Behandlungsregime und Mausstamm. So führte die im Rahmen des Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekts durchgeführte wiederholte ENU-Gabe von 3 x 80-90 mg/kg im wöchentlichen Intervall zu einer Sterilitätsphase männlicher Mäuse von 10 bis 15 Wochen. Eine Übersicht über die verschiedenen Sterilitätsphasen einiger Mausstämme findet sich bei Justice et al. (2000). Mit einer optimierten ENU-Applikation werden Mutationsfrequenzen von bis zu 1×10^{-3} (rezessive Mutante) bzw. 5×10^{-3} (dominante Mutante) bei im Spezifischen Locus Test (SLT, specific-locus test, siehe 2.3.2.2) beurteilten Loci erreicht (Hrabé de Angelis & Balling, 1998; Brown & Nolan, 1998). Die Mutationsrate wird zusätzlich vom verwendeten Mausstamm beeinflusst. Weber et al. (2000) untersuchten die Mutationsrate, die Sterilitätsphase und die Überlebensfähigkeit verschiedener Inzuchtstämme. Hierbei zeigte sich, dass die Inzuchtstämme A/J, BALB/c, C57BL/6 und in niedrigerer Dosierung auch C3He/J sich besonders gut für die Mutagenese mit ENU eignen, während die Inzuchtstämme 129x1/SvJ, 129S6/SvEv und CBA/CaJ weniger geeignet sind. Der Wirkungsmechanismus des ENU beruht auf der Alkylierung von Nukleinsäuren. Hierbei kommt es durch die Übertragung der Ethylgruppe des ENU zur Fehlidentifikation der alkylierten Base und somit zu einer falschen Basenpaarung während der ersten Replikation.

Bei der folgenden Replikation setzt sich der Fehler fort und es kommt zu unterschiedlich replizierten Strängen (**Abb. 2A und B**).

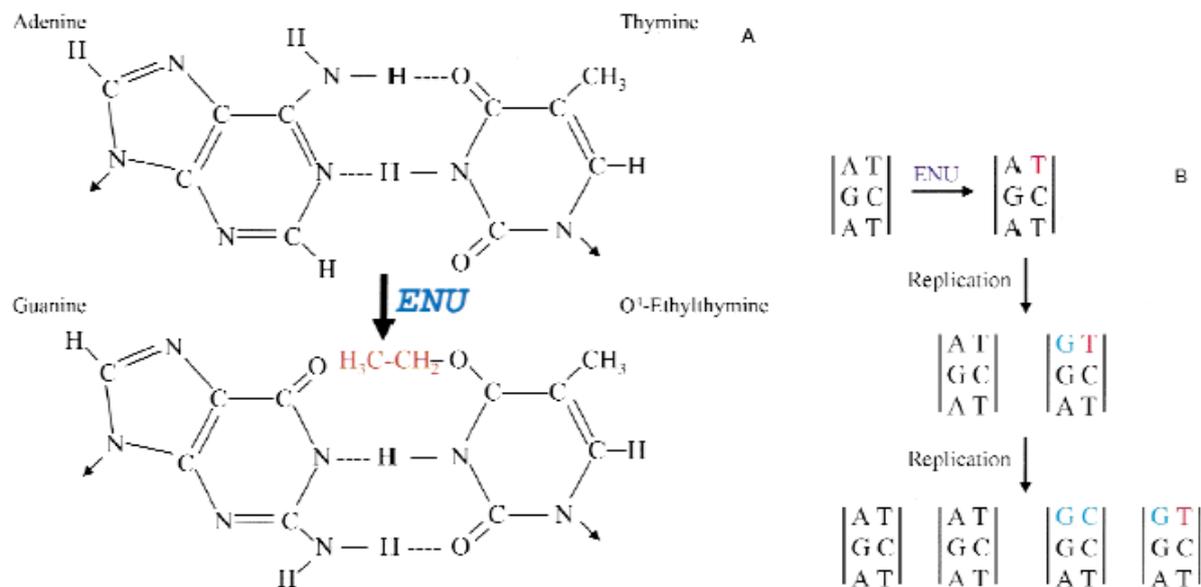


Abb. 2: Mechanismus der ENU-induzierten fehlerhaften Basenpaarung. Alkylierung von Thymidin (A) führt zur Fehlidentifikation der Base und zu einer falschen Basenpaarung während der Replikation (B) (aus: Noveroske et al., 2000).

2.2.2 Geschlechtsspezifische Wirkung

Es gibt verschiedene Gründe dafür, dass bevorzugt männliche Mäuse für die Mutagenese herangezogen werden. Neben der effektiveren Verwendung der Böcke in der Zucht liegt bereits im Spezifischen Locus Test die spontane Mutationsrate männlicher Keimzellen (43/801.406) weit über der Spontanmutationsrate in Oozyten (6/536.207) (Russell & Russell, 1992). Die mutagene Wirkung des ENU ist bei weiblichen Organismen geringer als bei männlichen Organismen. Dies liegt an der Tatsache, dass ENU hauptsächlich auf prämeiotische Stammzellen wirkt. Adulte weibliche Lebewesen haben keine sich teilenden prämeiotischen Keimzellen mehr, denn alle Oozyten sind bereits vorhanden. Sie befinden sich in einer Ruhephase innerhalb der Prophase der ersten meiotischen Teilung und beginnen erst ca. drei Wochen vor der Ovulation sich weiter zu entwickeln. Im Gegensatz dazu werden die männlichen Keimzellen kontinuierlich während der gesamten Lebenszeit produziert (Lewis et al., 1992; Russell & Russell, 1992).

2.2.3 ENU-Protokoll des Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekts

(Zur Übersicht: Hrabé de Angelis et al., 2000)

Im Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekt erhalten männliche C3H-Mäuse im Alter von 10-14 Wochen dreimal im wöchentlichen Abstand eine intraperitoneale Injektion von je 90 mg ENU pro kg Körpergewicht. Nach einer Sterilitätsphase von ca. 6-8 Wochen werden diese permanent mit weiblichen C3H-Mäusen verpaart. Pro mutagenisiertem Foundertier werden 50-60 Nachkommen in der F1-Generation produziert und diese auf phänotypische Veränderungen untersucht (<http://www.gsf.de/ieg/groups/enu-mouse.html>).

2.2.4 Weitere ENU-Mutagenese-Projekte

Neben dem Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekt wurden in den letzten Jahren weltweit weitere ENU-Projekte begonnen. Diese unterschiedlichen Projekte arbeiten z.B. auf verschiedenen genetischen Hintergründen, mit verschiedenen Techniken oder mit einer unterschiedlichen Zielsetzung (Russ et al., 2002).

Im Folgenden wird eine Auswahl weiterer ENU-Projekte mit ihren Weblinks aufgeführt:

-ANU, Canberra, Australien

http://jcsmr.anu.edu.au/group_pages/mgc/MedGenCen.html

-Baylor College, Houston, USA

<http://www.mouse-genome.bcm.tmc.edu>

-Genomics Institute of the Novartis Research Foundation, San Diego, USA

<http://www.gnf.org/>

-The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA

<http://pga.jax.org//index.html>

<http://www.jax.org/nmf/>

-MRC, Harwell, UK

<http://www.mut.har.mrc.ac.uk>

-Oak Ridge Nat. Laboratory, Tennessee, USA

<http://bio.lsd.ornl.gov/mouse>

-RIKEN, Yokohama, Japan

<http://www.gsc.riken.go.jp/Mouse/>

-Tennessee Genome Consortium, Tennessee, USA

<http://Tnmouse.org>

-University of Toronto, Toronto, Canada

<http://www.cmhd.ca>

Einen Überblick über die chemische Mutagenese der Maus mit ENU liefert die Ausgabe 11, Nummer 7 der Fachzeitschrift *Mammalian Genome* von 2000.

2.3 Etablierung von Mausmutanten als Tiermodelle

2.3.1 Charakterisierung des Phänotyps

Die phänotypische Charakterisierung einer neuen Mausmutante befasst sich mit der vom äußeren Erscheinungsbild und messbaren Parametern (Phänotyp) ausgehenden Analyse der Mutation. Eine dominante Mutation wird immer im Phänotyp sichtbar, die Wirkung eines rezessiven Allels wird nur in seinem homozygoten Zustand phänotypisch sichtbar. Durch die erfolgreiche Zucht von mutanten Nachkommen erfolgt zunächst die Etablierung der mutanten Mauslinie. Zu den standardisierten Untersuchungsmethoden gehört das SHIRPA Protokoll. Bei SHIRPA (SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Harwell, Imperial College School of Medicine at St. Mary's, Royal London Hospital, St. Bartholomew's and the Royal London School of Medicine, Phenotype Assessment) handelt es sich um ein aus drei Teilen bestehendes semi-quantitatives Protokoll mit über 40 Einzeltests zur Analyse von Mäusen. Im ersten Teil wird das allgemeine Erscheinungsbild der Tiere, zu dem auch der Gang und das Pflegeverhalten gehören, beobachtet. Im zweiten Teil werden unter anderem die lokomotorische Aktivität, die Futter- und Wasseraufnahme sowie die Balance und die Koordination der Mäuse mit Hilfe spezifischer Tests geprüft. Der dritte Teil befasst sich mit der neurologischen Untersuchung der Tiere, um die Eignung einer mutanten Linie als Modell für neurologische Erkrankungen zu beurteilen (Rogers et al., 1997, 2001).

Neben dem Verhalten und der Untersuchung auf Dysmorphologien werden bei der phänotypischen Untersuchung im Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekt auch ein breites Spektrum verschiedener Blutparameter analysiert und die Schmerzempfindlichkeit der Tiere getestet (Fuchs et al., 2000; Soewarto et al., 2000). Einen wichtigen Einflussfaktor auf den Phänotyp stellt der genetische Hintergrund der Mäuse, die die Mutation tragen, dar. Studien an Knockout-Mäusen zeigten, dass die Ausprägung einer Mutation in verschiedenen Inzuchtstämmen variieren kann. Diese Variabilität reicht von einer unterschiedlichen Überlebenszeit der Nachkommen bis zum vollständigen Fehlen einer durch die Mutation bedingten Veränderung (Threadgill et al., 1995; Linder, 2001).

2.3.2 Charakterisierung des Genotyps (Übersicht: Silver, 1995)

Die Untersuchung der kausalen Mutation ist mit verschiedenen Vorgehensweisen möglich. Zum einen werden aufgrund des Phänotyps geeignete Kandidatengene ausgewählt und analysiert. Dies kann durch molekulargenetische Untersuchungen (Sequenzierung, Expressionsuntersuchung) der betreffenden Gene oder mit Hilfe eines Zuchtverfahrens (Spezifischer Locus Test) erfolgen. Meist ist es jedoch zuvor nötig, die Mutation im Genom näher zu lokalisieren. Dazu wird in der Regel eine Kopplungsanalyse durchgeführt. Finden sich im ermittelten Kartierungsbereich keine geeigneten Kandidatengene, werden die dort lokalisierten Gene weitergehend untersucht, um die Mutation zu finden.

2.3.2.1 Kandidatengenanalyse

Kandidatengene sind Gene, die bei der Maus oder anderen Spezies, wie z.B. Mensch oder Schwein, bereits kartiert sind, und von denen man aufgrund der zur Verfügung stehenden Informationen annimmt, dass eine Mutation in diesen Genen den beobachteten Phänotyp hervorrufen kann. Sind bei einer Mausmutante und einer beim Menschen beschriebenen Erbkrankheit die klinischen und pathologischen Befunde ähnlich, liegt die Vermutung nahe, dass die Befunde in beiden Spezies durch die gleiche Mutation verursacht werden. Kandidatengenanalysen können somit nur bei Genen mit schon bekannter Funktion durchgeführt werden.

2.3.2.2 Spezifischer Locus Test

Der Spezifische Locus Test (SLT, specific-locus test) wurde entwickelt, um die Frequenz von induzierten Genmutationen in einem Zuchtverfahren zu messen. Mutagenisierte männliche Mäuse eines Inzuchtstammes, der in spezifischen 7 Loci ein dominantes Allel trägt, wurden mit weiblichen Mäusen, die homozygot rezessiv für diese 7 Allele sind (Anzeigerstamm), angepaart. Der Test deckt jede genetische Änderung auf, die mit einem teilweisen oder vollständigen Funktionsverlust dieser 7 Gene verbunden war. Die Änderungen spiegeln sich in äußerlich erkennbaren Phänotypen, wie Fellfarbe, Fellstruktur und Ohrgröße, wider (Russell & Russell, 1992). Das Prinzip des SLT kann zur Identifikation des mutierten Gens bei rezessiven Mutationen, die einen Phänotyp hervorrufen, der bereits in ähnlicher Form bei Knockout-Mäusen beschrieben wurde, angewendet werden. In diesem Fall werden heterozygote Mäuse, die auf einem Allel die rezessive Mutation tragen, mit heterozygoten Knockout-Mäusen verpaart. Tritt bei den Nachkommen der Phänotyp erneut auf, ist bewiesen, dass es sich um eine Mutation des gleichen Gens handelt. Denn nur wenn die Nachkommen

kein funktionell intaktes Allel des betreffenden Gens tragen, ist mit dem Auftreten des rezessiven Phänotyps zu rechnen.

2.3.2.3 Kartierung durch Kopplungsanalyse (Linkageanalyse, positional cloning)

(Übersicht: Silver, 1995)

Um die Lokalisation der erzeugten Mutation im Genom zu ermitteln, wird deren genetische Kopplung zu DNA-Markern mit bekannter Lokalisation, in der Regel sind dies Mikrosatelliten, geprüft (Klassische Kopplungsanalyse). Mikrosatelliten sind hochpolymorphe, nicht kodierende DNA-Abschnitte, die eine große Anzahl von tandemartigen Wiederholungen der gleichen Basensequenz (2-4 Basen) enthalten und kodominant vererbt werden. Die Länge der Mikrosatelliten ist für verschiedene Mausinzuchtstämme unterschiedlich, so dass in molekulargenetischen Untersuchungen eine Stammzuordnung mit Hilfe dieser Marker möglich ist. Für die Kopplungsanalyse zur Lokalisation einer dominanten Mutation werden N2-Hybridtiere aus der Auskreuzung mutanter Tiere eines Inzuchtstammes auf einen zweiten Inzuchtstamm und anschließender Rückkreuzung der mutanten F1-Hybridmäuse auf den zweiten Parentalstamm molekulargenetisch untersucht (**Abb. 3**).

Die genetische Distanz zwischen einem genetischen Marker und dem mutierten Gen wird aus der Rekombinationsrate geschätzt, die bei der Bildung von Gameten zwischen Autosomen auftritt. Je näher zwei Loci zusammen liegen desto kleiner ist die Rekombinationsrate und desto größer ist die genetische Kopplung zwischen ihnen. Das genetische Maß für die Kopplung wird in centi-Morgan (cM) angegeben und entspricht der Anzahl der Rekombinationen zwischen zwei Loci in 100 Meiosen. Ein centi-Morgan entspricht 1% Rekombination.

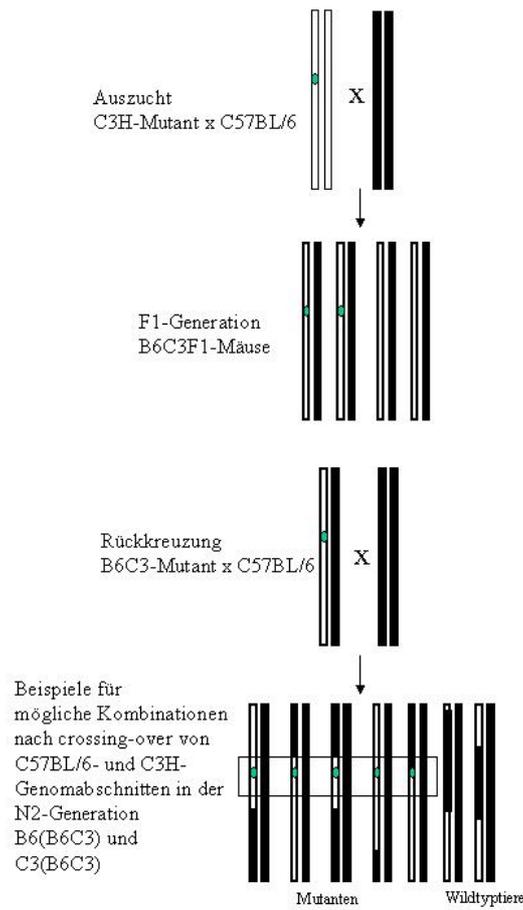


Abb. 3: Verschiedene Chromosomenkombinationen der N2-Generation nach Rekombination. Die mutanten Tiere tragen um den Mutationslocus (Kästchen) mit der Mutation (grüner Punkt) vorwiegend genetisches Material des C3H-Stammes (weiß). Schwarz: genetisches Material des C57BL/6-Stammes.

2.3.3 Internetressourcen:

Für die weitere Analyse von Mausmutanten stehen folgende Datenbanken zur Verfügung. Sie geben Auskunft über den derzeitigen Stand der Sequenzierung des Mausgenoms und die bisher bekannten Gene und Genloci:

-MGSC Mouse Synteny View

http://www.ensembl.org/Mus_musculus/

-Genes and Markers Query Form

<http://www.informatics.jax.org/>

-The Transgenic/ Targeted Mutation Database

<http://tbase.jax.org/>

-Human-Mouse Homology Map

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/mouse/>

2.4 Die klinische und klinisch-chemische Untersuchung von mutanten Mäusen

2.4.1 Untersuchungsspektrum

Der klinisch-chemische Screen des Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekts etabliert neue mutante Mauslinien mit Hilfe von klinischen, klinisch-chemischen und hämatologischen Untersuchungen.

Die Nachkommen in der F1- und G3-Generation von mit ENU mutagenisierten Mausböcken werden hierfür zunächst klinisch auf Veränderungen ihres Wachstums und Körpergewichtes, ihres Erscheinungsbildes (Habitus) und ihrer Bewegung hin untersucht. Die Quantität und Qualität des Mauskotes werden als diagnostischer Indikator für das Verdauungssystem kontrolliert.

Im Alter von 12 Wochen werden die Tiere einer Blutabnahme unterzogen und es werden 8 hämatologische sowie 17 klinisch-chemische Parameter erhoben. Durch labordiagnostische Verfahren werden hämatologische Änderungen sowie Fehlfunktionen verschiedener Organsysteme, metabolische Störungen und Änderungen der Homöostase des Elektrolythaushaltes diagnostiziert. Bei der Blutuntersuchung werden routinemäßige Verfahren verwendet, die es erlauben, eine große Anzahl von Mäusen auf ein breites Spektrum von klinisch-chemischen und hämatologischen Parametern zu untersuchen (Rathkolb et al., 2000a).

2.4.2 Diagnostische Relevanz

Da die meisten Stoffwechselstörungen direkt oder indirekt (über eine geänderte Organfunktion) zu einer Veränderung in den erhobenen Parametern führen (Fernandes et al., 1995; Saudubray & Charpentier, 1995), ist der Screen geeignet, klinische und klinisch-chemische Phänotypen zu erkennen, die als Modell für bekannte Erbkrankheiten von Mensch und Tier fungieren können. Die Tabellen **1 a** bis **c** zeigen eine Zusammenstellung von Krankheiten, bei denen die Messung der untersuchten Substrate, Enzymaktivitäten und Elektrolyte eine diagnostische Relevanz besitzt. Zudem lässt sich durch die Untersuchung folgender Parametergruppen (Organprofile) auf den Funktionszustand des betreffenden Organs schließen (Hartmann & Meyer, 1994; Thomas, 1998).

Organprofile:

Nieren: Harnstoff (HST), Kreatinin (CREA), Gesamteiweiß (TP), Harnsäure (HSR), Glukose (GLS), Natrium (Na), Kalzium (Ca), Chlorid (Cl), Anorganisches Phosphat (P).

Leber: Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), Alkalische Phosphatase (AP), Cholesterin (CHO), Gesamteiweiß (TP).

Pankreas: α -Amylase (AMY), Glukose (GLS), Cholesterin (CHO), Triglyceride (TGL).

Stoffwechsel: Triglyceride (TGL), Cholesterin (CHO), Harnstoff (HST), Aspartat-Aminotransferase (AST), Kalzium (Ca), Kalium (K), Natrium (Na), Phosphat (P).

Muskel: Kreatinkinase (CK), Kalzium (Ca).

Hämatologie: Blutbild Leukozyten (WBC), Erythrozyten (RBC), Erythrozytenindizes (MCV, MCH, MCHC), Hämoglobin (HGB), Hämatokrit (HCT), Thrombozyten (PLT).

Tabelle 1a:**Überblick über Indikationen und Erkrankungen, die mit einer Abweichung der gemessenen Substrate korrelieren (Greiling & Gressner, 1995; Thomas, 1998)**

Substrat	Indikation	Veränderung/ Abweichung
Cholesterin (CHO)	Stoffwechselstörung und Endokrinopathien	↑: postprandial, alimentär, Diabetes mellitus, nephrotisches Syndrom, Hepatopathien, akute Pankreatitis, extrahepatische Cholestase, Hypothyreose, ↓: Hyperthyreose
Triglyceride (TGL)	Stoffwechselstörung und Endokrinopathien	↑: Hyperlipidämie, Pankreatitis, postprandial, Cholestase, nephrotisches Syndrom, Diabetes mellitus ↓: Hyperthyreose
Glukose (GLS)	Diabetes mellitus	↑: primär: Diabetes mellitus, sekundär: postprandial, Stress, ZNS-Erkrankungen, Krämpfe, schweres Trauma, Pankreatitis ↓: sekundär: renale Glucosurie, Hepatopathien, Nahrungskarenz
Gesamteiweiß (TP)	Hepatopathien, Nephropathien, gastrointestinale Erkrankungen, Dehydratation, Hyperhydratation und Endokrinopathien	↑: Exsikkose, chronische bakterielle Infektionen, Parasitosen, Hämolyse ↓: Malabsorption, Maldigestion, Mangelernährung, Nephropathien, chronische Hepatopathien, Hyperthyreose
Harnstoff (HST)	Hepatopathien, Nephropathien	↑: Nephropathien, Dehydratation, gesteigerter Stoffwechsel, Muskeltrauma, schwere körperliche Belastung ↓: Hepatopathien
Kreatinin (CREA)	Nephropathien	↑: Nephropathien, Dehydratation, Elektrolytimbalance, Herz-Kreislaufinsuffizienz ↓: Kachexie
↑: Erhöhung der Plasmasubstratkonzentration, ↓: Erniedrigung der Plasmasubstratkonzentration		

Tabelle 1b:**Überblick über Indikationen und Erkrankungen, die mit einer Abweichung der gemessenen Enzymaktivitäten korrelieren (Greiling & Gressner, 1995; Thomas, 1998)**

Enzym	Indikation	Veränderung/ Abweichung
α -Amylase (AMY)	Erkrankungen des exokrinen Pankreas	↑: akute Pankreatitis, Pankreasnekrose, Pankreastumor, Nephropathien
Alanin- Aminotransferase (ALT)	Hepatopathien Endokrinopathien	↑: akute Hepatitis, chronische Hepatitis, Leberzelldegeneration, Nekrosen, Hyperthyreose
Aspartat- Aminotransferase (AST)	Myopathien, Hepatopathien Endokrinopathien	↑: Myopathien, Hyperthyreose, Hepatopathien
Kreatinkinase (CK)	primäre und sekundäre Myopathien Endokrinopathien	↑: Myopathien, starke körperliche Belastung, Schock, Tetanus, Hypothyreose, Belastungsmypathie ↓: Hyperthyreose
Alkalische Phosphatase (AP)	Hepatopathien, Knochenerkrankungen Endokrinopathien	↑: Hepatopathien mit intra- oder extrazell. Cholestase, Rachitis, Osteoporose, Leberneoplasien, Leberintoxikation, Hyperthyreose, Pankreatitis, Diabetes mellitus
↑: Erhöhung der Plasmaenzymaktivität, ↓: Erniedrigung der Plasmaenzymaktivität		

<i>Tabelle 1c:</i> Überblick über Indikationen und Erkrankungen, die mit einer Abweichung der gemessenen Elektrolyte korrelieren (Greiling & Gressner, 1995; Thomas, 1998)		
Elektrolyt	Indikation	Veränderung/ Abweichung
Natrium (Na)	Störung des Elektrolyt-Haushaltes	↑: Exsikkose, Diabetes mellitus, ↓: vermehrte Wasseraufnahme
Kalium (K)	Störung des Elektrolyt-Haushaltes	↑: verminderte K-ausscheidung, Nephropathien, Gewebeschäden ↓: vermehrte Ausscheidung, chronische Hepatopathien, Nephropathien
Kalzium (Ca)	Störung des Elektrolyt-Haushaltes	↑: Nephropathien ↓: Tetanie
Chlorid (Cl)	Störung des Elektrolyt-Haushaltes	↑: Exsikkose, Diabetes mellitus ↓: Nephropathien
Anorg. Phosphat (P)	Osteopathien, Nephropathien	↑: Jungtier, Nephropathien ↓: Osteomalazie, Malabsorption
↑: Erhöhung der Plasmaelektrolytkonzentration, ↓: Erniedrigung der Plasmaelektrolytkonzentration		

2.4.3 Einflussfaktoren auf die untersuchten Parameter

Die Blutparameter der kleinen Labornager unterliegen der Beeinflussung verschiedener exogener und endogener Faktoren (Alemán et al., 2000). Zu den exogenen Faktoren gehören die Haltung (SPF-Haltung vs. konventionelle Haltung), die Tageszeit, die Einstreu, das Futter sowie die verschiedenen Blutabnahmetechniken (retrobulbäre Punktion, Herzpunktion, Abnahme aus der Schwanzvene). Als endogene Einflüsse sind genetische Faktoren (Mausstamm, -linie) sowie das Geschlecht und das Alter der Tiere zu berücksichtigen (Schmidl, 1981; Übersicht: Quimby, 1999; Hoff, 2000). Die publizierten Blutwerte beziehen sich somit auf Tiere bestimmter Altersstufen und Stämme bzw. Linien (Hough et al., 2002; Kile et al., 2002; Schnell et al., 2002). Aus diesem Grund wurden als Kontrollen unter standardisierten Bedingungen Proben von in unserem Institut gezüchteten, 12 Wochen alten C3H-Tieren beiderlei Geschlechts genommen, um aussagekräftige Basiswerte zu erhalten.

2.5 Syndrom „reduziertes Körperwachstum“

Im Rahmen des Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekts wurde die mutante Mauslinie SMA002 etabliert, deren klinischer Phänotyp charakterisiert ist durch die beiden Hauptsyndrome „reduziertes Körperwachstum“ und „Verhaltensänderungen“.

Die Ursachen für ein vermindertes Körperwachstum sind vielfältig. Hierzu zählen unter anderem Störungen der wachstumsregulierenden Hormonsysteme, durch Mangelernährung oder Resorptionsstörungen verursachte Defizite sowie genetisch bedingte Unterschiede des Stoffwechselgeschehens. Abgesehen von einigen Beispielen, bei denen der Zwergwuchs auf eine einzelne Mutation zurückzuführen ist, wurde gezeigt, dass die Wachstumsrate ein quantitativ polygen vererbtes Merkmal mit mittlerer Heritabilität ($h^2 \sim 0,30$) ist. Sie wird von pränatalen und postnatalen maternalen Effekten beeinflusst (Al Murrani & Roberts, 1978; Sellier, 2000). Efstratiadis (1998) unterscheidet zwischen einer Gruppe von 20-25 Genen, die direkt in die Wachstumsregulation involviert sind und in der Mehrzahl zu dem Wachstumshormon (GH)/ Insulin-like Growth Factor (IGF) System gehören, und ca. 50 weiteren Genen, die bei funktioneller Inaktivierung in Knockout-Tieren indirekt zu einer Wachstumshemmung führen. Des Weiteren haben Untersuchungen an verschiedenen spontanen Mausmutanten gezeigt, dass auch Mutationen in Genen, die dem IGF-System vorgeschaltete physiologische Vorgänge beeinflussen (z.B. GH-Realising Hormon Rezeptor (Ghrhr), Pit-1 (pituitary-specific transcription factor 1), Prop-1 Gen (Prophet von Pit-1)) zu vermindertem Körperwachstum führen. Verschiedene Untersuchungen zur Identifizierung von Loci, die dieses Merkmal beeinflussen (Quantitative Trait Loci, QTL) haben zur Entdeckung zahlreicher QTLs geführt, die mit dem Wachstum und der Körpergewichtsentwicklung in Zusammenhang stehen (Dragani et al., 1995; Cheverud et al., 1996; Brockmann et al., 1998). Für die Mehrheit dieser QTLs sind die betroffenen Gene noch unbekannt (Sellier, 2000).

2.5.1 Hormonelle Wachstumsregulation

2.5.1.1 Das Insulin-like Growth Factor System

Wachstumsprozesse bei Tieren werden durch eine Vielzahl physiologischer Vorgänge reguliert, unter denen das Somatotropin (STH, engl. Growth hormone GH) und die nachgeschalteten Wachstumsfaktoren eine Schlüsselrolle spielen. Bereits Anfang des letzten Jahrhunderts wurden wachstumsfördernde Faktoren im Serum und in verschiedenen Körpergeweben entdeckt. Sie wurden später aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit

Insulin als insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (Insulin-like Growth Factors, IGFs) bezeichnet (Rinderknecht & Humbel, 1978b). Diese Wachstumsfaktoren wurden im Blut sowie den meisten Körperflüssigkeiten und Geweben nachgewiesen (Jones & Clemmons, 1995). Rinderknecht & Humbel (1978a und 1978b) entschlüsselten die Aminosäuresequenz von humanem IGF-I und IGF-II. Es wurde eine 45%ige strukturelle Homologie von humanen IGFs und humanem Insulin in der A- und B-Kette (bzw. A- und B-Region) nachgewiesen. Von dieser Homologie wird angenommen, dass sie das Resultat einer Genduplikation ist, welche sich vor über 600 Millionen Jahren ereignet hat (Froesch & Zapf, 1985).

Die biologischen Funktionen von IGF-I und IGF-II wurden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untersucht. Beide Hormone weisen insulin-ähnliche Effekte, wie die Stimulation der Glukoseaufnahme, des Glukosemetabolismus, der Lipid-, Glykogen- und Proteinsynthese, auf. Außerdem haben sie wachstumsfördernde bzw. mitogene Effekte, wie die Stimulation von DNA- und RNA-Synthese, Zellreplikation und Zelldifferenzierung (Froesch et al., 1985; Jones & Clemmons, 1995).

Die Konzentration der IGFs im Blut ist unter konstanten Ernährungs- und endokrinen Bedingungen sehr stabil (Froesch et al., 1985). Die Stabilität kommt dadurch zustande, dass ein Großteil der IGFs im Blut an spezifische Bindungsproteine (IGFBPs) gebunden vorliegt. Schwander et al. (1983) identifizierten die Leber als den Hauptbildungsort der im Blut zirkulierenden IGFs und deren Bindungsproteine. Die Sekretion der beiden Komponenten erfolgt jedoch unabhängig voneinander. Die Serumkonzentrationen der IGFs sind pränatal viel niedriger als postnatal. Postnatal wird die IGF-I-Konzentration im Blut durch das von der Hypophyse ausgeschüttete Wachstumshormon (GH) reguliert. Die Blutkonzentrationen der beiden Hormone sind positiv korreliert. Die Untersuchung von transgenen Mäusen zeigte, dass die Wachstumshormonproduktion durch die IGF-I-Konzentration im Blut in Form einer negativen Rückkopplung gesteuert wird (Jones & Clemmons, 1995).

Zu dem IGF-System gehören neben den Wachstumsfaktoren selbst auch noch deren Rezeptoren und die sogenannten IGF-Bindungsproteine (IGFBPs) (Jones & Clemmons, 1995; Rajaram et al., 1997). Für die IGFs als Liganden sind zwei spezifische Rezeptoren bekannt. Der IGF-I-Rezeptor (Le Roith et al., 1995) bindet vor allem IGF-I. Seine Affinität zu IGF-II ist 2-15-fach geringer. Der IGF-II-Rezeptor weist eine 500mal niedrigere Affinität zu IGF-I als zu IGF-II auf (Jones & Clemmons, 1995).

Als Regulatoren der biologischen Aktivität der IGFs wurden inzwischen sechs IGFBPs (IGFBP-1 bis -6) mit hoher Affinität für IGFs identifiziert. Diesen IGFBPs werden vier hauptsächliche Funktionen zugeordnet:

1. Sie agieren als Transportproteine im Plasma und kontrollieren den Efflux der IGFs aus dem vaskulären Raum.
2. Sie verlängern die Halbwertszeit der IGFs und regulieren deren metabolische Clearance.
3. Sie dienen als Hilfsmittel für die gewebs- und zellspezifische Verteilung der IGFs.
4. Sie modulieren die Interaktionen der IGFs mit ihren Rezeptoren und kontrollieren so indirekt die biologische Aktivität (Jones & Clemmons, 1995; Rajaram et al., 1997).

2.5.1.2 Veränderungen im Insulin-like Growth Factor System

Untersuchungen an IGF-I transgenen heterozygoten Mäusen zeigten, dass bereits eine Erniedrigung der IGF-I-Konzentration um 37% einen Effekt auf das Körperwachstum (Powell-Braxton et al., 1993) und die normale Funktion und Entwicklung von peripheren Nerven hat (Gao et al., 1999). Die Messwerte klinisch-chemischer (Albumin, AP, CHO, CK, CREA, Elektrolyte, Globuline, GLS, Insulin, TP, TGL, HST, Leber- und Nierenfunktionstest) und hämatologischer Parameter waren bei IGF-I defizienten Mäusen unverändert. Die Mäuse waren fertil und gesund (Powell-Braxton, 1993). Die gewebespezifische Inaktivierung der IGF-I-Produktion in der Leber senkte den IGF-I-Wert im Blut auf 25%. Dies führte jedoch zu keiner Wachstumshemmung der betroffenen Mäuse. Diese Untersuchung zeigt, dass obwohl die Leber der Hauptproduzent des IGF-I ist, deren IGF-I-Produktion für das postnatale Wachstum nicht essentiell ist (Sjögren, 1999; Yakar et al., 1999; Yakar et al., 2000). Die Beziehung zwischen dem Wachstum von auf Körpergewicht (KGW) selektierten Mäusen und dem IGF-System wurde bereits gezeigt. Hierfür wurden Mäuse über mehr als 55 Generationen auf ein geringes (low, L-Mäuse) oder ein hohes KGW (high, H-Mäuse) in der achten Lebenswoche selektiert. Im Vergleich zu Kontrolltieren war das KGW der H-Mäuse signifikant höher und das KGW der L-Mäuse signifikant geringer. Die signifikante Erhöhung zirkulierender IGFBP-2-Konzentrationen in L-Mäusen deutete auf die Funktion von IGFBP-2 als negativer Wachstumsregulator hin (Höflich et al., 1998). Anhand von transgenen Mäusen mit IGFBP-2 Überproduktion in Serum und Gewebe (overexpressing IGFBP-2) wurde *in vivo* anschließend der Zusammenhang des erhöhten IGFBP-2-Wertes und des reduzierten KGW erforscht. Die transgenen Tiere beiderlei Geschlechts zeigten eine reduzierte KGW-Zunahme nach dem Absetzen (im Alter von 23 Tagen). Die KGW-Mittelwerte der transgenen Mäuse waren signifikant geringer ($p < 0.05$, 9% bei männlichen,

11% bei weiblichen Mäusen) und eine Kompensation des geringeren KGW fand innerhalb des Versuchszeitraumes (150. bis 240. Lebenstag) nicht statt. Die absoluten und relativen Organgewichte von Milz, Leber und Pankreas waren niedriger als bei den Kontrolltieren und das Gewicht der Karkasse war signifikant ($p < 0.05$) reduziert (Höflich et al., 1999; Höflich et al., 2001). Eine weitere Studie der IGFBP-2-Überexpression zeigte deren Beteiligung an pathologischen Syndromen wie Diabetes, chronischen Nierenerkrankungen, Leberzirrhose und der Entstehung von Tumoren (Höflich et al., 1999). Darüber hinaus sind die Serumkonzentrationen von Mäusen bei Schock, Futterentzug, Hypoxie und nach Traumata erhöht (Höflich et al., 2001).

2.5.2 Mangelernährung

Wachstumsstörungen können auch Folge einer unzureichenden Versorgung mit verschiedenen Nährstoffen (z.B. Substrate, Proteine, Spurenelemente und Vitamine) sein (Dämmrich, 1990; Hornick, 2000; Ozanne, 2001). Die wichtigsten Nährstoffe werden anhand der Auswirkungen einer Mangelversorgung in zwei Kategorien eingeteilt (**Tab.2**). Bei Nährstoffen der Kategorie 1 führt eine Unterversorgung zu einer unzureichenden Konzentration im Gewebe. Dieser Zustand ist in der Regel mit charakteristischen Mangelsyndromen verbunden. Das Körperwachstum ist nur selten beeinträchtigt. Nährstoffe der Kategorie 2 halten auch bei verminderter Zufuhr konstante Gewebelevel. Ein Mangel führt bei diesen Nährstoffen zu einer Beeinträchtigung des Körperwachstums ohne spezifische Mangelscheinungen (Rosado, 1999; Branca & Ferrari, 2002). Als Beispiel für die Beeinträchtigungen des Wachstums durch Nährstoffmangel ist Zinkmangel im Kindesalter beim Menschen bekannt (Allen, 1998).

<u>Tabelle 2:</u>	
Einteilung der wichtigsten Nährstoffe anhand der Auswirkungen einer Mangelversorgung in zwei Kategorien (modifiziert nach Branca & Ferrari, 2002)	
Typ 1:	Typ 2:
Initial normales Wachstum, erniedrigte Konzentration im Gewebe, spezifische Mangelercheinungen	Wachstumsdepression, normale Konzentration im Gewebe, keine spezifischen Mangelercheinungen
Jod	<i>Energie</i>
Eisen	
Kupfer	Zink
Kalzium	Stickstoff
Thiamine	essentielle Aminosäuren
Riboflavin	Lysin
Ascorbinsäure	Threonin
Retinol	Kalium
Tocopherol	Natrium
Cobalamin	Phosphor
Vitamin K	Schwefel
Selen	Magnesium
Mangan	
Vitamin D	

2.6 Syndrom „Verhaltensänderungen“

Die Mutante SMA002 zeigt neben dem Wachstumsdefizit als zweites Hauptsyndrom Verhaltensänderungen in Form von auffälliger Ruhelosigkeit sowie verstärktem Kratzen und Putzverhalten. Die möglichen Ursachen dieser Verhaltensabweichungen sind mannigfaltig.

2.6.1 Juckreiz (Pruritus)

Juckreiz wurde bereits 1660 als „unangenehme Empfindung, die das Verlangen nach Kratzen provoziert“ definiert. Er ist immer an der Haut oder Schleimhaut lokalisiert (Ekblom, 1995; Darsow et al., 2000).

Die Genese des Pruritus ist multifaktoriell (Weisshaar et al., 1996). Juckreiz kann durch Erkrankungen, die direkt in der Haut lokalisiert sind, entstehen, aber auch Erkrankungen, die sich an anderen Orten des Körpers abspielen, reflektieren (z.B. Cholestase (Gallestauung), Niereninsuffizienz, Urämie, Diabetes mellitus, biliäre Zirrhose, hämatopoetische Erkrankungen (Leukämie, erbliche Polyzythämie), Lymphome oder endokrine Erkrankungen). Bei systemischen Erkrankungen können Substrate in der Haut abgelagert werden oder metabolische und inflammatorische Vorgänge des Gesamtorganismus sekundär die Haut erfassen (Hägermark, 1995; Greaves & Wall, 1996; Weisshaar et al., 1996). Daneben sind auch psychosomatische und psychiatrische Erkrankungen zu nennen, die sich auf die Haut mit Juckreiz projizieren (Weisshaar et al., 1996).

2.6.1.1 Entzündliche Erkrankungen der Haut

Juckreiz mit Hautentzündungen (Dermatitis) tritt zum einen bei infektionsbedingten Erkrankungen wie Mykosen und bakterieller Dermatitis auf. Daneben spielen insbesondere allergische Reaktionen (Typ I Allergie, z.B. auf Futtermittel, bei Parasitenbefall) eine Rolle. Hierbei kommt es durch die Freisetzung verschiedener Mediatoren, wie z.B. von Histamin, Leukotrienen, oder Prostaglandinen, zu Juckreiz, verstärkter Gefäßpermeabilität und Hautrötung, verbunden mit einem Anstieg von Immunglobulin E (IgE) im Plasma und einer Zunahme der Mastzellen in der Haut (DeMora et al., 1996; Greaves & Wall, 1996).

2.6.1.2 Juckreiz ohne Entzündung der Haut

Bei Pruritus der nicht entzündeten Haut können systemische Erkrankungen, wie Cholestase oder chronische Nierenerkrankungen (Greaves & Wall, 1996; Weisshaar et al., 1996), zugrunde liegen. Bei Cholestase kommt es zu einem Anstieg von konjugiertem und nicht konjugiertem Bilirubin im Blut, Bilirubinurie und einer Schädigung der Leberzellen (Dämmrich & Loppnow, 1990). Auch chronische Nierenerkrankungen, die zu einer Urämie führen, sind häufig mit Juckreiz verbunden (Hägermark, 1995).

Die pathophysiologischen Mechanismen von Juckreiz sind erst teilweise erforscht (Weisshaar et al., 1996; Yamaguchi, 1998; Jinks & Carstens, 2002). Bei systemischen Erkrankungen wurden noch keine peripheren Juckreiz hervorrufenden Agenzien gefunden (Greaves & Wall, 1996). Aufgrund der unzureichenden Kenntnisse ist die Therapie des Pruritus problematisch (Schmelz, 2001, 2002). Eine Ursache hierfür stellt das Fehlen eines validen Tiermodells für neurophysiologische Studien an peripheren und zentralen Mechanismen des Juckreizes dar (Greaves & Wall, 1996; Rees & Laidlaw, 1999). Studien an Freiwilligen (Gesunde und Patienten mit klinischem Juckreiz) sollen helfen, diese Mechanismen zu klären (Ekblom, 1995). Somit könnte ein abnormales Kratzverhalten bei Mäusen als nützliches Modell zur Analyse der Mechanismen, die zu Juckreiz führen, dienen (Inagaki et al., 2001).

2.6.1.3 Neurophysiologische Aspekte von Juckreiz

Somatosensorische Reize verschiedener Ursache (chemische, mechanische, thermale) können Rezeptoren in der Haut und im subkutanen Gewebe aktivieren und somit über Impulse der afferenten Nerven spezifische Neurone im Zentralnervensystem (ZNS) stimulieren. Hierdurch kommt es zur Erzeugung verschiedener Empfindungen wie Berührung, Kitzeln, Schmerz und Juckreiz (Ekblom, 1995).

Als peripherer Ausdruck zentralnervöser Vorgänge ohne äußeren Stimulus, ist Juckreiz ebenfalls zu beobachten. Beispiele hierfür sind die Kratzreaktionen einiger Menschen auf Ausdrücke wie „Flöhe, Läuse“ etc. oder das Auslösen von Juckreiz durch epidurale Gabe von Morphinen (Ekblom, 1995; Greaves & Wall, 1996).

2.6.2 Hyperaktives Verhalten

Viele neurologische Erkrankungen des Menschen, bei denen genetische Ursachen eine Rolle spielen, gehen mit Verhaltensauffälligkeiten in Form von Hyperaktivität oder unkontrollierten motorischen Aktivitäten einher. Einige Beispiele aus dieser Gruppe von Störungen werden im Folgenden kurz dargestellt.

2.6.2.1 Restless Legs Syndrom

Das Restless Legs Syndrom (RLS) bezeichnet eine Erkrankung beim Menschen, deren Symptome verstärkt unter Ruhebedingungen auftreten (Earley, 2003; Freedom et al., 2003). Unangenehme Missempfindungen in den Beinen gehen mit einem ausgeprägten Bewegungsdrang einher und stellen die Kardinalsymptome des Restless Legs Syndroms dar. Charakteristischerweise sistieren die Symptome bei Bewegung und kehren in Ruhesituationen zurück. Bei 80-100% der Betroffenen sind nächtliche periodische Beinbewegungen (periodic leg movements) elektrophysiologisch nachweisbar. Die Erkrankung mit unbekannter Pathogenese tritt familiär gehäuft auf, wobei sie autosomal dominant vererbt wird. Die neurologische Untersuchung von Betroffenen ergibt keinen pathologischen Befund (Freedom et al., 2003).

2.6.2.2 Verhaltensstörungen

Das Tourette-Syndrom (TS, Gilles de la Tourette-Syndrom) und Zwangshandlungen (OCD, obsessive compulsive disorder) sind koexistierende Verhaltensstörungen ungeklärter neurologischer Ursache. Eine ätiologische Verwandtschaft beider Verhaltensstörungen wird vermutet (Jaisoorya et al., 2003). Die anormal wiederholten motorischen Verhaltensweisen sind oft übergreifend und nicht eindeutig dem Tourette-Syndrom oder den Zwangshandlungen zuzuordnen (Nordstrom & Burton, 2002; Miguel et al., 2003).

Tourette-Syndrom und Zwangshandlungen beim Menschen

Das Tourette-Syndrom ist eine neurologisch-psychiatrische Erkrankung, die beim Menschen durch unwillkürliche Bewegungen und Lautäußerungen, sogenannte motorische und vokale Tics, gekennzeichnet ist. Zusätzlich bestehen oftmals auch weitere Verhaltensauffälligkeiten wie Hyperaktivität und übermäßig auftretende Verhaltensweisen wie Nägelkauen, Wasch- und Putzwänge, chronisches wiederholtes Haare ausreißen (Trichotillomanie), aber auch selbstzerstörerisches Verhalten (Autoaggression) wie das übertriebene Hautkratzen und Zufügen von Verletzungen (Ball et al., 1996; Lochner et al., 2002). Mehrheitlich wird eine

Überfunktion des dopaminergen Systems innerhalb der Basalganglien als Ursache angenommen (Müller-Vahl et al., 2000). Diese Fehlregulierung chemischer Überträgerstoffe des Gehirns scheint häufig erblich bedingt zu sein. Eine autoimmune Ätiologie wird in vielen Fällen vermutet. So wurde in einigen Studien über das Vorhandensein von Autoantikörpern bei Tourette-Patienten berichtet (Taylor et al., 2002).

Tourette-Syndrom und Zwangshandlungen bei der transgenen Maus

Das Tourette-Syndrom und Zwangsverhalten beinhalten in der Regel die übermäßige Wiederholung von normalen Verhaltensabläufen. Diese Stereotypien beinhalten bei transgenen Mäusen nicht-aggressive Fell- und Hautpflege sowie das Beißen von Käfiggenossen oder sich selbst während des Putzens. Die Mäuse zeigen motorische Hyperaktivität und klettern vermehrt herum (Nordstrom & Burton, 2002).

2.6.2.3 Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Syndrom

Das Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Syndrom (attention-deficit hyperactivity disorder, ADHD) ist ein auf einer Störung der neurologischen Entwicklung basierender Zwang mit vielfältigem Erscheinungsbild. Im Vordergrund stehen hierbei eine eingeschränkte Aufmerksamkeit sowie übermäßige motorische Bewegung und Impulsivität (DiMaio et al., 2003). Ein objektiver Test für die Diagnose des Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Syndroms ist nicht vorhanden. Es tritt besonders im Kindesalter auf, jedoch wird über ein Fortbestehen im Erwachsenenalter berichtet (Spencer et al., 2002). Die Ätiologie dieser Erkrankung ist noch unbekannt, eine primäre Rolle spielen wahrscheinlich eine gestörte Dopaminübermittlung im Gehirn sowie genetische Faktoren (Cabib et al., 2002; DiMaio et al., 2003). Da es übergreifende Verhaltensweisen sowie Koexistenzen bei Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Syndrom und Zwangshandlungen bzw. Tourette-Syndrom gibt, gilt es, diese bei der Diagnose zu berücksichtigen. Von einem stagnierenden Wachstum mit vermindertem Körpergewicht und reduzierter Körpergröße im Zusammenhang mit ADHD wird berichtet, ebenso von Schilddrüsenfunktionsstörungen (Spencer et al., 1996; Spencer et al., 2002).

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere stammten aus der Versuchstierzucht und –haltung des zum Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der LMU München gehörenden Moorversuchsguts in Badersfeld (MVG). Es handelte sich um Tiere der Mauslinie SMA002, die im Rahmen des Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekts etabliert wurde sowie Tiere der Mausinzuchtstämme C57BL/6Jlco (B6), C3HeB/FeJ (C3H) und deren Kreuzungsprodukte. Die Erhaltungszucht der Linie SMA002 fand auf dem genetischen Hintergrund des Mausinzuchtstammes C3HeB/FeJ statt.

3.1.2 Versuchstierzucht

Das weibliche Foundertier der Mauslinie SMA002, ein F1-Nachkomme eines ENU behandelten C3H-Bocks, fiel zunächst bei der klinischen Untersuchung durch sein geringes Körpergewicht und seine geringe Körpergröße auf. Zur Etablierung der Linie wurde dieses weibliche F1-Tier mit einem C3H-Bock verpaart und die Vererblichkeit des abnormen Phänotyps auf die Nachkommen geprüft. Die ersten beiden Würfe brachten keine überlebenden Nachkommen. Erst der dritte Wurf lieferte vier Nachkommen, von denen zwei wiederum ein stark vermindertes Körperwachstum aufwiesen. Zusätzlich zeigte sich bei diesen Tieren eine Verhaltensauffälligkeit, die sich in verstärktem Putzverhalten, häufigem Kratzen und allgemeiner Unruhe äußerte. Der Phänotyp SMA002, der die zwei Hauptsyndrome „reduziertes Körperwachstum“ und „Verhaltensänderungen“ beinhaltet, wurde über sieben Generationen gezüchtet.

3.1.2.1 Erhaltungszucht

Für die Erhaltungszucht der Mauslinie wurden sowohl weibliche, als auch männliche heterozygot mutante Mäuse der SMA002-Linie mit C3H-Stammzuchttieren verpaart. Es wurde mit bis zu fünf Zuchtpaaren zeitgleich gezüchtet.

P: C3H / MUT ♀/♂ x C3H / WT ♂/♀
(+/-) (+/+)

↓

F1: C3H / MUT ♀/♂ C3H / WT ♀/♂
(+/-) (+/+)

Um homozygote Nachkommen zu erhalten, wurden ab der sechsten Generation heterozygot mutante Mäuse untereinander angepaart.

G6: C3H / MUT ♀ x C3H / MUT ♂
(+/-) (+/-)

↓

↓

G7: C3H / WT ♀/♂ C3H / MUT ♀/♂ MUT / MUT ♀/♂
(+/+) (+/-) (-/-)

3.1.2.2 Auszucht (Outcross)

In der Auszucht wurden drei männliche C3H (C3)-Mutanten mit je zwei weiblichen C57BL/6 (B6)-Wildtypen verpaart (Doppelpaarungen). Diese Auszucht hatte das Ziel, mischerbige mutante F1-Hybridtiere zu erzeugen. Diese Nachkommen wurden für die Rückkreuzung zur Erzeugung von N2-Mäusen für die Kartierung der Mutation benötigt.

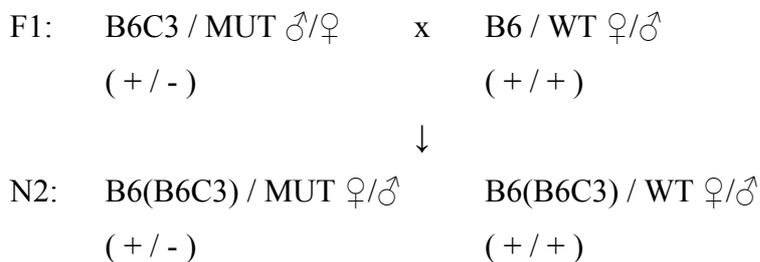
P: C3H / MUT ♂ x B6 / WT ♀
(+/-) (+/+)

↓

F1: B6C3 / MUT ♀/♂ B6C3 / WT ♀/♂
(+/-) (+/+)

3.1.2.3 Rückkreuzung (Backcross)

In der Rückkreuzung wurden 15 Zuchtpaare zeitgleich eingesetzt. Dazu wurden 13 männliche mutante F1-Hybridmäuse (B6C3F1) mit je einem weiblichen B6-Wildtypier sowie zwei weibliche mutante F1-Hybridmäuse (B6C3F1) mit je einem männlichen B6-Wildtypier angepaart. Die männlichen mutanten F1-Hybridmäuse wurden nach 4 Würfen mit neuen weiblichen B6-Wildtypieren verpaart. Insgesamt wurden 27 Anpaarungen angesetzt. Durch die Rückkreuzung wurden mutante und nicht mutante Nachkommen mit gemischtem genetischen Hintergrund gezüchtet, die für die Kopplungsanalyse zur Lokalisation des mutierten Gens benötigt wurden (**Abb. 3**).



3.1.3 Tierhaltung

Alle Tiere wurden in einem Tierraum unter standardisierten Bedingungen gehalten. Die Raumtemperatur betrug $22 \pm 2^\circ\text{C}$ bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60% und einem hell-dunkel Zyklus von 12 Stunden (7 Uhr bis 19 Uhr hell). Die Mäuse wurden in Typ 2-Makrolon-Käfigen (26 cm x 20 cm x 14 cm) auf einer Labortiereinstreu aus Weichholzfasern (ssniff bedding $\frac{3}{4}$ Faser, Firma ssniff, Soest, Art.-Nr. H1505-01) gehalten. Zusätzlich zur Einstreu wurde den werfenden Zuchtweibchen und den Zuchtpaaren mit frischgeborenen Jungtieren Nistmaterial (Nestlets, Firma EBECO, Castrop-Rauxel, Art.-Nr. 3097055) angeboten. Jungtiere wurden im Alter von 3 bis 4 Wochen (d21-d28) abgesetzt, durch einen Ohrlochcode individuell markiert und in nach Geschlechtern getrennte Gruppen aufgeteilt. Die Besatzdichte lag bei 1 bis 5 Mäusen pro Käfig. Wasser und Futter standen den Tieren zur freien Verfügung (pelletierte Standarddiät, Altromin 1314, Ratte/Maus-Zucht, bestrahlt). Der Gesundheitszustand der Mäuse der Anlage des MVG wurde durch ein regelmäßig, alle drei Monate stattfindendes Hygienemonitoring überwacht. Für diese Hygieneüberwachung wurden je 15 bis 18 erwachsene Mäuse aus eigener Zucht nach den Felasa-Richtlinien (<http://www.felasa.org>) auf virologische, bakterielle, mykotische und parasitologische Krankheitserreger untersucht (The Microbiology Laboratories, England). Eine Zusammenstellung der untersuchten Keime und der Ergebnisse ist im Anhang dargestellt.

3.1.4 Tierversuch

Erstellung und Analyse von Mausmutanten im Rahmen des Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekts wurden als Tierversuch von der zuständigen Behörde (Regierung von Oberbayern) genehmigt. Zu diesem Tierversuch zählten die Mutagenese von männlichen C3H-Mäusen durch Injektion von ENU und die in den Untersuchungen anfallenden Probennahmen von Blut und Schwanzbiopsien der F1- und G3-Nachkommen mutagenisierter Mausböcke. Haltung und Zucht der etablierten mutanten SMA002-Linie wurden entsprechend der Vorschriften der Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Entnahme von Blut und Schwanzbiopsien bedurften als diagnostische Maßnahmen keiner Genehmigung. Das Töten von Tieren dieser Linie zur Gewinnung von Gewebe- und Organproben war meldepflichtig.

3.2 Klinische Untersuchung

Die Mäuse der Linie SMA002 wurden am Tag ihrer Geburt mit einem wasserfesten Farbstift individuell markiert (Punktcode). Die anschließende klinische Untersuchung der SMA002-Tiere erfolgte anhand der beiden Hauptsyndrome der Linie „Verhaltensänderungen“ und „reduziertes Körperwachstum“ der Mäuse.

3.2.1 Verhaltensbeobachtung

Die Nachkommen der Mauslinie SMA002 wurden vom Tag ihrer Geburt bis zum 10. Lebenstag täglich 5 min beobachtet. Die weiteren Verhaltensbeobachtungen erfolgten zeitgleich mit den Wiegeterminen am 14. und 21. Lebenstag und danach einmal pro Woche. Das Verhalten der Mäuse wurde hinsichtlich der Aktivität, des Schlafverhaltens und der Häufigkeit anfallsartiger Kratz- und Zuckbewegungen beurteilt. Bei den Nestjungen bis zum Alter von 10 Tagen wurde auf Zuck- und Rüttelbewegungen des gesamten Körpers sowie Strampeln mit den Extremitäten geachtet. Für den Beobachtungszeitraum wurden die Elterntiere aus dem Käfig entfernt, die Jungen blieben im Nestverband. Mit Zunahme der lokomotorischen Aktivität im Alter von 14 Tagen wurde das Verhalten in Bezug auf das Sozialverhalten, die Bewegung im Raum, das Putzverhalten, das Ruhe- und Schlafverhalten sowie die Futter- und Wasseraufnahme beobachtet. Das Auftreten von spontanem Zucken der Rückenmuskulatur mit anschließendem Putzverhalten, das Aufschrecken aus dem Schlaf und das Unterbrechen der Futter- und Wasseraufnahme während eines Beobachtungszeitraumes von 5 min wurden erfasst.

3.2.2 Körpergewichtsentwicklung

Die Körpergewichtsentwicklung der SMA002-Mäuse wurde anhand eines Wiegeprotokolls erfasst. Mit einer Präzisionswaage (KERN 440-47, WTM, München) wurde das Körpergewicht (KGW) auf 0.1g genau gemessen.

Alle Nachkommen aus Würfen der Linie SMA002 wurden vom Tag ihrer Geburt (d0) bis einschließlich des 10. Lebenstages (d10) täglich gewogen. Anschließend wurde das KGW an Tag 14 und 21 kontrolliert. Das KGW der abgesetzten Mäuse wurde vom 25. Lebenstag (~ 4. Lbw) an im wöchentlichen Abstand bis zum Alter von 180 Tagen (26. Lbw) protokolliert.

3.2.3 Gruppenzugehörigkeit

Die Tiere wurden anhand ihres Verhaltens und ihrer Körpergewichtsentwicklung in die zwei Gruppen „Mutanten“ und „Wildtypiere“ eingeteilt. Bei mutanten Nestjungen wurde mindestens dreimaliges Rüttelverhalten und dreimaliges Strampeln mit den Extremitäten während eines Überwachungszeitraumes von 5 min an einem Tag registriert. Ab dem 14. Lebenstag wurde das jeweils 1-3malige Auftreten von spontanem Zucken der Rückenmuskulatur mit anschließendem Putzverhalten, das Aufschrecken aus dem Schlaf und das abrupte Unterbrechen der Futter- und Wasseraufnahme zum Kratzen oder Putzen im Beobachtungszeitraum als mutantes Verhalten gewertet.

In der Körpergewichtsentwicklung wurden Tiere, die am 21. Lebenstag ein deutlich geringeres Körpergewicht als ihre Wurfgeschwister besaßen (Richtwert: unter 10 g) als mutante Tiere gewertet.

Die Gruppenzugehörigkeit der Tiere der Linie SMA002 wurde am Tag ihres Absetzens von den Elterntieren anhand des registrierten Verhaltens und des Körpergewichts festgelegt. Als mutante Mäuse wurden Tiere gewertet, die sowohl in der Verhaltensbeobachtung als auch in der Körpergewichtsentwicklung als mutant eingestuft worden waren. Dabei zeigte sich eine strikte Korrelation im Hinblick auf das Auftreten dieser beiden Hauptsyndrome. Die phänotypische Gruppenzuordnung der Tiere wurde im wöchentlichen Abstand kontrolliert, indem das Verhalten der Tiere vor (Ruhephase) und nach dem Wiegen (Aktivitätsphase) sowie das Körpergewicht registriert wurden.

3.2.4 Gruppenzuordnung der Auszucht- und Rückkreuzungstiere

Die phänotypische Zuordnung der Auszucht- und Rückkreuzungstiere erfolgte anhand der einmaligen Körpergewichtsmessung und der einmaligen Verhaltensbeobachtung. Als mutante

Mäuse in der Körpergewichtsentwicklung wurden Tiere gewertet, die zwischen dem 21. und dem 24. Lebenstag ein Körpergewicht unter 10 g bzw. zwischen dem 25. und dem 28. Lebenstag ein Körpergewicht unter 12 g aufwiesen. Wildtypiere besaßen in der entsprechenden Zeitspanne ein Körpergewicht über 12 g bzw. über 14 g. Die Verhaltensstudie erfolgte analog zu den Tieren der Erhaltungszucht. Tiere, die in beiden Untersuchungen als mutante Mäuse eingestuft worden waren, wurden als mutante SMA002-Hybridtiere gewertet. Die mutanten B6C3F1-Hybridtiere wurden für die Rückkreuzungszucht herangezogen. Des Weiteren wurden mutante B6C3F1-Hybridtiere und Wildtypiere für die Gewinnung von Organproben verwendet. Bei den Nachkommen der Rückkreuzungszucht (N2-Tiere) wurden Tiere beider Gruppen (Mutanten und Wildtypiere) für die Kartierung der Mutation genutzt.

3.3 Pathologische Untersuchung

3.3.1 Sektion

Zur Sektion wurden 24 B6C3F1-Hybridmäuse, je 6 heterozygot mutante männliche und weibliche Tiere sowie je 6 nicht mutante männliche und weibliche Tiere, im Alter von ca. 180 Tagen verwendet. Die Mäuse wurden unter Äthernarkose gewogen und durch Punktion des retrobulbären Venenplexus mittels einer heparinisierten Kapillare weitgehend entblutet. Die Nasenrumpflänge (NRL) der Maus wurde in Rückenlage auf Millimeterpapier gemessen. Anschließend wurde durch zervikale Dislokation der Tod des Tieres herbeigeführt. Nach Enthäutung des Tierkörpers wurde durch einen Längsschnitt die Bauchhöhle eröffnet und die Bauchhöhlenorgane entnommen. Es folgten die Eröffnung der Brusthöhle und die Entnahme der Brusthöhlenorgane. Die Speicheldrüsen wurden abpräpariert. Nach Fixierung des Tierkörpers in Bauchlage wurde die Rückenmuskulatur zur Freilegung der Wirbelsäule abpräpariert. Dies ermöglichte eine rasche Fixierung des Rückenmarkes. Danach wurde der Kopf vom Körper abgetrennt. Die Schädeldecke wurde vom Foramen ovale ausgehend eröffnet und das Gehirn mit einer Pinzette herausgehoben. Um eine Aussage über die Zusammensetzung der Tierkörper zu treffen, ohne diese zu homogenisieren, wurden das Mesenterium sowie das Fett im Bereich des Nierenlagers und um die Geschlechtsorgane herauspräpariert, gewogen und als Körperfett definiert.

Folgende Organ- und Gewebeproben wurden der Reihe nach genommen: Haut, Pankreas, Milz, Nieren, Nebennieren, Magendarmtrakt, Leber (ohne Gallenblase), Geschlechtsorgane

(Eierstöcke, Gebärmutter/ Hoden, Nebenhoden), Lunge, Herz, Thymus, Speicheldrüsen, Gehirn (ZNS), Körperfett.

3.3.2 Organgewichtsbestimmung und Gewebefixierung

Alle Organ- und Gewebeproben wurden fettfrei herauspräpariert und mittels Zellstoff von Restblut befreit. Danach wurden sie mit einer Analysenwaage (KERN 770, WTM, München) auf 0.1 mg genau gewogen. Die Gewebefixierung fand mit 5 %igem gepufferten Formalin statt.

Bei 6 mutanten B6C3F1-Hybridmäusen und entsprechenden Wildtyphybridtieren erfolgte die Gewinnung und Fixierung der Organ- und Gewebeproben wie oben beschrieben. Zusätzlich wurde je ein Hautstück von einer besonders durch Kratzen beanspruchten Region (kaudale Region am Übergang von Rücken zur Hüfte) und einer nicht durch Kratzen beanspruchten Region (ventrale Region zwischen den Vorderbeinen), sowie die Karkasse (Kar), nachdem die Wirbelsäule von der Muskulatur befreit worden war, in 2.5 %igem Glutaraldehyd fixiert. Die fixierten Proben wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Tierpathologie der Universität München (Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie) untersucht.

3.4 **Untersuchung der Blutparameter**

3.4.1 Blutentnahme und Probenaufbereitung

Den 12 Wochen alten Mäusen wurde durch Punktion des retrobulbären Venenplexus mittels einer heparinisierten Kapillare (0.8 mm Ø, 32 mm lang, K&K Laborbedarf, München) eine Blutprobe in Äther-Inhalationsnarkose (Diethylether, Carl Roth, Karlsruhe) entnommen. 0.4 ml des Blutes wurde zur Plasmagewinnung (Gerinnungshemmer: Lithium-Heparin, KABE Labortechnik, Nürnberg-Elsenroth) entnommen.

Des Weiteren wurde Blut (50 µl) für die hämatologische Untersuchung gewonnen (Gerinnungshemmer: EDTA di-Kaliumsalz, KABE Labortechnik, Nürnberg-Elsenroth) und umgehend mit einem Blutanalysegerät (Animal Blood Counter, VETabcTM, ABX Deutschland, Göppingen) untersucht.

Die Proben zur Plasmagewinnung wurden 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie bei 7000 U/min für 5 min zentrifugiert wurden (Biofuge fresco, Heraeus Instruments, München). Anschließend wurde das Plasma vorsichtig abpipettiert und aufgeteilt (**Tab. 3**).

<u>Tabelle 3:</u>		
Verteilungsschema der Plasma- und Vollblutproben für die verschiedenen Untersuchungen des Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekts		
Screen	Plasma/ Vollblut	Probengefäße
Allergie	30µl Plasma	Microtest- Platten
Immunologie	30µl Plasma	Microtest- Platten
Klinische Chemie	130µl Plasma	Neutrale Probengefäße

Die gefüllten Microtest-Platten wurden mit selbstklebender Aluminiumfolie (Beckman Instruments, München) verschlossen und das gesamte Probenmaterial bis zu seiner weiteren Analyse maximal 7 Tage bei – 20°C gelagert.

3.4.2 Klinische Chemie

Die Messung der klinisch-chemischen Parameter wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für klinische Chemie des Städtischen Krankenhauses München Harlaching mit dem Analysegerät Hitachi 717 (Boehringer, Mannheim) unter Verwendung der von Roche (Mannheim) und BIOMED Labordiagnostik (Oberschleißheim) dafür adaptierten Reagenzien durchgeführt.

Tabelle 4 zeigt die mit dem Hitachi 717 gemessenen Parameter mit Angabe der bei der Messung verwendeten Meßmethoden, bzw. Testprinzipien.

3.4.3 Blutzellzählung mit dem Hämatologie-Analyser

Die Messung der hämatologischen Parameter wurde mit einem Blutanalysegerät (Animal Blood Counter, VETabc™, ABX Deutschland, Göppingen) unter Verwendung der entsprechenden Reagenzien von ABX Deutschland durchgeführt.

In **Tabelle 5** finden sich die Bezeichnungen der gemessenen hämatologischen Parameter mit den verwendeten Abkürzungen.

3.4.4 Weiterführende Untersuchungen

Weitere Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit den dem Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekt angeschlossenen Screens (Allergie, Immunologie) durchgeführt. Im Allergie-Screen wurden die basalen Immunglobulin E-Werte (IgE) mit Hilfe eines isotyp-spezifischen Sandwich-ELISA für Maus-IgE und einem Standard-microwell-ELISA-Reader

bei 450 nm ermittelt (Alessandrini et al., 2001). Im Immunologie-Screen wurden die basalen Immunglobulin-Werte für IgM, IgG₃ und IgA sowie die Konzentration von Anti-DNA-Ak (aAK) und Rheumafaktor (Rf) mittels ELISA bestimmt. Darüber hinaus wurde mittels Durchflußzytometrie ein Spektrum von Oberflächenproteinen auf Immunzellen des peripheren Blutes analysiert (Flaswinkel et al., 2000).

<u>Tabelle 4:</u>	
Liste der mit einem Hitachi 717 Analysegerät erfassten klinisch-chemischen Parameter	
Elektrolyte	Methode
Natrium (Na)	I.S.E. indirekte Potentiometrie
Kalium (K)	I.S.E. indirekte Potentiometrie
Kalzium (Ca)	o- Kresolphthalein- Komplexon
Chlorid (Cl)	I.S.E. indirekte Potentiometrie
Anorganisches Phosphat (P)	UV-Test für Phosphat Molybdat-Reaktion
Enzyme	Testprinzip
α-Amylase (AMY)	enzymatischer Farbtest zur kinetischen Bestimmung
Alanin- Aminotransferase (ALT)	UV-Test
Aspartat- Aminotransferase (AST)	UV-Test
Kreatinkinase (CK)	UV-Test
Alkalische Phosphatase (AP)	optimierte Standardmethode
Substrate	Testprinzip
Cholesterin (CHO)	Enzymatischer Farbtest
Triglyceride (TGL)	Enzymatischer Farbtest
Glukose (GLS)	UV-Test
Gesamteiweiß (TP)	Biuret- Methode
Harnsäure (HSR)	Enzymatischer Farbtest
Harnstoff (HST)	Kinetischer UV-Test
Kreatinin (Crea)	Jaffé-Methode kinetisch ohne Enteiweißung

<u>Tabelle 5:</u>	
Liste der mit dem Hämatologie-Analyser erfassten Parameter	
Parameter	Abkürzung
Leukozytenzahl	WBC (Zellzahl der weißen Blutkörperchen)
Erythrozytenzahl	RBC (Zellzahl der roten Blutkörperchen)
Erythrozytenindizes	MCV (mittleres Zellvolumen der Erythrozyten)
	MCH (mittlerer zellulärer Hämoglobingehalt der Erythrozyten)
	MCHC (mittlere zelluläre Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten)
Hämoglobin	HGB (roter Blutfarbstoff in den Erythrozyten)
Hämatokrit	HCT (Zellpackungsvolumen)
Thrombozyten	PLT (Zahl der Blutplättchen)

3.5 Untersuchung von IGF-I, -II und IGF-Bindungsprotein 2

3.5.1 Probennahme

Für die Untersuchung der insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (Insulin-like Growth Factors, IGF) und IGF-Bindungsproteine (IGFBP) wurde bei 16 Mäusen der Linie SMA002 und 19 C3H-Kontrollmäusen im Alter zwischen 61 und 146 Lebenstagen unter Äthernarkose Blut gewonnen. Es handelte sich um 12 männliche Mäuse aus der SMA002-Erhaltungszucht (6 Mutanten, 6 Wildtypiere), 14 männliche C3H-Kontrolltiere sowie 4 weibliche Mäuse der Linie SMA002 (3 Mutanten, 1 Wildtypier) und 5 weibliche C3H-Kontrolltiere. Die C3H-Mäuse dienten zur Ermittlung der Referenzwerte.

Von jeder Maus wurde eine Vollblutprobe von 500 µl in ein Probengefäß (Eppendorf, Hamburg) genommen, zwei Stunden im Kühlschrank bei 4°C inkubiert und danach für 5 min bei 4°C und 13.000 U/min zentrifugiert. Das Serum (mindestens 150 µl) wurde in Probengefäße überführt und bei -20°C gelagert.

3.5.2 Radio-Immun-Assay (RIA)

In Zusammenarbeit mit der Abteilung für Endokrinologie der Universitäts-Kinderklinik Tübingen (Dr. M. Elmlinger) wurden die Serumkonzentrationen von IGF-I, -II und IGFBP-2 im RIA nach etablierten Methoden gemessen (Wolf et al., 1994; Höflich et al., 1998).

3.6 Kartierung der Mutation

3.6.1 Tiermaterial

Für die Kartierung der Mutation im Genom der SMA002-Linie wurden Proben von mutanten N2-Tieren (Mutanten) und Proben von nicht mutanten Wurfgeschwistern (Wildtypiere) aus der Rückkreuzung herangezogen. Die N2-Mäuse wurden von Geburt an beobachtet, am Absetztermin gewogen und phänotypisiert. Dies geschah anhand des geringeren KGW der N2-Mutanten sowie durch ihr äußeres Verhalten (gesteigertes Kratzen/ Unruhe). Die Mutation zeigte eine vollständige phänotypische Penetranz. Aus diesem Grund wurden Tiere beider Phänotypen für die Kopplungsanalyse herangezogen.

3.6.2 Probennahme

N2-Tiere wurden zwischen dem 21. und 35. Lebenstag durch zervikale Dislokation getötet. Zwei ca. 1 cm lange Schwanzbiopsien wurden per Scherenschlag gewonnen und auf zwei auf Trockeneis gelagerte Probenplatten (1,2 ml Deep-Well-Platten, Abgene house, Epson, Surrey, UK) verteilt (A-/B-Platte).

Danach wurde die Milz herauspräpariert und umgehend in einem Probengefäß (Eppendorf, Hamburg) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Probenplatten wurden mit selbstklebender Aluminiumfolie (Beckman Instruments, München) verschlossen, und alle Proben bei -80°C gelagert. Die Proben der A-Platten wurden für die Kartierung der Mutation herangezogen. Die Milzproben sowie die Schwanzbiopsien der B-Platten wurden bei -80°C archiviert.

3.6.3 Isolation von genomischer DNA (Sambroock & Russell, 2001)

Die genomische DNA wurde aus 0.5-1 cm langen Schwanzbiopsien isoliert. Dafür wurde die Gewebeprobe über Nacht bei 55°C mit 0,5 mg Proteinase K (Roche Diagnostics, Mannheim) in 500 μl Prot K Puffer (0.5% SDS, 10 mM Tris, pH 8.0, 5 mM EDTA, pH 8) verdaut. Nach einmaliger Phenol- und zweimaliger Chloroformextraktion des Ansatzes wurde die genomische DNA mit Ethanol präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet, in TE-Puffer (10 mM Tris, pH 8.0, 4 mM EDTA, pH 8.0) gelöst und bei 4°C gelagert.

3.6.4 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Ermittlung der DNA-Konzentration erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) im UV-Spektralphotometer (Beckmann DU 640, Beckmann Instruments, München) bei den Wellenlängen von 260 und 280 nm. Ein $\text{OD}_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ genomischer DNA. Die Berechnung des Quotienten OD_{260} zu OD_{280} zeigt den Reinheitsgrad der Probe. Ein Verhältnis von 1.8- 2.0 entspricht hochreiner DNA.

3.6.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) werden definierte Abschnitte aus geringen DNA-Mengen vervielfältigt.

Die Standard-PCR wurde mit folgenden Komponenten in 20 μl -Reaktionsansätzen durchgeführt:

10 x PCR- Puffer	2 µl
dNTPs (je 2 mM)	2 µl
MS-Primer (2.5 pmol/µl, je Forward- und Reverse-Primer)	2 µl
5 x Q- Solution (Qiagen, Stabilisator)	4 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.25 µl
Taq (5 U/µl)	0.2 µl
Genomische DNA (100 ng/Probe)	1 µl
Aqua bidest.	ad 20 µl

Unter standardisierten Bedingungen erfolgte die Reaktion in einem Thermocycler (Eppendorf Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg):

1. Initiale Denaturierung (94°C, 4 min)
2. 35 Zyklen: Denaturierung (94°C, 30 sec), Primer-annealing (60°C, 30 sec), Elongation (72°C, 1 min)
3. Terminale Elongation (72°C, 5 min)
4. Kühlung (4°C)

3.6.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auswertung der Mikrosatelliten-PCR-Reaktionen wurden die PCR-Produkte in einem 3%igem Agarosegel (Gibco BRL, Karlsruhe, Ultra Pure, Electrophoresis grade) in 1 x Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE) mit Ethidiumbromidlösung (Sigma, Steinheim) zur Sichtbarmachung der DNA nach Standardprotokoll elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurden die PCR-Produkte mit Hilfe eines Geldokumentationssystems (Eagle Eye II, Stratagene, Heidelberg) unter UV-Licht (312 nm) analysiert.

3.6.7 Grobkartierung der Mutation durch Kopplungsanalyse (Linkageanalyse) (Silver, 1995)

Die Grobkartierung der Mutation wurde mit DNA-Pools von mehreren Tieren des gleichen Phänotyps in Zusammenarbeit mit der Firma Medigenomix (<http://www.medigenomix.de>) durchgeführt. Diese Methode hat den Vorteil einer erheblichen Pipettier- und PCR-Reaktionsreduktion.

Die aus Schwanzbiopsien gewonnenen genomischen DNAs von je 20 N2-Tieren der zwei Phänotypgruppen wurden in äquimolaren Mengen gepoolt (Sammelproben von 20 Mutanten und 20 Wildtypmäusen). Als Marker für die Kartierung wurden polymorphe

Mikrosatellitenloci (MS) gewählt, die eine gleichmäßige Abdeckung des gesamten autosomalen Genoms gewährleisten. Pro Chromosom wurden drei gleichmäßig verteilte, zwischen den zu untersuchenden Mausinzuchtstämmen C3H und C57BL/6 polymorphe Mikrosatelliten verwendet. Die Lokalisation und die erwarteten Fragmentlängen der verwendeten 57 Mikrosatellitenmarker wurden der MGI Datenbank des Jackson Laboratory (Maine, USA, Stand April 2003) (<http://www.informatics.jax.org>) entnommen und sind in den **Tabellen 6a** und **b** aufgelistet.

Die Geschlechtschromosomen wurden nicht in die genotypische Untersuchung integriert, sondern mittels Zucht als Träger der Mutation ausgeschlossen. Das Y-Chromosom wurde ausgeschlossen, da auch weibliche Tiere den mutanten Phänotyp zeigten. Das X-Chromosom wurde ausgeschlossen, da mutante Böcke auch mutante männliche Nachkommen erzeugten.

Mit Hilfe der PCR wurden die 57 Mikrosatellitenloci der beiden DNA-Pools amplifiziert (**Tab. 6a** und **b**). Die PCR-Produkte wurden auf einem ABI 3100 Kapillarsequenzier (Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ihre Fragmentlänge mit den Software-Programmen GeneScan und GenoTyper (Applied Biosystems, Weiterstadt) bestimmt. Für jeden der Pools (Mutanten und Wildtypiere) wurde dann für jeden Marker das Verhältnis der Intensität der beiden stammspezifischen Signale bestimmt. Nach der Kartierung der Mutation auf ein definiertes Chromosom wurden weitere polymorphe Mikrosatellitenmarker für dieses Chromosom ausgewählt und damit die einzelnen DNA-Proben der eingesetzten Tiere zur Feinkartierung untersucht.

Tabelle 6a:

Zusammenstellung der zur chromosomalen Kartierung ausgewählten Mikrosatellitenmarker, ihrer Lokalisation und Fragmentlängen für die Mausinzuchtstämme C3H und C57BL/6

Chromosom (Gesamtlänge in cM)	Mikrosatellit	Lokalisation (cM)	Allele (bp)	
			C3H	C57BL/6
1 (112)	D1Mit294	8,3	156	150
	D1Mit213	25,7	96	108
	D1Mit46	43,1	276	256
2 (115)	D2Mit7	28,0	142	147
	D2Mit13	47,5	180	190
	D2Mit395	66,9	122	128
3 (95)	D3Mit130	3,9	121	149
	D3Mit77	49,7	164	150
	D3Mit128	83,5	159	151
4 (81)	D4Mit108	12,1	157	133
	D4Mit27	42,5	118	150
	D4Mit189	71,0	102	124
5 (102)	D5Mit148	18,0	135	149
	D5Mit113	42,0	104	98
	D5Mit138	69,0	116	146
6 (85)	D6Mit138	0,7	135	111
	D6Mit33	25,5	146	140
	D6Mit188	32,5	155	130
7 (79)	D7Mit191	3,4	131	131
	D7Mit238	53,0	132	156
	D7Mit189	72,4	120	122
8 (84)	D8Mit4	14,0	195	157
	D8Mit166	56,0	126	122
	D8Mit93	72,0	170	168
9 (74)	D9Mit90	9,0	143	145
	D9Mit130	27,0	141	121
	D9Mit115	56,0	137	145

(Datenbank MGI, Jackson Laboratory, Stand April 2003) (<http://www.informatics.jax.org>)

Tabelle 6b:

Zusammenstellung der zur chromosomalen Kartierung ausgewählten Mikrosatellitenmarker, ihrer Lokalisation und Fragmentlängen für die Mausinzuchtstämme C3H und C57BL/6

Chromosom (Gesamtlänge in cM)	Mikrosatellit	Lokalisation (cM)	Allele (bp)	
			C3H	C57BL/6
10 (81)	D10Mit152	4,0	148	154
	D10Mit10	51,0	128	180
	D10Mit271	70,0	104	116
11 (80)	D11Mit82	14,0	134	134
	D11Mit41	49,0	166	136
	D11Mit48	77,0	130	136
12 (87)	D12Mit38	1,0	148	142
	D12Mit60	16,0	138	144
	D12Mit133	56,0	111	117
13 (78)	D13Mit117	19,0	126	120
	D13Mit210	40,0	130	142
	D13Mit77	73,0	270	280
14 (69)	D14Mit233	19,5	184	200
	D14Mit7	44,5	95	107
	D14Mit131	58,0	102	108
15 (73)	D15Mit5	22,2	114	98
	D15Mit68	44,1	120	112
	D15Mit42	55,5	164	188
16 (72)	D16Mit154	3,4	116	146
	D16Mit4	27,3	123	132
	D16Mit70	57,0	169	189
17 (60)	D17Mit164	4,1	126	136
	D17Mit176	22,5	182	174
	D17Mit93	44,5	170	156
18 (75)	D18Mit19	2,0	160	154
	D18Mit149	24,0	116	136
	D18Mit33	44,0	136	142
19 (57)	D19Mit61	9,0	149	131
	D19Mit40	25,0	106	112
	D19Mit1	52,0	142	121

(Datenbank MGI, Jackson Laboratory, Stand April 2003) (<http://www.informatics.jax.org>)

3.6.8 Feinkartierung der Mutation

Für die Feinkartierung der Mutation auf Chromosom 13 wurden insgesamt 17 polymorphe Mikrosatellitenmarker mit einem maximalen Abstand von 12 cM verwendet. In dieser Analyse wurden zusätzlich zu den bereits für die Poolanalyse verwendeten DNAs weitere 95 DNA-Proben von mutanten Rückkreuzungstieren herangezogen.

Die Lokalisation und die Fragmentlängen der für die Feinkartierung getesteten 17 Mikrosatelliten sind in **Tabelle 7** enthalten. Die angegebenen Lokalisationen wurden der MGI Datenbank des Jackson Laboratory entnommen.

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Rohdaten aus der Körpergewichtsmessung, der Untersuchung der klinisch-chemischen, hämatologischen und hormonellen Parameter sowie der Körpermaße und Organgewichte erfolgte unter Zuhilfenahme des Statistikprogramms SPSS, Version 11.0 für Windows (SPSS, München). Um die untersuchten Gruppen zu charakterisieren, wurden Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Anschließend wurde die Signifikanz der Einflüsse für die Faktoren Gruppe, Geschlecht und der Interaktionseffekt von Gruppe x Geschlecht auf die gemessenen Parameter per Varianzanalyse bestimmt. Zuletzt wurden die gefundenen Mittelwertunterschiede für die einzelnen Parameter mit Hilfe des t-Tests auf Signifikanz geprüft. Der Referenzbereich für die klinisch-chemischen und hämatologischen Parameter wurde durch die Bestimmung der 5. und 95. Perzentile der bei C3H-Stammzucht-tieren gemessenen Werte festgelegt.

Tabelle 7:

Zusammenstellung der zur Feinkartierung auf Chromosom 13 ausgewählten Mikrosatellitenmarker, ihrer Lokalisation und Fragmentlängen für die Mausinzuchtstämme C3H und C57BL/6

Mikrosatellit	Lokalisation (cM)	Allele, Fragmente (bp)	
		C3H	C57BL/6
D13Mit303	7,0	116	124
D13Mit14	10,0	144	148
D13Mit117	19,0	126	120
D13Mit63	26,0	146	142
D13Mit64	30,0	116	102
D13Mit248	34,0	94	114
D13Mit20	35,0	178	158
D13Mit253	37,0	100	78
D13Mit67	37,0	160	152
D13Mit210	40,0	130	142
D13Mit193	43,0	144	126
D13Mit159	47,0	160	142
D13Mit148	59,0	117	137
D13Mit260	65,0	109	115
D13Mit196	68,0	137	133
D13Mit77	73,0	270	280
D13Mit35	75,0	182	190

Die bereits in der Grobkartierung genutzten Mikrosatelliten wurden fett gedruckt.
(<http://www.informatics.jax.org>) (Datenbank MGI, Jackson, Stand April 2003)

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die durch ENU-Mutagenese erzeugte Mausmutante SMA002 untersucht. Das weibliche Foundertier dieser dominanten Linie war ein Nachkomme eines mutagenisierten männlichen C3H-Tieres. Die zwei Hauptsyndrome der Linie sind „reduziertes Körperwachstum“ und „Verhaltensänderungen“. Der Zeitraum der umfassenderen Charakterisierung umfasste die 4. bis 7. Generation der Linie SMA002.

4.1 Zucht

Anpaarungen von männlichen und weiblichen heterozygot mutanten Mäusen mit C3H-Wildtyptieren lieferten jeweils ca. 2/3 lebende Nachkommen. Etwa 1/3 der Nachkommen wurden tot geboren (12%) oder starben (23%) vor dem Erreichen des Absetzalters (4.-5. Lebenswoche). Die toten Nachkommen der Kontrollanpaarungen teilten sich ebenfalls in 1/3 Totgeburten und 2/3 Nachkommen, die vor der 4. Lebenswoche verstarben. Die Anpaarungen heterozygoter weiblicher Mäuse x C3H erbrachten insgesamt 137 lebende Nachkommen, von denen 46% mutante Mäuse waren. Aus Anpaarungen heterozygoter Böcke x C3H entstanden 41 lebende Nachkommen (61% Mutanten). Die insgesamt 178 überlebenden Nachkommen der Anpaarungen heterozygoter SMA002-Mäuse x C3H teilten sich somit in 51% Wildtyptiere und 49% mutante Mäuse auf. Die Einteilung in die beiden Gruppen erfolgte in der 4. Lebenswoche anhand der strikten Korrelation des Auftretens der beiden Hauptsyndrome „reduziertes Körperwachstum“ und „Verhaltensänderungen“. Die vollständige phänotypische Penetranz der Mutation wurde durch das Auftreten der gleichen Anzahl von Tieren beider Gruppen aus diesen Anpaarungen bestätigt (Vorzeichentest von Dixon und Mood, Sachs, 2002). Zur Erstellung von homozygoten SMA002-Nachkommen wurden heterozygote Tiere verpaart. Die Zuchterfolge dieser Anpaarungen waren mäßig. Sie erbrachten nur ca. 40% lebende Jungtiere (n=25); darunter waren 8 mutante Mäuse (32%). Nachkommen mit einer verstärkten Ausprägung der beiden Hauptsymptome (geringes Körpergewicht, Ruhelosigkeit), was auf Homozygotie der mutanten Mäuse hätte schließen lassen, waren nicht zu erkennen.

Die Zuchtdaten wurden in der **Tabelle 8** zusammengefasst.

<u>Tabelle 8:</u>							
Zusammenfassung der Zuchtdaten der Linie SMA002							
Anpaarungen	Anzahl	Würfe	Nachkommen (gesamt)	Tote n (%)	Lebende n (%)	Phänotyp Wildtypiere n (%)	Mutanten n (%)
het ♀ x C3H	9	47	211	74 (35)	137 (65)	74 (54)	63 (46)
het ♂ x C3H	5	14	65	24 (37)	41 (63)	16 (39)	25 (61)
het x C3H (gesamt)	14	61	276	98 (35,5)	178 (64,5)	90 (51)	88 (49)
het x het	5	11	61	36 (59)	25 (41)	17 (68)	8 (32)
Kontrolle: C3H x C3H	9	52	288	53 (18)	235 (82)		
Die Anzahl der geborenen Nachkommen (Tote/ Lebende) wurde nach dem Absetzen mit ca. 4 Lebenswochen erfasst, zeitgleich erfolgte die phänotypische Gruppeneinteilung. het: heterozygot mutante Mäuse, C3H: C3H-Stammzuchttiere; n: Anzahl							

4.2 Syndrom „Verhaltensänderungen“

Die Beobachtung des Verhaltens der SMA002-Mäuse erfolgte vor dem Absetzen täglich und danach wöchentlich 5 min lang in ihren Käfigen jeweils vor (Ruhephase) und nach dem Wiegen (Aktivitätsphase). Das Verhalten wurde hinsichtlich des Auftretens von Strampeln mit den Extremitäten oder abruptem Unterbrechen der Futter- und Wasseraufnahme zum Kratzen oder Putzen beurteilt. Die Tiere wurden in zwei deutlich voneinander unterscheidbare Gruppen eingeteilt: mutante Mäuse und Wildtypiere.

4.2.1 Genetischer Hintergrund: C3H

Bereits bei mutanten Jungtieren im Alter von 9 Tagen wurde eine größere Unruhe beobachtet (**Abb. 4a-e**). Betroffene Jungtiere zuckten mindestens dreimal in 5 Minuten mit dem gesamten Körper und den Extremitäten. Mit Zunahme der lokomotorischen Aktivität im Alter von 14 Tagen zeigte sich ein gesteigertes Pflegeverhalten der mutanten Tiere. Die Häufigkeit der Kratz- und Putzaktivitäten der mutanten Mäuse war im Vergleich zu den nicht betroffenen Tieren deutlich heraufgesetzt (= ca. 500%). Die mutanten Tiere zeigten im Beobachtungszeitraum von 5 min durchschnittlich 5 bis 7 Kratz- und Putzaktivitäten, die jeweils 30-60 sec dauerten (**Abb. 5d**). Da die mutanten SMA002-Mäuse ohne ersichtlichen Grund aufschreckten und ihre eigentliche Aktivität unterbrachen, kam es bei diesen Tieren zu Störungen des Schlaf-Wach-Rhythmus sowie der Futter- und Wasseraufnahme. Des Weiteren zeigten die mutanten SMA002-Mäuse eine andere Reihenfolge im Ablauf der einzelnen Putz-/Verhaltenskomponenten. Beginnend mit dem Zucken der Rückenmuskulatur und gesteigerter Unruhe, versuchten die Tiere anschließend ihren Rücken zu beknabbern und benutzten abwechselnd die Hinterläufe zum Kratzen der Rücken- und jeweiligen Seitenpartien. Erst im Anschluss daran und nicht immer wurden die Vorderbeine zum Putzen von Schnauze und Gesicht sowie Ohren herangezogen. Makroskopische Verletzungen der Haut durch das gesteigerte Kratzen traten in der Regel nicht auf.

4.2.2 Genetischer Hintergrund: B6C3F1 und B6(B6C3) bzw. C3(B6C3)

Die Kratzsymptomatik erschien bei den mutanten Tieren aus der Auszucht (B6C3F1-Tiere) sowohl qualitativ als auch quantitativ stärker ausgeprägt als bei den Tieren mit genetischem C3H-Hintergrund. Drei der 31 B6C3F1-Hybridtiere (~10%) kratzten sich kleine blutige, oberflächige Läsionen, die in erster Linie auf dem Rücken und hinter den Ohren auftraten.



Abb. 4a



Abb. 4b



Abb. 4c

Abb. 4a-e:
 Syndrom „Verhaltensänderungen“
 im Nest von SMA002-Jungtieren
 aus einer het x het Anpaarung im
 Alter von 11 Tagen. Die mutanten
 Jungtiere (MUT) strampeln mit den
 Extremitäten und krabbeln ruhelos
 umher. Die anhaltende Unruhe
 überträgt sich auch auf die
 Wildtypnachkommen (WT), die
 dadurch in ihrem Schlaf-Wach-
 Rhythmus gestört werden.



Abb. 4d



Abb. 4e



Abb. 5a: SMA002-Wurfgeschwister aus einer het x C3H Anpaarung im Alter von 9 Tagen. Oben: Mutante (Mut), Unten: 4 Wildtypiere (WT)



Abb. 5b: Weibliche SMA002-Wurfgeschwister im Alter von 15 Tagen, aus het x C3H Anpaarung. Links: Wildtypier (WT), Rechts: Mutante (Mut)



Abb. 5c: SMA002, weibliche Wurfgeschwister im Alter von 6 Monaten, aus het x C3H Anpaarung. Links: Mutante (Mut), Rechts: Wildtypier (WT)



Abb. 5d: SMA002-Mutante 24 Tage alt, beim „Putzverhalten“.

4.3 Syndrom „reduziertes Körperwachstum“

Das Körpergewicht der SMA002-Mäuse wurde in den ersten zehn Lebenstagen täglich und dann im wöchentlichen Rhythmus gewogen. Mit einer Präzisionswaage wurden alle Körpergewichte auf 0.1g genau ermittelt.

4.3.1 Körpergewichtsentwicklung

4.3.1.1 SMA002-Tiere vom 0. bis zum 21. Lebenstag

Die Gewichtsentwicklung von heterozygot mutanten SMA002-Mäusen im Vergleich zu den nicht betroffenen Wurfgeschwistern ist anhand von Körpergewichtsmittelwerten in der **Tabelle 9** und graphisch in **Abbildung 6** dargestellt.

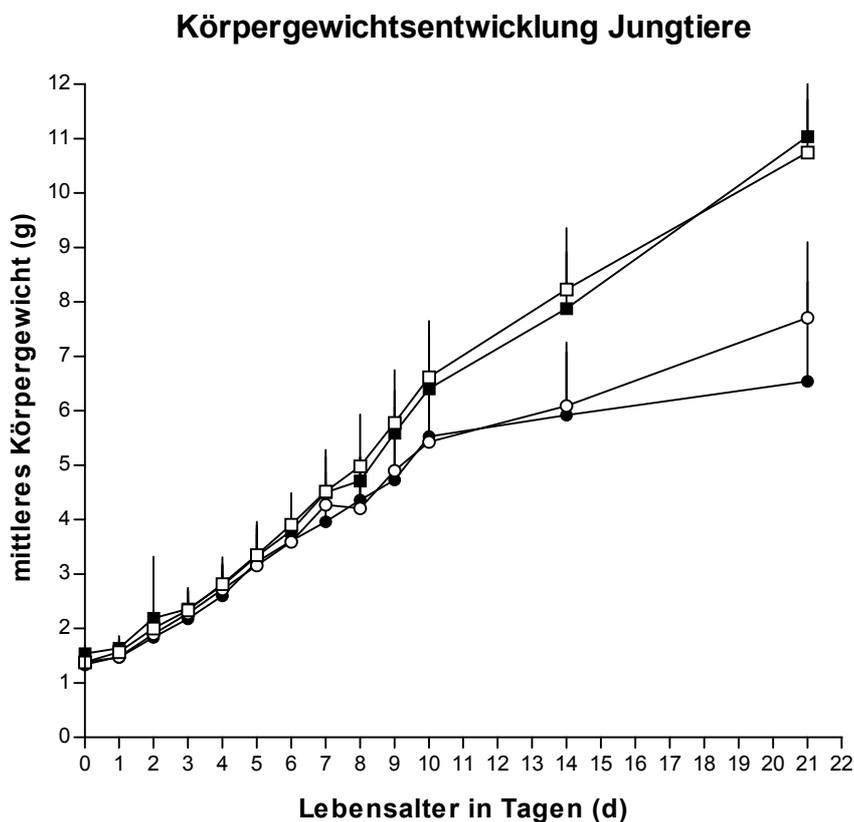


Abb. 6: Die Entwicklung des mittleren KGWs von männlichen (schwarzer Kreis) und weiblichen (weißer Kreis) mutanten Mäusen sowie deren nicht betroffenen männlichen (schwarzes Quadrat) und weiblichen (weißes Quadrat) Wurfgeschwistern vom Tag ihrer Geburt bis zum Absetzalter von 21 Tagen. Die Tiere stammen aus het x C3H-Anpaarungen der Erhaltungszucht. Senkrechte Linien: SD; n: siehe Tab. 9

Die Gewichtsentwicklung der untersuchten Gruppen ließ sich folgendermaßen charakterisieren (**Abb. 6** und **Tab. 9**):

- Die Wachstumskurven der beiden Gruppen verliefen in den ersten Lebenstagen parallel und eng nebeneinander.
- Ab dem 8. Lebenstag blieb die Gewichtszunahme der mutanten Mäuse beiderlei Geschlechts signifikant hinter der Gewichtsentwicklung der Wildtypmäuse zurück.
- Das Körpergewicht der mutanten Mäuse am 14. Lebenstag entsprach ca. 3/4 dem der nicht betroffenen Wurfgeschwister.
- In den ersten drei Lebenswochen zeigte sich keinerlei Geschlechtsdimorphismus.
- Alle Mäuse, die der Gruppe der mutanten Tiere zugeordnet wurden, besaßen ein Absetzgewicht unter 10 g.

Tabelle 9:**Körpergewichtsmittelwerte (g) und Standardabweichung der SMA002-Tiere aus der Erhaltungszucht**

Alter (d)	Geschlecht	n	Wildtypiere MW ± SD	n	Mutanten MW ± SD	Vergleich der Gruppen
0	m	17	1,5 ± 0,2	15	1,4 ± 0,1	n.s.
0	w	15	1,4 ± 0,2	13	1,3 ± 0,2	n.s.
1	m	26	1,6 ± 0,2	26	1,5 ± 0,2	n.s.
1	w	26	1,6 ± 0,2	22	1,5 ± 0,2	n.s.
2	m	30	2,2 ± 1,1	26	1,8 ± 0,3	n.s.
2	w	32	2,0 ± 0,3	34	1,9 ± 0,3	n.s.
3	m	28	2,4 ± 0,3	28	2,2 ± 0,4	n.s.
3	w	30	2,3 ± 0,4	27	2,3 ± 0,4	n.s.
4	m	29	2,8 ± 0,4	22	2,6 ± 0,4	n.s.
4	w	30	2,8 ± 0,5	31	2,7 ± 0,5	n.s.
5	m	27	3,3 ± 0,6	21	3,2 ± 0,6	n.s.
5	w	29	3,4 ± 0,6	29	3,2 ± 0,6	n.s.
6	m	23	3,8 ± 0,4	21	3,6 ± 0,6	n.s.
6	w	29	3,9 ± 0,6	20	3,6 ± 0,5	n.s.
7	m	20	4,5 ± 0,7	19	4,0 ± 0,7	n.s.
7	w	19	4,5 ± 0,8	18	4,3 ± 0,6	n.s.
8	m	17	4,7 ± 0,4	20	4,4 ± 0,8	n.s.
8	w	19	5,0 ± 1,0	17	4,2 ± 0,8	**
9	m	17	5,6 ± 0,8	16	4,7 ± 0,8	**
9	w	19	5,8 ± 1,0	17	4,9 ± 1,2	**
10	m	21	6,4 ± 1,1	23	5,5 ± 1,1	***
10	w	27	6,6 ± 1,0	22	5,4 ± 1,0	***
14	m	24	7,9 ± 1,0	23	5,9 ± 1,3	***
14	w	29	8,2 ± 1,1	18	6,1 ± 1,0	***
21	m	17	11,0 ± 1,7	17	6,5 ± 1,8	***
21	w	20	10,8 ± 1,0	11	7,7 ± 1,4	***

d: Lebensalter in Tagen; n: Anzahl; t-Test: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

n. s.= nicht signifikant

4.3.1.2 SMA002-Tiere von der 3. bis zur 26. Lebenswoche

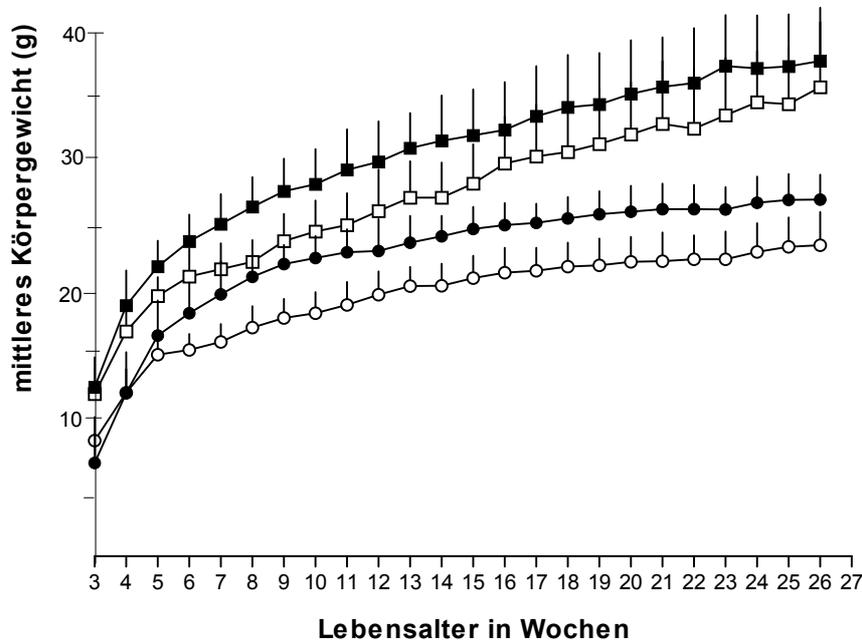
Körpergewichtsentwicklung Adult

Abb. 7: Die Entwicklung des mittleren KGWs von männlichen (schwarzer Kreis, n=30) und weiblichen (weißer Kreis, n=35) mutanten Mäusen sowie deren nicht betroffenen männlichen (schwarzes Quadrat, n=35) und weiblichen (weißes Quadrat, n=35) Wurfgeschwistern nach dem Absetzen (dritte Lebenswoche). Die Tiere stammen aus het x C3H-Anpaarungen der Erhaltungszucht. Senkrechte Linien: SD

Die Gewichtsentwicklung der abgesetzten Mäuse zeigte folgende Charakteristika (**Abb. 7**):

- Die Wachstumskurven der beiden Gruppen zeigten einen deutlichen Geschlechtsdimorphismus. Die männlichen Tiere der beiden Gruppen waren nach der 4. Lebenswoche signifikant schwerer.
- Das relative mittlere Körpergewicht der mutanten Mäuse, im Verhältnis zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern, betrug zwischen der 6. und 8. Lebenswoche bei den männlichen Tieren ca. 4/5 und bei den weiblichen Tieren ca. 3/4 und nahm danach kontinuierlich ab.
- Das mittlere Körpergewicht der männlichen mutanten Mäuse lag in der 26. Lebenswoche bei ca. 27 g, das Körpergewicht der weiblichen mutanten Mäuse erreichte in der 26. Lebenswoche im Mittel ca. 23 g und entsprach damit ca. 2/3 des mittleren Körpergewichts der Wildtypkontrollen.

4.3.2 Körpermaße und Organgewichte

Körpermaße und Organgewichte wurden anhand von 12 mutanten Mäusen im Vergleich zu 12 Kontrollen aus der Auszucht (B6C3F1-Hybridtiere) ermittelt. Je 6 Tiere pro Gruppe und Geschlecht wurden zur Untersuchung herangezogen.

Die Überprüfung der Einzelwerte zeigte, dass ein weibliches WildtypTier mit einem Körpergewicht von 36,9 g und einem absoluten Körperfettgewicht von 4,27 g bzw. relativem Körperfettgewicht von 11,57% extrem von den Werten der anderen Kontrolltiere abwich. Da bei diesem Tier weitere durch die ENU-Mutagenese hervorgerufene Änderungen unabhängig von dem SMA002-Phänotyp nicht auszuschließen waren, wurden dieses Tier (wt2) und ein mutantes weibliches Hybridtier (m6) aus der weiteren Analyse der Körpermaße und Organgewichte ausgeschlossen und nur die Werte von je fünf weiblichen mutanten Mäusen und WildtypTieren berücksichtigt (**Abb. 8** und **9**).

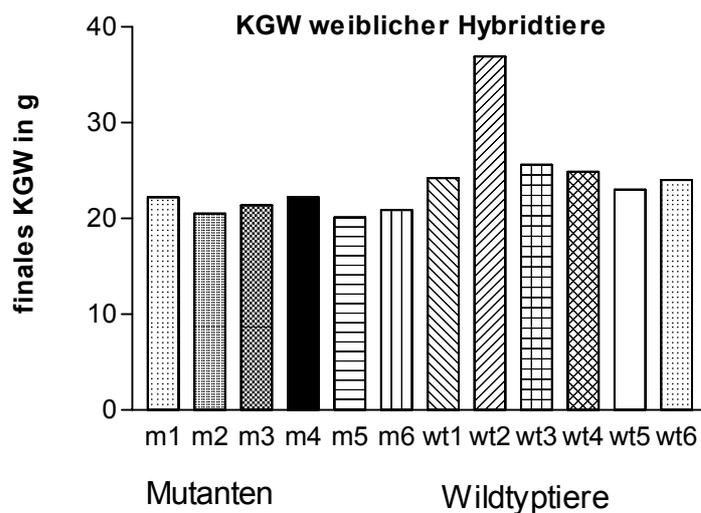


Abb. 8: Finale Körpergewichte von weiblichen mutanten Mäusen (m1-m6) und weiblichen Wildtyp-Wurfgeschwistern (wt1-wt6) aus der Auszucht (B6C3F1).

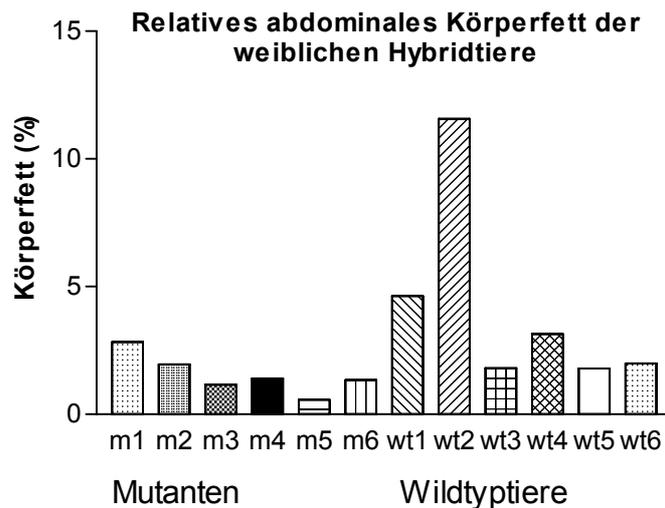


Abb. 9: Relatives Körperfett von weiblichen mutanten Mäusen (m1-m6) und weiblichen Wildtyp-Wurfgeschwistern (wt1-wt6) aus der Auszucht (B6C3F1).

4.3.2.1 Absolute Körpermaße

Die in der Varianzanalyse ermittelten Effekte von Gruppe, Geschlecht sowie der Interaktion zwischen Gruppe und Geschlecht auf Körpermaße der SMA002-Hybridtiere sind in der **Tabelle 10** zusammengefasst.

Während alle Körpermaße (Nasenrumpflänge (NRL), KGW, intraabdominales Körperfett (Körperfett), Karkassengewicht) signifikant von der Gruppe und mit Ausnahme des Körperfettes auch signifikant vom Geschlecht beeinflusst waren, hatte der Interaktionseffekt keinen signifikanten Einfluss.

<u>Tabelle 10:</u>			
Varianzanalyse der Körpermaße der SMA002-Hybridtiere			
Organ	Gruppe	Geschlecht	Gruppe x Geschlecht
Körpergewicht	***	***	n. s.
Nasenrumpflänge	***	***	n. s.
Körperfett	**	n. s.	n. s.
Karkasse	***	***	n. s.

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; n. s.= nicht signifikant

Die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der Körpermaße sind in **Tabelle 11** und **Abbildung 10** zusammengefasst. Der Vergleich der Gruppen innerhalb desselben Geschlechts ergab bei allen vier Parametern für die mutanten Mäuse niedrigere Werte als für die Wildtyptiere. Diese Unterschiede waren, mit Ausnahme des Körperfettes der weiblichen Tiere, statistisch signifikant. In beiden Gruppen lagen die absoluten Werte der männlichen Tiere höher als bei den weiblichen. Dieser Geschlechtsunterschied war statistisch signifikant für das Körpergewicht (KGW), die Nasenrumpflänge (NRL) und das Gewicht der Karkasse beider Gruppen.

<u>Tabelle 11:</u>				
Mittelwert und Standardabweichung der absoluten Körpermaße von SMA002-Hybridtieren				
Körpermaß	Geschlecht	WT (n = 11) MW ± SD	MUT (n = 11) MW ± SD	Vergleich der Gruppen
Körpergewicht (g)	m	34,8 ± 4,3 ^c	27,5 ± 0,7 ^c	**
	w	24,3 ± 0,98	21,3 ± 0,96	***
Nasenrumpflänge (cm)	m	10,5 ± 0,3 ^b	9,9 ± 0,1 ^b	**
	w	9,9 ± 0,2	9,5 ± 0,3	*
Körperfett (mg)	m	1539 ± 916	440,7 ± 59	*
	w	651,1 ± 299	342,3 ± 191	n.s.
Karkasse (g)	m	14,1 ± 1,5 ^c	11,3 ± 0,4 ^c	**
	w	10,0 ± 0,45	8,4 ± 0,26	***

^{a, b, c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen; t-Test: ^{a, *} p < 0,05; ^{b, **} p < 0,01; ^{c, ***} p < 0,001
n. s. = nicht signifikant; MUT: mutante Mäuse, WT: Wildtyptiere

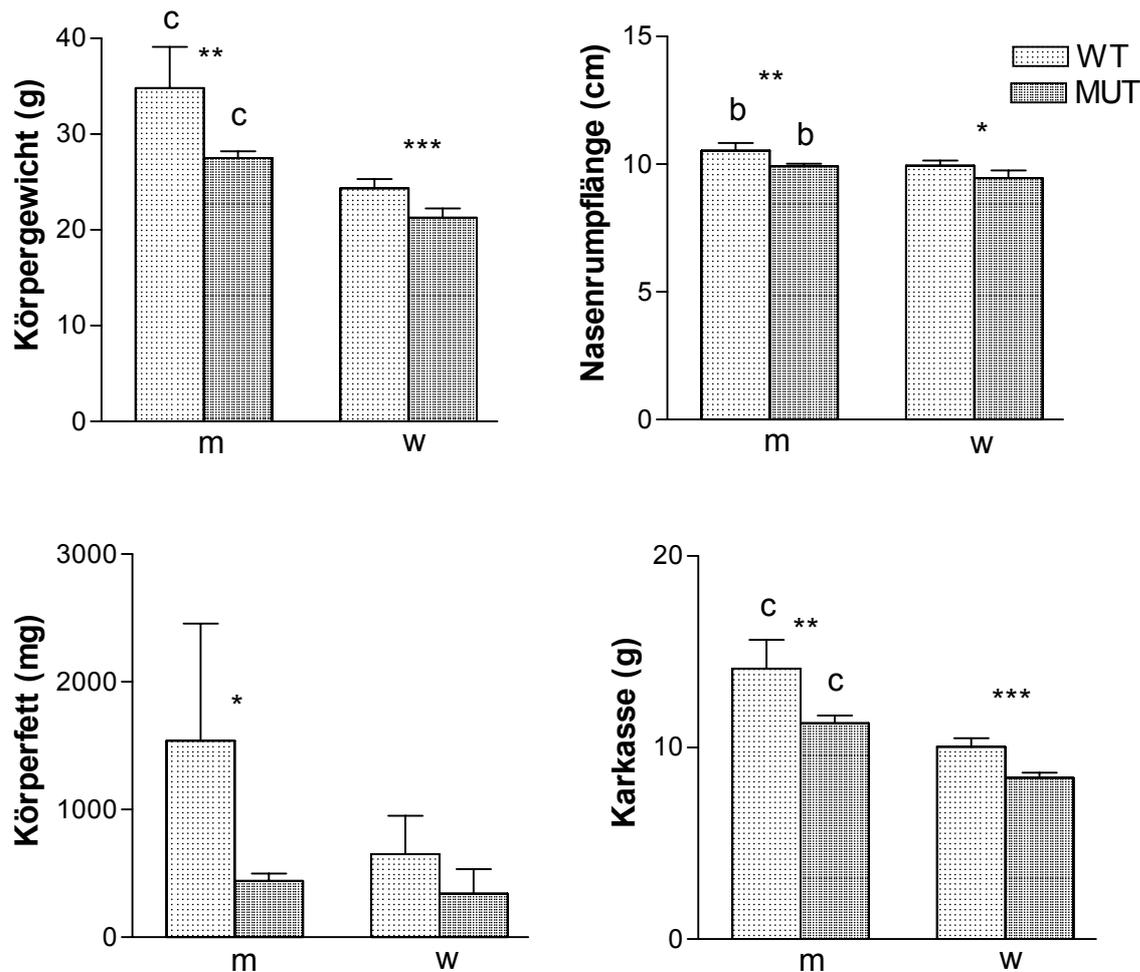


Abb. 10: Vergleich der Körpermaße von mutanten Mäusen (dunkelgrau) und Wildtyp-Wurfgeschwistern (hellgrau) aus der Auszucht (B6C3F1). m: männlich, w: weiblich; ^{a,b,c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen; * Gruppenvergleich innerhalb eines Geschlechts; t-Test: ^{a,*} $p < 0,05$; ^{b,**} $p < 0,01$; ^{c,***} $p < 0,001$

4.3.2.2 Organgewichte

Bei acht von 13 erhobenen Organgewichten hatte die Gruppe einen signifikanten Effekt. Das Geschlecht hatte, bis auf das Gewicht von Milz, Magendarmtrakt und Gehirn, ebenfalls einen signifikanten Einfluss. Ein signifikanter Einfluss des Interaktionseffektes zeigte sich lediglich beim Gewicht der Geschlechtsorgane. Das Ergebnis der Varianzanalyse im Hinblick auf die Effekte von Gruppe, Geschlecht sowie der Interaktion Gruppe und Geschlecht auf die erhobenen Organgewichte ist in der **Tabelle 12** zusammengefasst.

<u>Tabelle 12:</u>			
Varianzanalyse der Organgewichte der SMA002-Hybridtiere			
Organ	Gruppe	Geschlecht	Gruppe x Geschlecht
Haut	***	***	n. s.
Pankreas	*	***	n. s.
Milz	n. s.	n. s.	n. s.
Nieren	***	***	n. s.
Nebennieren	n. s.	***	n. s.
Magendarmtrakt	n. s.	n. s.	n. s.
Leber	***	***	n. s.
Geschlechtsorgane	n. s.	***	*
Lunge	***	***	n. s.
Herz	**	***	n. s.
Thymus	n. s.	**	n. s.
Speicheldrüsen	**	***	n. s.
Gehirn	***	n. s.	n. s.

n. s.= nicht signifikant; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

Eine Zusammenstellung der für die absoluten Organgewichte ermittelten Mittelwerte (MW) und ihrer Standardabweichungen (SD) findet sich in **Tabelle 13**.

<u>Tabelle 13:</u>				
Mittelwert und Standardabweichung der absoluten Organgewichte von SMA002-Hybridtieren				
Organgewicht (mg)	Geschlecht	WT (n = 11) MW ± SD	MUT (n = 11) MW ± SD	Vergleich der Gruppen
Haut (g)	m	6,47 ± 1,39 ^b	4,67 ± 0,28 ^c	*
	w	4,25 ± 0,25	3,75 ± 0,25	**
Pankreas	m	354,2 ± 46,4 ^b	288,4 ± 26,5	*
	w	249 ± 44,5	248,1 ± 45,7	n. s.
Milz	m	90,2 ± 20,6	80,8 ± 7,7 ^a	n. s.
	w	76,9 ± 12,8	90 ± 7,5	n.s.
Nieren	m	560,4 ± 42,2 ^c	463,6 ± 18,9 ^c	***
	w	339,6 ± 19,7	288,7 ± 16,7	**
Nebennieren	m	6,1 ± 1 ^c	6,9 ± 1 ^c	n. s.
	w	10 ± 1,6	9,6 ± 1	n. s.
Magendarmtrakt	m	2834,6 ± 337,1	2617,9 ± 365,5	n. s.
	w	2537,8 ± 285,9	2410,3 ± 223,2	n. s.
Leber	m	1722 ± 205,5 ^c	1434 ± 130,1 ^c	*
	w	1178 ± 89,3	1027 ± 44,3	**
Geschlechtsorgane	m	284,9 ± 7,5 ^c	245,2 ± 20,2 ^c	**
	w	143,1 ± 36,7	149,8 ± 23,4	n. s.
Lunge	m	158,9 ± 12,5 ^b	142,3 ± 7,3 ^b	*
	w	136,4 ± 3,3	123,8 ± 11	*
Herz	m	158,9 ± 18,2 ^b	143,8 ± 8 ^c	n. s.
	w	120,4 ± 8,3	106,2 ± 11,5	n.s.
Thymus	m	31 ± 6,7	28 ± 5,1 ^c	n. s.
	w	35,9 ± 8,8	43,3 ± 4,9	n. s.
Speicheldrüsen	m	220 ± 11,6 ^c	195 ± 9 ^c	**
	w	126,8 ± 12,4	120 ± 12,8	n. s.
Gehirn	m	510,4 ± 8,6	483,5 ± 9,8	***
	w	505,8 ± 10,5	477,1 ± 13,7	**

^{a, b, c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen; t-Test: ^{a, *} p < 0,05; ^{b, **} p < 0,01; ^{c, ***} p < 0,001
n. s.= nicht signifikant; MUT: mutante Mäuse, WT: Wildtypiere

Die absoluten Organgewichte von Haut, Nieren, Leber, Lunge und Gehirn lagen bei den mutanten SMA002-Tieren beiderlei Geschlechts signifikant niedriger als bei den Wildtypkontrollen. Bei den männlichen mutanten Mäusen waren im Vergleich zu den männlichen Wildtyptieren zusätzlich die absoluten Gewichte von Pankreas, Geschlechtsorganen und Speicheldrüsen signifikant geringer (**Tabelle 13**).

Die relativen, auf das Körpergewicht bezogenen Organgewichte sind in der **Tabelle 14** dargestellt. Beim Vergleich der Gruppen wiesen mutante Mäuse beiderlei Geschlechts signifikant höhere relative Gehirngewichte auf. Es zeigten sich signifikant höhere Werte bei den weiblichen mutanten Tieren für Milz und Thymus und bei den männlichen mutanten Tieren hinsichtlich Nebennieren, Herz und Speicheldrüsen. Im Vergleich der Geschlechter zeigten die weiblichen Tiere beider Gruppen signifikant höhere relative Organgewichte von Nebennieren, Magendarmtrakt, Lunge, Thymus und Gehirn. Die männlichen Mäuse besaßen signifikant höhere relative Nieren-, Geschlechtsorgan- und Speicheldrüsenorgangewichte als die weiblichen. Ein signifikanter Geschlechtsunterschied des relativen Milzgewichts fand sich nur bei den mutanten Mäusen, hier machten bei den weiblichen Mäusen die Organe einen größeren Anteil des KGW aus. Die signifikant unterschiedlichen relativen Organgewichte sind in den **Abbildungen 11a** und **11b** graphisch dargestellt.

<i>Tabelle 14:</i>				
Mittelwert und Standardabweichung der relativen Organgewichte (%) von SMA002-Hybridtieren				
Organ	Geschlecht	WT (n = 11) MW ± SD	MUT (n = 11) MW ± SD	Vergleich der Gruppen
Haut	m	18,41 ± 1,86	16,97 ± 0,72	n. s.
	w	17,45 ± 1,06	17,67 ± 1,03	n. s.
Pankreas	m	1,02 ± 0,09	1,05 ± 0,10	n. s.
	w	1,03 ± 0,20	1,17 ± 0,22	n. s.
Milz	m	0,26 ± 0,05	0,29 ± 0,03 ^c	n. s.
	w	0,32 ± 0,05	0,43 ± 0,02	**
Nieren	m	1,62 ± 0,11 ^a	1,69 ± 0,06 ^c	n. s.
	w	1,40 ± 0,14	1,37 ± 0,09	n. s.
Nebennieren	m	0,018 ± 0,005 ^c	0,025 ± 0,004 ^c	*
	w	0,041 ± 0,007	0,045 ± 0,006	n. s.
Magendarmtrakt	m	8,26 ± 1,64 ^a	9,53 ± 1,34 ^a	n. s.
	w	10,45 ± 1,36	11,35 ± 1,20	n. s.
Leber	m	4,96 ± 0,39	5,22 ± 0,55	n. s.
	w	4,84 ± 0,36	4,83 ± 0,26	n. s.
Geschlechtsorgane	m	0,83 ± 0,09 ^a	0,89 ± 0,07 ^a	n. s.
	w	0,59 ± 0,18	0,71 ± 0,13	n. s.
Lunge	m	0,46 ± 0,07 ^b	0,52 ± 0,02 ^a	n. s.
	w	0,56 ± 0,02	0,58 ± 0,06	n. s.
Herz	m	0,46 ± 0,02	0,52 ± 0,03	***
	w	0,49 ± 0,03	0,50 ± 0,05	n. s.
Thymus	m	0,09 ± 0,02 ^b	0,10 ± 0,02 ^c	n. s.
	w	0,15 ± 0,04	0,20 ± 0,02	*
Speicheldrüsen	m	0,64 ± 0,07 ^a	0,71 ± 0,02 ^c	*
	w	0,52 ± 0,07	0,56 ± 0,06	n. s.
Gehirn	m	1,48 ± 0,16 ^c	1,76 ± 0,04 ^c	**
	w	2,08 ± 0,1	2,24 ± 0,09	**

^{a, b, c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen; t-Test: ^{a, *} p < 0,05; ^{b, **} p < 0,01; ^{c, ***} p < 0,001
n. s.= nicht signifikant; MUT: mutante Mäuse, WT: Wildtypiere

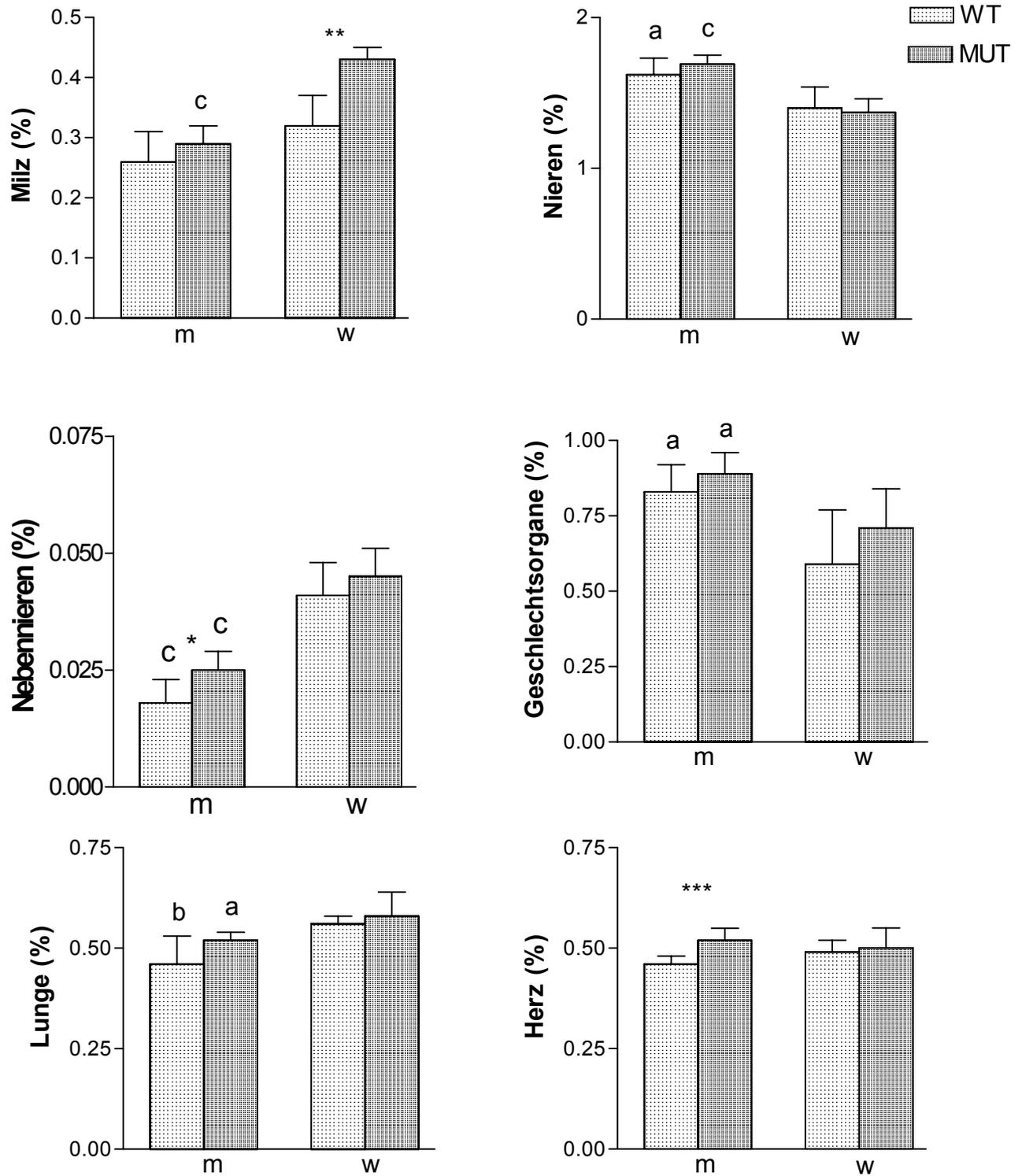


Abb. 11a: Relative Organgewichte mit signifikanten Unterschieden von mutanten Mäusen (dunkelgrau) und Wildtyp-Wurfgeschwistern (hellgrau) aus der Auszucht (B6C3F1-Hybridtiere). m: männlich, w: weiblich; ^{a,b,c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen; * Gruppenvergleich innerhalb eines Geschlechts; t-Test: ^{a,*} $p < 0,05$; ^{b,**} $p < 0,01$; ^{c,***} $p < 0,001$

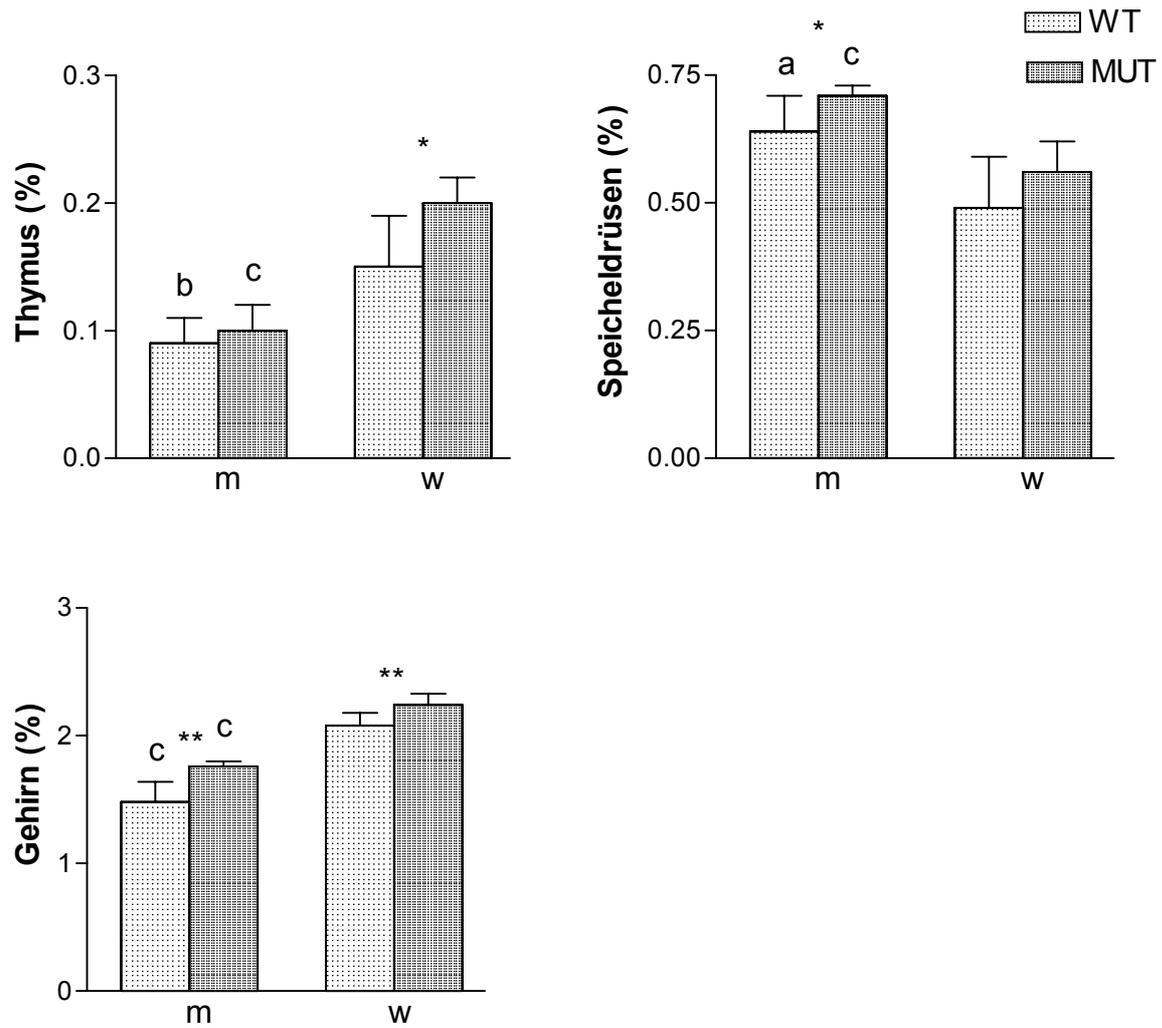


Abb. 11b: Relative Organgewichte mit signifikanten Unterschieden von mutanten Mäusen (dunkelgrau) und Wildtyp-Wurfgeschwistern (hellgrau) aus der Auszucht (B6C3F1-Hybridtiere). m: männlich, w: weiblich; ^{a,b,c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen; * Gruppenvergleich innerhalb eines Geschlechts; t-Test: ^{a,*} $p < 0,05$; ^{b,**} $p < 0,01$; ^{c,***} $p < 0,001$

4.4 Klinisch-chemische und hämatologische Parameter

Insgesamt 17 klinisch-chemische Blutplasmamparameter und das kleine Blutbild wurden von je 23 männlichen und weiblichen mutanten Mäusen sowie 22 männlichen und 25 weiblichen Wildtyptieren aus der Erhaltungszucht der Linie SMA002 im Alter von 12 Wochen erhoben. Als physiologischer Referenzbereich wurde bei allen Parametern der Bereich vom 5. bis 95. Perzentile der bei C3H-Stammzuchtieren (n=25 je Geschlecht) gemessenen Werte festgelegt.

4.4.1 Ergebnisse der Varianzanalyse

Bei den Elektrolyten zeigten Kalium, Kalzium und Phosphat eine signifikante Beeinflussung durch die Gruppe und das Geschlecht. Des Weiteren wurden die Enzymaktivitäten von Amylase und Alkalischer Phosphatase durch die Gruppe und das Geschlecht sowie die Aktivität der Aspartat-Aminotransferase durch die Gruppe signifikant beeinflusst. Mit Ausnahme der Harnsäure wurden alle Substrate durch die Gruppe signifikant beeinflusst. Auf die Parameter Cholesterin, Glukose, Gesamteiweiß und Harnstoff hatte das Geschlecht zusätzlich einen signifikanten Effekt. Bei den hämatologischen Parametern hatte die Gruppe lediglich auf den MCV einen signifikanten Einfluss. Das Geschlecht hatte auf die hämatologischen Parameter RBC, HCT, MCH, MCHC einen signifikanten Effekt. Ein signifikanter Einfluss durch den Interaktionseffekt von Gruppe und Geschlecht war bei den klinisch-chemischen und hämatologischen Parametern nur beim HST gegeben (**Tab. 15**).

4.4.2 Klinisch-chemische Parameter

Die **Tabelle 16** gibt einen Überblick über die Mittelwerte und Standardabweichungen der klinisch-chemischen Parameter. Die signifikant unterschiedlichen Parameter sind in den **Abbildungen 12 bis 14** graphisch dargestellt. Eine Auflistung der klinisch-chemischen Blutwerte von Tieren aus der C3H-Stammzucht findet sich in **Tabelle 17**.

Tabelle 15:				
Varianzanalyse der klinisch-chemischen und hämatologischen Parameter der SMA002-Mäuse				
	Parameter	Gruppe	Geschlecht	Gruppe x Geschlecht
Elektrolyte	Na (mmol/l)	n. s.	n. s.	n. s.
	K (mmol/l)	***	***	n. s.
	Ca (mmol/l)	**	**	n. s.
	Cl (mmol/l)	n. s.	n. s.	n. s.
	P (mmol/l)	*	**	n. s.
Enzyme	AMY (U/l)	**	***	n. s.
	ALT (U/l)	n. s.	n. s.	n. s.
	AST (U/l)	*	n. s.	n. s.
	CK (U/l)	n. s.	n. s.	n. s.
	AP (U/l)	**	***	n. s.
Substrate	CHO (mg/dl)	***	***	n. s.
	TGL (mg/dl)	***	n. s.	n. s.
	GLS (mg/dl)	**	*	n. s.
	TP (g/dl)	***	**	n. s.
	HSR (mg/dl)	n. s.	n. s.	n. s.
	HST (mg/dl)	***	***	**
	CREA (mg/dl)	*	n. s.	n. s.
Blutbild	WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	n. s.	n. s.	n. s.
	RBC (Mio/mm^3)	n. s.	*	n. s.
	HGB (g/dl)	n. s.	n. s.	n. s.
	HCT (%)	n. s.	*	n. s.
	PLT ($10^3/\text{mm}^3$)	n. s.	n. s.	n. s.
	MCV (μm^3)	*	n. s.	n. s.
	MCH (pg)	n. s.	**	n. s.
	MCHC (g/dl)	n. s.	*	n. s.
n. s. = nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$				

4.4.2.1 Elektrolyte

Unabhängig vom Geschlecht besaßen die mutanten Mäuse signifikant niedrigere Kaliumkonzentrationen als die Wildtypiere. Die mutanten weiblichen Mäuse wiesen einen statistisch signifikant niedrigeren Kalziumwert als die weiblichen Kontrolltiere auf. Die weiblichen Mäuse hatten niedrigere Kalium-Werte als die männlichen Mäuse. Ebenfalls signifikant niedriger waren der Kalziumwert der männlichen Wildtypiere sowie die Phosphatkonzentrationen der mutanten männlichen Mäuse im Geschlechtervergleich (Abb. 12).

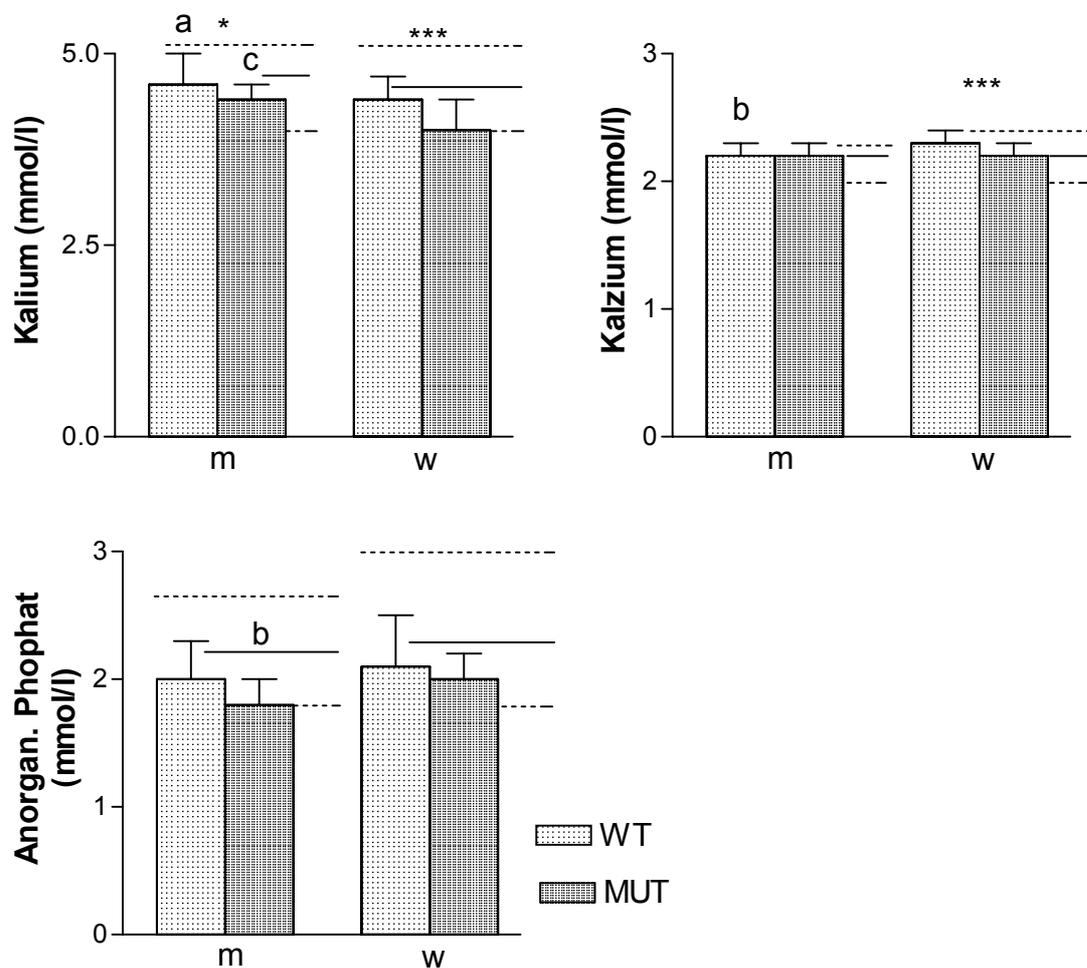


Abb. 12: Mittelwert und Standardabweichung der signifikant unterschiedlichen Elektrolytkonzentrationen von mutanten Mäusen (dunkelgrau) und Wildtyp-Wurfgeschwistern (hellgrau) aus der Erhaltungszucht (genetischer Hintergrund C3H). m: männlich, w: weiblich; ^{a,b,c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen; * Gruppenvergleich innerhalb eines Geschlechts; t-Test: ^{a,*} $p < 0,05$; ^{b,**} $p < 0,01$; ^{c,***} $p < 0,001$; zusätzlich dargestellt wurden die Mittelwerte (durchgezogene Linie) sowie die 5. und 95. Perzentile (gestrichelte Linien) von Kontrolltieren aus der C3H-Stammzucht

4.4.2.2 Enzymaktivitäten

Im Vergleich der beiden Gruppen hatten die mutanten männlichen Tiere eine signifikant niedrigere Amylase- und eine signifikant höhere Alkalische Phosphatase-Aktivität als die männlichen Wildtypmäuse. Die weiblichen mutanten Tiere wiesen im Schnitt eine signifikant höhere Alanin-Aminotransferase-Aktivität auf als die weiblichen Wildtypiere. Außerdem zeigten die männlichen Tiere beider Gruppen höhere Amylase- und niedrigere Alkalische Phosphatase-Aktivitäten als weibliche Tiere. Diese Differenzen waren ebenfalls statistisch signifikant (**Abb. 13**).

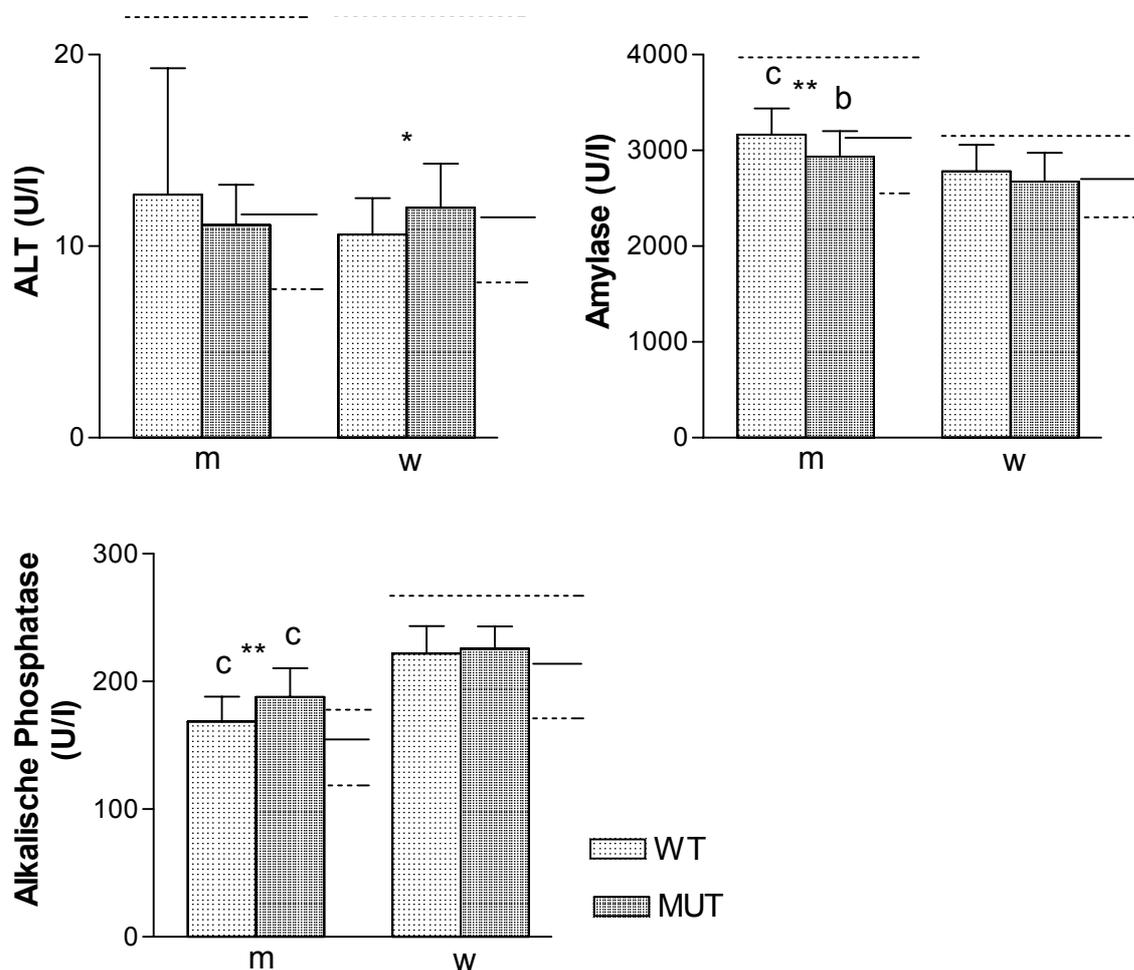


Abb. 13: Mittelwert und Standardabweichung der signifikant unterschiedlichen Enzymaktivitäten von mutanten Mäusen (dunkelgrau) und Wildtyp-Wurfgeschwistern (hellgrau) aus der Erhaltungszucht (genetischer Hintergrund C3H). m: männlich, w: weiblich; ^{a,b,c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen; * Gruppenvergleich innerhalb eines Geschlechts; t-Test: ^{a,*} $p < 0,05$; ^{b,**} $p < 0,01$; ^{c,***} $p < 0,001$; zusätzlich dargestellt wurden die Mittelwerte (durchgezogene Linie) sowie die 5. und 95. Perzentile (gestrichelte Linien) von Kontrolltieren aus der C3H-Stammzucht

4.4.2.3 Substrate

Der Gruppenvergleich zeigte bei den meisten Substraten signifikante Unterschiede, die mutanten Mäuse hatten für Cholesterin, Triglyceride und Gesamteiweiß niedrigere Werte als die Wildtypmäuse. Die Konzentrationen von Glukose, Harnstoff und Kreatinin im Blut waren nur bei den weiblichen Tieren bei mutanten Mäusen signifikant niedriger als bei den Wildtyptieren. Der Cholesterinwert besaß neben dem Gruppen- auch hoch signifikante Geschlechtsunterschiede. Die Werte der männlichen Mäuse lagen im Schnitt höher als die der weiblichen. Zwei weitere statistisch signifikante Geschlechtsunterschiede traten bei den Substraten Gesamteiweiß und Harnstoff auf. So lagen beim Gesamteiweiß die mittleren Werte der mutanten männlichen Mäuse und beim Harnstoff die der männlichen Wildtypmäuse über den durchschnittlichen Werten der jeweiligen weiblichen Gruppenmitglieder (**Abb. 14**).

4.4.2.4 Vergleich der klinisch-chemischen Werte der SMA002-Erhaltungszucht mit denen der C3H-Stammzucht

Für die Elektrolyte Na, Ca, Cl und die Enzymaktivitäten AMY, ALT, AST, CK sowie die Substrate HSR, HAST und CREA lagen die bei mutanten Mäusen und Wildtyptieren aus der SMA002-Erhaltungszucht gemessenen Werte innerhalb des definierten physiologischen Referenzbereichs (5.–95. Perzentile der Werte) der C3H-Stammzuchttiere. Dies gilt unabhängig davon, dass bei den Parametern Ca, AMY und ALT signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auftraten. Bei den Parametern K, CHO, TGL und TP lagen nur die Werte der Wildtyptiere innerhalb des C3H-Referenzbereichs, während viele mutante Mäuse Werte außerhalb dieses Bereichs aufwiesen. Die Mittelwerte der mutanten Tiere lagen für diese Parameter im unteren Bereich oder unterhalb des Streubereichs der C3H-Mäuse. Des Weiteren ist eine Gruppe von Parametern zu unterscheiden, bei denen bei einem Geschlecht (AP, bei männlichen Tieren) oder beiden Geschlechtern (P, GLS) sowohl die Wildtyptiere als auch die mutanten Tiere deutlich von den C3H-Stammzuchttieren abwichen. Bei diesen Parametern lagen die Mittelwerte für beide Gruppen an der äußeren Grenze des Referenzbereichs oder außerhalb des Referenzbereichs der C3H-Stammzucht, wobei die AP-Werte der männlichen Mäuse deutlich höher, die P- und Glukosewerte deutlich niedriger lagen als bei den C3H-Tieren. Die signifikanten Geschlechtsunterschiede, die für CHO, HST, AMY und AP in der SMA002-Erhaltungszucht gefunden wurden, spiegelten Verhältnisse wider, die auch in der C3H-Stammzucht zu beobachten waren.

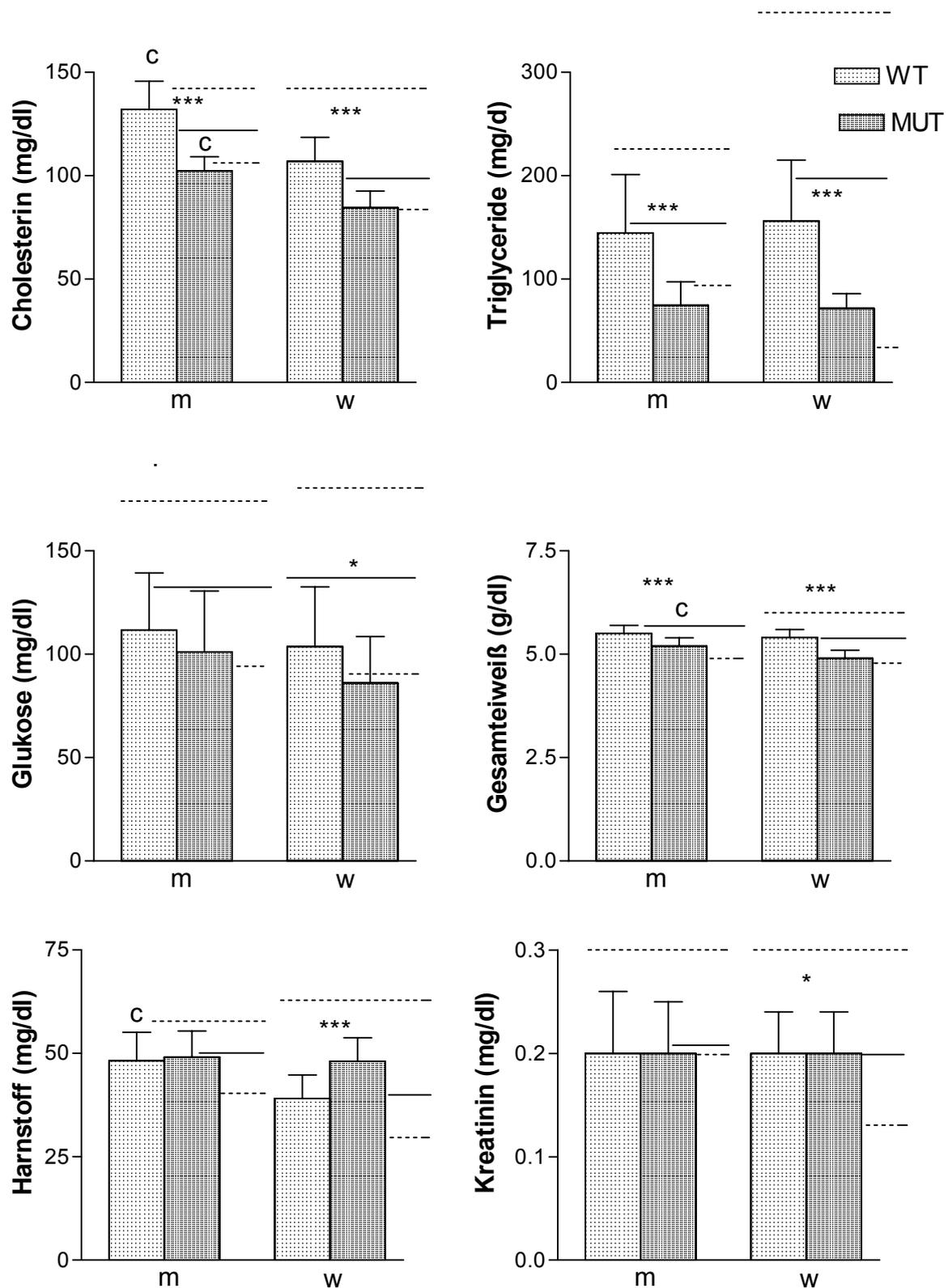


Abb. 14: Mittelwert und Standardabweichung der signifikant unterschiedlichen Substratkonzentrationen von mutanten Mäusen (dunkelgrau) und Wildtyp-Wurfgeschwistern (hellgrau) aus der Erhaltungszucht (genetischer Hintergrund C3H). m: männlich, w: weiblich; ^{a,b,c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen; * Gruppenvergleich innerhalb eines Geschlechts; t-Test: ^{a,*} $p < 0,05$; ^{b,**} $p < 0,01$; ^{c,***} $p < 0,001$; zusätzlich dargestellt wurden die Mittelwerte (durchgezogene Linie) sowie die 5. und 95. Perzentile (gestrichelte Linien) von Kontrolltieren aus der C3H-Stammzucht

<u>Tabelle 16:</u>					
Mittelwert und Standardabweichung der klinisch-chemischen Parameter der SMA002-Mäuse					
	Parameter	Geschlecht	Wildtypiere MW \pm SD	Mutanten MW \pm SD	Vergleich der Gruppen
Elektrolyte	Na (mmol/l)	m	152 \pm 7	150 \pm 6	n. s.
		w	153 \pm 7	151 \pm 8	n. s.
	K (mmol/l)	m	4,5727 \pm 0,348 ^a	4,3522 \pm 0,2372 ^c	*
		w	4,3680 \pm 0,275	3,9913 \pm 0,3965	***
	Ca (mmol/l)	m	2,1955 \pm 0,1327 ^b	2,1565 \pm 0,1237	n. s.
		w	2,3120 \pm 0,1166	2,1957 \pm 0,1107	***
	Cl (mmol/l)	m	109 \pm 7	109 \pm 8	n. s.
		w	110 \pm 8	109 \pm 10	n. s.
	P (mmol/l)	m	2,0 \pm 0,3	1,8 \pm 0,2 ^b	n. s.
		w	2,1 \pm 0,4	2,0 \pm 0,2	n. s.
Enzyme	AMY (U/l)	m	3165 \pm 272 ^c	2936 \pm 266 ^b	**
		w	2783 \pm 276	2675 \pm 298	n. s.
	ALT (U/l)	m	13 \pm 7	11 \pm 2	n. s.
		w	11 \pm 2	12 \pm 2	*
	AST (U/l)	m	27 \pm 8	31 \pm 10	n. s.
		w	29 \pm 5	32 \pm 6	n. s.
	CK (U/l)	m	57 \pm 64	72,9 \pm 97	n. s.
		w	59 \pm 34	47,2 \pm 25	n. s.
	AP (U/l)	m	169 \pm 20 ^c	188 \pm 23 ^c	**
		w	222 \pm 22	226 \pm 18	n. s.
Substrate	CHO (mg/dl)	m	132 \pm 14 ^c	102 \pm 7 ^c	***
		w	107 \pm 12	85 \pm 8	***
	TGL (mg/dl)	m	145 \pm 57	75 \pm 23	***
		w	156 \pm 59	72 \pm 14	***
	GLS (mg/dl)	m	112 \pm 28	101 \pm 30	n. s.
		w	104 \pm 29	86 \pm 23	*
	TP (g/dl)	m	5,5 \pm 0,2	5,2 \pm 0,2 ^c	***
		w	5,4 \pm 0,2	4,9 \pm 0,2	***
	HSR (mg/dl)	m	2,4 \pm 1,6	2,8 \pm 1,7	n. s.
		w	1,8 \pm 1,4	2,3 \pm 1,5	n. s.
	HST (mg/dl)	m	48 \pm 7 ^c	49 \pm 6	n. s.
		w	39 \pm 6	48 \pm 6	***
	CREA (mg/dl)	m	0,2273 \pm 0,055	0,2130 \pm 0,0458	n. s.
		w	0,220 \pm 0,0408	0,1957 \pm 0,0367	*

^{a, b, c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen; t-Test: ^{a, *} p < 0,05; ^{b, **} p < 0,01; ^{c, ***} p < 0,001
n. s.= nicht signifikant

Tabelle 17:

**Mittelwert und Standardabweichung sowie 5. und 95. Perzentile
der klinisch-chemischen Parameter von Kontrolltieren aus der C3H-Stammzucht**

	Parameter	Geschlecht	C3H MW \pm SD	5. Perzentil	95. Perzentil
Elektrolyte	Na (mmol/l)	m	152 \pm 8	139	162
		w	152 \pm 8	141	162
	K (mmol/l)	m	4,7 \pm 0,3	4,0	5,2
		w	4,5 \pm 0,3	4,0	5,2
	Ca (mmol/l)	m	2,2 \pm 0,1	2,0	2,3
		w	2,2 \pm 0,1	2,0	2,4
	Cl (mmol/l)	m	110 \pm 7	95	119
		w	109 \pm 7	94	119
	P (mmol/l)	m	2,2 \pm 0,3	1,8	2,8
		w	2,3 \pm 0,3	1,8	3,0
Enzyme	AMY (U/l)	m	3110 \pm 339	2619	3946
		w	2723 \pm 218	2356	3068
	ALT (U/l)	m	11 \pm 4	8	23
		w	11 \pm 4	8	23
	AST (U/l)	m	27 \pm 6	19	40
		w	30 \pm 8	21	54
	CK (U/l)	m	61 \pm 48	21	200
		w	69 \pm 69	28	308
	AP (U/l)	m	154 \pm 16	123	181
		w	220 \pm 26	175	273
Substrate	CHO (mg/dl)	m	125 \pm 10	106	143
		w	109 \pm 16	84	143
	TGL (mg/dl)	m	152 \pm 37	91	224
		w	193 \pm 114	33	437
	GLS (mg/dl)	m	130 \pm 18	95	166
		w	134 \pm 25	90	182
	TP (g/dl)	m	5,7 \pm 0,2	4,9	5,7
		w	5,4 \pm 0,3	4,86	5,8
	HSR (mg/dl)	m	1,5 \pm 1,2	0,4	4,1
		w	1,4 \pm 1,1	0,26	3,2
	HST (mg/dl)	m	50 \pm 6	41	61
		w	41 \pm 9	30	67
	CREA (mg/dl)	m	0,2 \pm 0,05	0,2	0,3
		w	0,2 \pm 0,04	0,13	0,3

4.4.3 Hämatologische Parameter

Bei der Analyse des Blutbildes von 46 mutanten Mäusen und 47 Wildtyptieren aus der SMA002-Linie sowie 50 C3H-Stammzuchtieren zur Definierung der physiologischen Werte im Alter von zwölf Wochen, zeigte sich für die meisten Blutbildparameter kein signifikanter Unterschied zwischen mutanten Mäusen und Wildtyptieren.

Als einziger Gruppenunterschied wurde ein signifikant niedrigerer MCV-Wert auf Seiten der mutanten weiblichen Mäuse festgestellt. Im Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen hatten die männlichen Wildtyptiere höhere RBC- und HCT-Werte, die mutanten männlichen Mäuse einen höheren MCHC-Wert als die weiblichen Mäuse ihrer Gruppe. Beiden Gruppen gemein war ein höherer MCH-Wert der weiblichen Tiere. Die genannten Differenzen waren statistisch signifikant (**Tab.18**).

Tab. 18:				
Mittelwert und Standardabweichung der hämatologischen Parameter der SMA002-Mäuse				
Parameter	Geschlecht	Wildtypiere MW ± SD	Mutanten MW ± SD	Vergleich der Gruppen
WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	m	4,9 ± 2,7	5,1 ± 2,4	n. s.
	w	4,7 ± 2,1	5,7 ± 2,7	n. s.
RBC (Mio/ mm^3)	m	9,4 ± 0,4 ^b	9,3 ± 0,5	n. s.
	w	9,1 ± 0,5	9,1 ± 0,5	n. s.
HGB (g/dl)	m	15,0 ± 0,6	14,7 ± 0,8	n. s.
	w	14,6 ± 0,7	14,7 ± 0,8	n. s.
HCT (%)	m	45,1 ± 1,9 ^a	44,3 ± 2,7	n. s.
	w	43,8 ± 2,3	43,6 ± 2,3	n. s.
PLT ($10^3/\text{mm}^3$)	m	537 ± 98	506 ± 109	n. s.
	w	500 ± 126	503 ± 89	n. s.
MCV (μm^3)	m	47,9 ± 0,6	47,9 ± 0,8	n. s.
	w	48,2 ± 0,6	47,7 ± 0,5	**
MCH (pg)	m	15,9 ± 0,5 ^a	15,9 ± 0,3 ^a	n. s.
	w	16,1 ± 0,3	16,1 ± 0,4	n. s.
MCHC (g/dl)	m	33,1 ± 0,9	33,3 ± 0,8 ^a	n. s.
	w	33,5 ± 0,8	33,8 ± 0,7	n. s.

^{a, b, c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen; t-Test: ^a p < 0,05; ^b p < 0,01; ^c p < 0,001
n. s. = nicht signifikant

4.4.3.1 Vergleich der hämatologischen Werte der SMA002-Erhaltungszucht mit denen der C3H-Stammzuchttiere

Die Messwerte für die hämatologischen Parameter der Mauslinie SMA002 lagen sowohl für die mutanten Mäuse als auch für die Wildtypiere innerhalb des Referenzbereichs der bei C3H-Stammzuchttieren gemessenen Werte (5. und 95. Perzentile) (**Tab. 19**).

Tabelle 19:

**Mittelwert und Standardabweichung sowie 5. und 95. Perzentile
der hämatologischen Parameter von Kontrolltieren aus der C3H-Stammzucht**

Parameter	Geschlecht	C3H MW \pm SD	5. Perzentil	95. Perzentil
WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	m	4,0 \pm 1,2	2,2	6,3
	w	4,6 \pm 1,9	2,4	9,4
RBC (Mio/ mm^3)	m	9,2 \pm 0,4	8,6	10,0
	w	9,1 \pm 0,4	8,4	9,9
HGB (g/dl)	m	14,5 \pm 0,6	13,5	15,5
	w	14,6 \pm 0,6	13,4	15,7
HCT (%)	m	44,0 \pm 2,0	41,1	48,0
	w	43,7 \pm 2,1	40,2	47,7
PLT ($10^3/\text{mm}^3$)	m	603 \pm 66	507	735
	w	531 \pm 79	362	644
MCV (μm^3)	m	47,8 \pm 0,6	47,0	49,0
	w	48,0 \pm 0,4	47,3	49,0
MCH (pg)	m	15,8 \pm 0,3	15,4	16,4
	w	16,0 \pm 0,4	15,3	16,7
MCHC (g/dl)	m	33,1 \pm 0,7	32,0	34,4
	w	33,4 \pm 0,8	31,9	34,7

4.5 IGF-I, IGF-II und IGFBP-2 Werte

Die Untersuchung der Konzentration der insulinähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-I und IGF-II sowie des IGF-Bindungsproteins 2 (IGFBP-2) im Serum mittels RIA von 9 mutanten Mäusen, 7 Wildtyptieren der SMA002-Linie und 19 C3H-Stammzuchtmäusen (C3H) zeigte, dass sich die mutanten Tiere hinsichtlich der IGF-I- und IGFBP-2-Konzentration deutlich von den Wildtyp- und Stammzuchtieren unterschieden. In der Varianzanalyse unterlag der Parameter IGF-I einer signifikanten Beeinflussung durch die Gruppe ($p < 0,002$) und das Geschlecht ($p < 0,001$). Die mutanten Tiere besaßen niedrigere IGF-I- und höhere IGFBP-2-Konzentrationen. Die IGF-II Werte von mutanten Mäusen, Wildtyptieren und C3H-Stammzuchtieren wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Die mutanten männlichen Mäuse lagen mit einer durchschnittlichen Serumkonzentration von 323 ng/ml IGF-I signifikant unter denen von Wildtyp- und C3H-Stammzuchtieren, deren mittlerer IGF-I-Werte über 400 ng/ml lag und die sich untereinander nicht signifikant unterschieden (C3H ♂ = 405 ng/ml, WT ♂ = 434 ng/ml). Die IGF-I-Konzentration der mutanten weiblichen Tiere war ebenfalls niedriger als die der Wildtyp- und C3H-Stammzuchtieren (MUT ♀ = 208 ng/ml, C3H ♀ = 399 ng/ml, WT ♀ = 298 ng/ml). Für eine statistische Analyse war die bisher analysierte Tierzahl zu gering. Die IGFBP-2-Konzentrationen der mutanten männlichen Mäuse lagen mit 685 ng/ml im Mittel signifikant über den Werten der Wildtyp- (551 ng/ml) und C3H-Stammzuchtieren (527 ng/ml), deren Werte sich nicht signifikant voneinander unterschieden. Bei den weiblichen Tieren wurden vergleichbare Ergebnistendenzen gesehen. Beim Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen zeigte sich, dass mutante männliche Tiere signifikant höhere IGF-I-Konzentrationen als die weiblichen Tiere besaßen. Eine Erhebung der Geschlechtsunterschiede bei den Wildtyptieren war wegen der geringen Anzahl der weiblichen Tiere nicht möglich. Bei den C3H-Stammzuchtieren zeigten die männlichen Tiere signifikant höhere IGFBP-2-Konzentrationen als die weiblichen (Tab. 20 und Abb. 15).

Tabelle 20:

**Mittelwert und Standardabweichung der Parameter des IGF-Systems
von Tieren aus der SMA002-Erhaltungszucht**

Parameter (ng/ml)	Geschlecht	Anzahl	Wildtypiere MW ± SD	Anzahl	Mutante Tiere MW ± SD	Vergleich der Gruppen
IGF-I	m	6	434 ± 48	6	323 ± 27 ^b	***
	w	1	298	3	208 ± 50	n.d.
IGF-II	m	6	27 ± 3	6	28 ± 4	n.s.
	w	1	21	3	25 ± 3	n.d.
IGFBP-2	m	6	551 ± 105	6	685 ± 101	*
	w	1	514	3	624 ± 100	n.d.

^{a, b, c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen; t-Test: n. d.= nicht durchgeführt, n. s.= nicht signifikant; ^{a, *} $p < 0,05$; ^{b, **} $p < 0,01$; ^{c, ***} $p < 0,001$

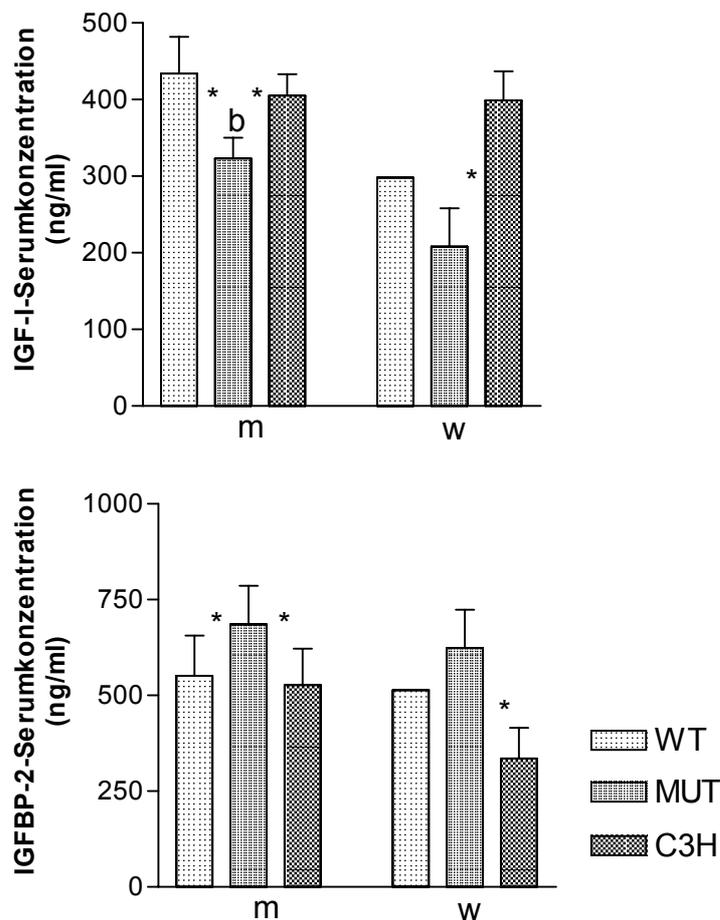


Abb. 15: Mittelwert und Standardabweichung der Serumkonzentrationen von IGF-I und IGFBP-2 von 9 mutanten Mäusen (3 w, 6 m), 7 Wildtypieren (1 w, 6 m) und 19 C3H-Stammzuchtieren (5 w, 14 m) m: männlich, w: weiblich; ^{a, b, c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen; * Gruppenvergleich innerhalb eines Geschlechts; t-Test: ^{a, *} $p < 0,05$; ^{b, **} $p < 0,01$; ^{c, ***} $p < 0,001$

4.6 Kartierung der Mutation

Zur Kartierung der ursächlichen Mutation wurden aufgrund der beobachteten vollständigen phänotypischen Penetranz der Mutation Tiere beider Gruppen verwendet. Zunächst wurden zwei DNA-Pools von je 20 mutanten und Wildtyp-Rückkreuzungstieren genomweit mit 57 polymorphen Mikrosatellitenmarkern in der PCR analysiert. Für die beiden Mikrosatellitenmarker D13Mit20 (35 cM) und D13Mit253 (37 cM) wurde im DNA-Pool der mutanten Tiere ein überdurchschnittliches Auftreten von PCR-Amplifikaten des C3H-Allels festgestellt, während im DNA-Pool der Wildtypiere überdurchschnittlich viele Amplifikate des C57BL/6-Allels auftraten. Da die Ergebnisse der übrigen Mikrosatellitenmarker keine weiteren Auffälligkeiten zeigten, wurde die Mutation auf Chromosom 13 lokalisiert und mit der Feinkartierung der Mutation auf diesem Chromosom fortgefahren. Die Einzelanalyse von 135 N2-Mäusen (115 mutante Tiere und 20 Wildtypiere) mit 17 polymorphen Mikrosatellitenmarkern für Chromosom 13 ermöglichte es, die Position der gesuchten Mutation weiter einzuengen. **Abbildung 16** zeigt exemplarisch die Analyse mit dem Mikrosatellitenmarker D13Mit20 (35 cM) bei 18 mutanten Tieren.

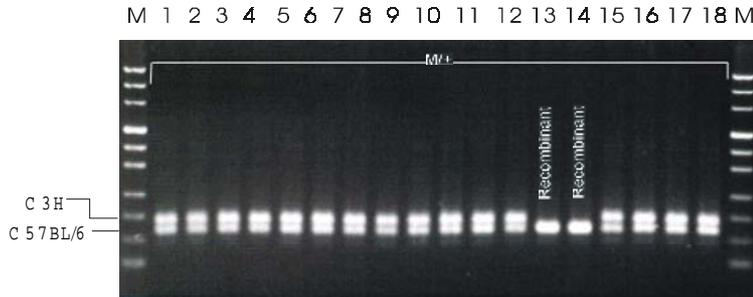


Abb. 16: Feinkartierung der Mutation durch gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte von 16 mutanten SMA002-Mäusen (1-12, 15-18), die heterozygot für den Mikrosatellitenmarker D13Mit20 waren, sodass je eine Bande für das C3H- und das C57BL/6-Allel erkennbar ist. Bei zwei weiteren mutanten Mäusen (13, 14) ist nur eine Bande von Amplifikaten des C57BL/6-Allels erkennbar, d.h. es hatte ein Crossing over zwischen der Lage der Mutation und dem untersuchten Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 13 stattgefunden. M: Marker (Längenstandard, pUC Marker Mix 8, MBI, St. Leon-Rot)

Die Analyse der 17 Mikrosatellitenmarker für Chromosom 13 wies die Lokalisation der gesuchten Mutation der chromosomalen Region zwischen den Mikrosatellitenmarkern D13Mit20 (35 cM) und D13Mit253 (37 cM) zu. Die Wahrscheinlichkeit auf Kopplung erreichte hier ihr Maximum (**Tab. 21**). Die Wahrscheinlichkeit, dass die Mutation der Mausmutante SMA002 nicht zwischen den Mikrosatellitenmarkern D13Mit20 und

D13Mit253 lokalisiert ist, ist aufgrund der hohen χ^2 -Werte kleiner als 1%. Das Haplotypenschema (Abb. 17) und die statistische Auswertung (Tab. 21) wiesen übereinstimmend auf die chromosomale Region zwischen den Mikrosatellitenmarkern D13Mit20 und D13Mit253 als Ort der gesuchten Mutation hin.

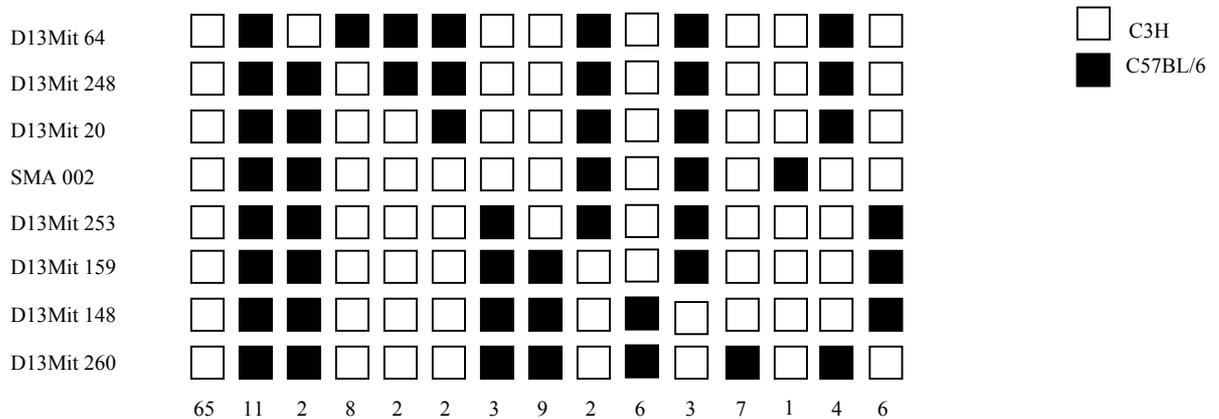


Abb. 17: Haplotypen von 112 mutanten Mäusen (Locus SMA002 weiß) und 19 Wildtypmäusen (Locus SMA002 schwarz) aus der Rückkreuzung der SMA002. Links: Bezeichnung der Mikrosatellitenmarker. Unten: Anzahl der N2-Tiere eines Haplotyps. Weiße Quadrate: C3H-Genotyp, schwarze Quadrate: C57BL/6-Genotyp

Feinkartierung der SMA002-Mutation auf Chromosom 13						
Mikrosatelliten- marker	cM Jackson Laboratory	cM Kartierung SMA002	Anzahl der untersuchten N2-Tiere	χ^2	Wildtypiere (+/+)	Mutanten (+/-)
D13Mit303	7		47	10.1		x
D13Mit14	10	15.6	47	8.3		x
D13Mit117	19	22.6	45	10.0		x
D13Mit64	30	27.0	135	34.9	x	x
D13Mit248	34	35.1	135	60.0	x	x
D13Mit20	35	37.4	133	62.8	x	x
SMA002						
D13Mit253	37	53.0	135	62.0	x	x
D13Mit159	47	63.4	134	27.1	x	x
D13Mit148	59	71.7	135	16.7	x	x
D13Mit260	65	87.3	135	12.3	x	x
D13Mit35	75	98.4	134	1.4	x	x

χ^2 : Statistische Auswertung der Wahrscheinlichkeit auf Kopplung der Mikrosatellitenmarker mit der Mutation.
Spalten 6, 7: Bei der Feinkartierung eingesetzte Genotypen: Wildtypier versus heterozygoter Mutant

Mit dem Programm Map Manager Classic (Manly KF, <http://www.roswellpark.org>) wurde die Anzahl der Rekombinationen zwischen den benachbarten Mikrosatellitenmarkern gewichtet. Diese Analyse wies die Mutation dem chromosomalen Bereich in der Mitte zwischen D13Mit20 (37,4 cM) und D13Mit253 (53,0 cM) bei ca. 45 cM zu (**Abb. 18**).

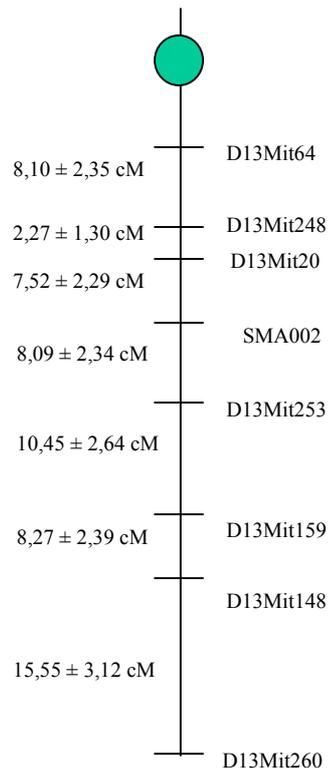


Abb. 18: Molekulargenetische Kopplungskarte von Chromosom 13 auf Basis der in der Feinkartierung ermittelten genetischen Abstände.

Der Sequenzbereich zwischen den Mikrosatellitenmarker D13Mit20 und D13Mit253 umfasst in der Ensembl Datenbank (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/, Stand: August 2003) einen Bereich von 7,6 Megabasenpaaren (Mb) mit 56 bekannten und 24 neuen postulierten Genen.

5 Diskussion

Zur phänotypischen und genotypischen Charakterisierung der durch ENU-induzierte Mutagenese erstellten Mauslinie SMA002 wurden Tiere aus der SMA002-Erhaltungszucht auf klinische und klinisch-chemische sowie hämatologische und hormonelle Abweichungen von den physiologischen Werten hin untersucht. Des Weiteren wurde die Lokalisation der Mutation analysiert und auf einen definierten Bereich des Chromosoms 13 eingegrenzt.

5.1 Vererbung und Zucht

Die dominant vererbte Mutation der Linie SMA002 ließ nach den Mendelschen Regeln der Vererbung bei Anpaarung eines heterozygot mutanten Tieres mit einem Wildtypier 50% Nachkommen mit einem abnormen Phänotyp erwarten. Die in dieser Untersuchung erhobenen Ergebnisse bestätigten dies. Nach Verpaarung zweier heterozygot mutanter Mäuse waren bei den Nachkommen keine zwei eindeutig trennbaren abnormen Phänotypen für das Auftreten von homozygot mutanten und heterozygot mutanten Tieren zu eruieren. Das erhobene Verhältnis von 68% Wildtypieren und 32% mutanten Nachkommen lässt darauf schließen, dass zum Zeitpunkt der phänotypischen Gruppierung der Tiere keine überlebenden homozygot mutanten Nachkommen vorhanden waren und alle als mutant eingestuft Tiere heterozygot waren. Die hohe Zahl an Nachkommen, die tot geboren wurden oder vor dem Erreichen des Absetzalters verstarben, stützt diese Annahme.

Somit bestätigte das Zahlenverhältnis der Nachkommen aus der Verpaarung heterozygot mutanter Tiere mit Wildtypieren die monogenetisch dominante Vererbung der Mutation. Die Abklärung des durch die Ergebnisse der Verpaarung zweier heterozygot mutanter Mäuse aufgeworfenen Verdachtes, dass homozygot mutante Nachkommen verringert oder nicht lebensfähig sind, bedarf weiterer Untersuchungen. Beide Verpaarungsansätze zeigten darüber hinaus eine erhöhte Sterblichkeit der heterozygot mutanten Mäuse auf. Des Weiteren ließen die Aufzuchtdate aus den Anpaarungen mit mutanten Tieren den Rückschluss zu, dass mutante Elterntiere eine geringere Aufzuchtleistung erbrachten. Das Brutpflegeverhalten schien durch das geänderte Verhalten der mutanten Mäuse negativ beeinflusst zu sein. Von einem gestörten Brutpflegeverhalten sowie der erschwerten Zucht von transgenen Mäusen mit einem Tourette-Syndrom und Zwangshandlungen ähnlichem Verhalten, insbesondere bei der Verwendung weiblicher Zuchttiere, berichteten auch Nordstrom und Burton (2002).

5.2 Syndrom „Verhaltensänderungen“

5.2.1 Einfluss des genetischen Hintergrundes

Die Verhaltensanomalie der Mäuse der Linie SMA002 äußerte sich in einer auffälligen Ruhelosigkeit sowie verstärktem Kratzen und Putzverhalten. Äußere Verletzungen der Haut durch das Kratzen traten in der Regel nicht auf. Irritationen durch das Kratzen waren nur bei einigen mutanten Mäusen aus den Auszuchtanpaarungen festzustellen. Die Kratzsymptomatik war bei diesen mutanten B6C3F1-Hybridtieren stärker ausgeprägt. Einige der B6C3F1-Hybridmäuse kratzten sich kleine blutige, oberflächige Läsionen, die in erster Linie auf dem Rücken und hinter den Ohren auftraten. Die Kratzintensität bei den N2-Hybridtieren wurde nicht erhoben. Studien von Linder (2001) und Threadgill et al. (1995) an Knockout-Mäusen zeigten beispielhaft, dass die Ausprägung einer Mutation in verschiedenen Inzuchtstämmen stark variieren kann. Viele Beobachtungen weisen darauf hin, dass der C57BL/6-Hintergrund Allele von Modifier-Genen enthalten könnte, die den SMA002-Phänotyp verstärken. So zeigt der Mausinzuchtstamm C57BL/6 verstärkt ein Verhalten, das als „Barbering“ oder „Dalila Effekt“ bekannt ist (Sarna et al., 2000). Die Mäuse beknabbern vermehrt ihre Käfiggenossen und/oder zupfen ihnen das Fell aus. Des Weiteren besteht eine Neigung des C57BL/6-Mausstammes zur ulzerativen Dermatitis, die im Zusammenhang mit Zwangsverhalten (obsessive compulsive disorder, OCD) sowie genetischen Faktoren gesehen wird (Brayton et al., 2001). Der Stamm C57BL/6 findet in der pharmazeutischen Forschung auch in Untersuchungen zur Dopaminaktivität Verwendung, da er sich gegenüber anderen Inzuchtstämmen durch eine höhere Aktivität auszeichnet (Cabib et al., 2002). Hingegen besteht im C3H-Stamm eine geringere Aktivität (Rogers et al., 1999). Bei der Erforschung zentralnervöser Funktionen zeigten C57BL/6-Mäuse als Stressantwort einen dem Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Syndrom ähnlichen Phänotyp mit impulsiv-hyperaktivem Verhalten (Cabib et al., 2002).

5.2.2 Ausschluss von allergischen Reaktionen

Da Kratzen im Zusammenhang mit Irritationen der Haut auftritt (Spruijt, 1992), wurden zunächst Infektionen der Haut als Ursache für diese Verhaltensauffälligkeit durch makroskopische und histologische Untersuchungen ausgeschlossen. Da die Haut neben den Atemwegen das am häufigsten von allergischen Reaktionen betroffene Organ ist, wurde anschließend untersucht, ob die veränderte Verhaltensweise der mutanten Mäuse ihre Ursache in einer allergischen Reaktion hat. Die bekannteste Ausprägung der atopischen

Krankheitsformen auf der Haut ist die Neurodermitis oder atopische Dermatitis (AD). Es wird angenommen, dass für das Erscheinungsbild aktivierte Zellen des Immunsystems verantwortlich sind. Etwa 80% aller Betroffenen haben erhöhte Mengen an Immunglobulin E (IgE) im Blut. Die erbliche Veranlagung spielt eine wesentliche Rolle bei der Krankheitsentstehung. Im entzündlichen Geschehen treten vermehrt Mastzellen auf, die in ihren Granula Juckreizmediatoren wie Histamin speichern und ausschütten. Bei diesen Juckreizmediatoren treten Speziesunterschiede auf, so induziert Histamin Juckreiz beim Menschen, nicht aber bei der Maus. Die Mastzellen der Maus enthalten Serotonin als Mediator (Kuraishi et al., 1995). Um eine allergische Reaktion als Ursache für den Juckreiz bzw. das auffällige Verhalten der SMA002-Mäuse auszuschließen, wurden die IgE-Konzentrationen im Plasma gemessen und die Haut auf ein vermehrtes Auftreten von Mastzellen sowie deren übermäßige Granulation hin untersucht (DeMora, 1996; Greaves & Wall, 1996).

Die mit Hilfe eines isotypisch-spezifischen Sandwich-ELISA ermittelten Immunglobulin E-Werte zeigten bei den Mäusen beider Gruppen (MUT, WT) keine abweichenden Befunde. Es wurde weder eine Erhöhung noch eine Erniedrigung des IgE-Wertes gegenüber den in der Untersuchung festgelegten Normalwerten festgestellt. Die mutante Mauslinie SMA002 zeigte auch keine Veränderung weiterer immunologisch relevanter Parameter, wie basale Immunglobulinspiegel im Plasma (IgM, Anti-DNA-Ak, IgG3, Rf, IgA) und der Leukozytenoberflächenproteine der Leukozytensubpopulationen im peripheren Blut. Daneben zeigte auch die histopathologische Untersuchung keine auf ein allergisches Geschehen hinweisenden Veränderungen auf.

In der Literatur wurden verschiedene mutante Mauslinien mit gesteigertem Juckreiz und Putzverhalten beschrieben, so die NOA-Maus, die NC/Nga-Maus, die Itchy-Maus und die Nackt-Maus. In der Linie SMA002 zeigten sich deutliche Unterschiede zu diesen Mauslinien. Die NOA-Maus dient als Tiermodell für allergisch bedingte Dermatitis und zeigt, wie auch die NC/Nga-Maus, die als Tiermodell für atopische Dermatitis dient und die Itchy-Maus (Nonagouti-lethal, a^{18H}) einen Anstieg des IgE im Plasma (Fang et al., 2002; Heinzmann & Daser, 2002). Die Nackt-Maus (nkt) hingegen zeigt einen Anstieg der Mastzellzahl (Benavides et al., 1999; Benavides et al., 2002).

Des Weiteren weisen die aufgeführten Mausmutanten eine unterschiedliche chromosomale Lokalisation der Mutation auf (NOA: Chromosom 14, NC/Nga: Chromosom 9, Itchy-Maus: Chromosom 2) (Fang et al., 2002; Heinzmann & Daser, 2002). Lediglich die Mutation der Nackt-Maus wurde ebenfalls auf Chromosom 13 lokalisiert (Benavides et al., 2002).

5.2.3 Systemische Erkrankungen als Ursache für das veränderte Verhalten

Die Untersuchung der klinisch-chemischen und hämatologischen Parameter gab keinen Hinweis auf eine mit Juckreiz verbundene systemische Erkrankung. Eine Nieren- oder Lebererkrankung sowie Cholestase oder eine hämatopoetische Erkrankung wurden als Ursache für das Kratzverhalten der SMA002-Mäuse ausgeschlossen, da die relevanten klinisch-chemischen Parameter des Nieren- und Leberprofils sowie das erhobene Blutbild keine pathologischen Befunde aufwiesen.

5.2.4 Neurologische Störungen als Ursache für das veränderte Verhalten

Die mutanten Mäuse der Linie SMA002 zeigten ein in Intensität und Ablauf abweichendes Putzverhalten. Der normale Ablauf des Putzverhaltens wurde von Whishaw et al. (1999) und Cromwell & Berridge (1996) als „Beginnend immer an der Schnauze bis zum Körperende“ beschrieben:

1. Die Vorderpfoten werden beleckt, danach wird die Nasen- und Schnauzenpartie mit den Vorderpfoten gereinigt.
2. Die rotierenden Bewegungen der Vorderpfoten werden weitläufiger und reinigen Gesicht sowie den Ohrenbereich, schließlich den gesamten Kopf.
3. Anschließend werden die Vorderläufe durch das Fell der seitlichen Körperpartien geführt.
4. Lecken der seitlichen Körperpartien und des Bauches.

Bewegungsstörungen und/oder Verhaltensänderungen beruhen bei bereits bekannten Mausmutanten oftmals auf einem neurologischen Defekt mit der Folge des Auftretens von senso-motorischen Dysfunktionen (Pfaff, 2001).

In diesem Zusammenhang sind die *Vibrator*-, die *Lurcher*-, die *Weaver*- sowie die *Grooming*-Maus in der Literatur beschrieben.

Die *Vibrator*-Maus besitzt im Jungtieralter ein ähnliches Verhalten mit reduziertem Wachstum wie die Mäuse der Linie SMA002 (Hamilton et al., 1997; Pfaff, 2001). Im Gegensatz zu den SMA002-Mäusen, beruht der abnorme Phänotyp der *Vibrator*-Maus auf einer rezessiven Mutation, die bei den homozygot mutanten Tieren überdies zu einer eingeschränkten Lebenserwartung führt.

Ein verändertes Putzverhalten zeigen auch die *Lurcher*- und *Weaver*-Mäuse. So ist die Anzahl der einzelnen Pflegeaktionen bei den *Weaver*-Mäusen erhöht, aber die Zeit, die sie insgesamt mit der Körperpflege verbringen, ist kürzer als normal. Die *Lurcher*-Maus zeigt ein um einige

Verhaltenskomponenten reduziertes Pflegeverhalten (Caston et al., 1998; Strazielle & Lalonde, 1998). Im Gegensatz zur Linie SMA002 stehen jedoch bei diesen Mausmodellen bewegungsmotorische Störungen wie Ataxien im Vordergrund (Pfaff, 2001).

Der Phänotyp der *Grooming*-Maus trat nach Ausschaltung des Gens *Hoxb8* auf. Die mutanten Mäuse zeigen ein exzessives Putzverhalten. Sie verbringen im Vergleich zu Wildtypmäusen doppelt soviel Zeit mit der Körperpflege. Pathologische Merkmale der Haut selbst sowie eine Allergie wurden bei den *Hoxb8*-Mäusen ausgeschlossen. Die Tiere zeigen ansonsten ein normales Verhalten (Futteraufnahme, Nestbau, Klettern) (Graybiel & Saka, 2002; Greer & Capecchi, 2002). Im Gegensatz zur *Grooming*-Maus zeigten die SMA002-Mäuse Unterschiede in Ablauf und Intensität der einzelnen Komponenten des Pflegeverhaltens. Eine eingehende Untersuchung von Qualität und Quantität der Verhaltensänderung in der Mauslinie SMA002 bedarf einer mehrstündigen videogestützten Beobachtung, die die Nachtstunden beinhaltet.

Zusammenfassend ist von einer neurologischen Ursache für das auffällige Verhalten der mutanten SMA002-Mäuse als weitere Arbeitshypothese auszugehen. Der Phänotyp der SMA002-Mäuse wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Somit kann diese Linie genutzt werden, um neue Erkenntnisse über die Pathophysiologie neurologischer Erkrankungen zu erhalten.

5.3 Syndrom „reduziertes Körperwachstum“

5.3.1 Einfluss des genetischen Hintergrundes

Bei der dominanten Mauslinie SMA002 unterschieden sich die mutanten Mäuse neben dem Verhalten auch im Wachstum von den nicht mutanten Wurfgeschwistern. Die mutanten Tiere erreichten maximal 2/3 des Körpergewichtes der Wildtypiere.

In der Beurteilung des Grades der festgestellten Abweichungen waren die stammspezifischen Unterschiede zu berücksichtigen. Mäuse des C57BL/6-Stammes weisen ein langsames Wachstum als C3H-Tiere auf, erreichen jedoch ein höheres Endgewicht. Im Alter von 25 Wochen lag das Körpergewicht von C57BL/6-Mäusen bei den männlichen Tieren im Schnitt 7 g, bei den weiblichen Mäusen 5 g über dem der C3H-Mäuse. Auch Hybridtiere weisen ein deutlich höheres Körpergewicht als C3H-Tiere auf. Diese stammspezifischen in der Mauszucht des Moorversuchsguts ermittelten Gewichtsunterschiede deckten sich mit den publizierten Gewichtsdaten (<http://www.criver.com>; eigene unveröffentlichte Daten).

Das Körpergewicht entsprach im Alter von 6 Monaten bei den männlichen Hybridmutanten ca. 80% und bei den weiblichen Hybridmutanten ca. 90% des Körpergewichts der Hybridwildtypkontrollen. Bei den meisten untersuchten Organen lag das Verhältnis des Organgewichtes von mutanten Tieren und Kontrolltieren in etwa derselben Größenordnung (siehe Anhang, **Tab. 23**). Nur für Nebennieren (♂ 118%, ♀ 97%), Milz (♂ 92%, ♀ 124%), Thymus (♂ 96%, ♀ 125%) und Gehirn (♂ 95%, ♀ 94,4%) zeigten mutante Tiere ein deutlich höheres Verhältnis als für das Körpergewicht (♂ 80, ♀ 90%). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass bei den mutanten Tieren ein proportionierter Minderwuchs vorliegt. Die wachstumshemmenden Faktoren wirken sich gleichermaßen auf Körpermaße und Organgewichte aus.

Für die entsprechende Organanalyse der SMA002-Erhaltungszucht auf C3H-Hintergrund liegen bisher Daten von je zwei mutanten Tieren und Wildtyptieren vor (siehe Anhang, **Tab. 24**). Bei diesen Tieren war der Unterschied zwischen mutanten Mäusen und Wildtyptieren ausgeprägter. Für eine abschließende Auswertung sind jedoch weitere Tiere der C3H-Erhaltungszucht zu untersuchen. Bezogen auf das Körpergewicht wiesen mutante Hybridmäuse beiderlei Geschlechts ein signifikant höheres relatives Gehirngewicht auf. Daneben zeigten sich signifikant höhere Werte bei den weiblichen mutanten Tieren für Milz und Thymus und bei den männlichen mutanten Tieren hinsichtlich Nebennieren, Herz und Speicheldrüsen. Ein erhöhtes relatives Gehirngewicht wurde auch bei anderen kleinwüchsigen Mauslinien festgestellt (Benson & Chada, 1994).

5.3.2 Das IGF-System

Experimente mit Mausmutanten haben gezeigt, dass das Signalsystem der IGFs (I, II), ihrer Rezeptoren und ihrer Bindungsproteine (IGFBPs) einen essentiellen Faktor in der Wachstumsregulation von Säugetieren darstellt (Efstratiadis, 1998; Lupu et al., 2001). Mutante Tiere der SMA002 zeigten eine erniedrigte IGF-I- und eine erhöhte IGFBP-2-Konzentration. Vergleichbare Befunde wurden beim Menschen und verschiedenen Mausmodellen im Zusammenhang mit hypophysärem Kleinwuchs beschrieben (Löffler et al., 1995; Höflich et al., 1999). Auch eine Mauslinie, die auf niedriges Körpergewicht selektiert wurde, zeigte entsprechende Veränderungen der IGF-I-Konzentration. Außerdem wurden erhöhte mRNA-Spiegel von IGFBP-2 im Serum dieser Tiere nachgewiesen (Höflich et al., 1998).

Bei reduzierter Futteraufnahme, Unterernährung, schweren Traumata, Leberfunktionsstörungen, chronischem Nierenversagen und Hypothyreose ist die IGF-I-Serumkonzentration

vermindert, zusätzlich ist bei Unterernährung, Leber- und Nierenerkrankungen die IGFBP-2-Konzentration erhöht (Löffler et al., 1995; Höflich et al., 1999). Aufgrund der Ergebnisse der klinisch-chemischen Untersuchungen wurden bei der Mauslinie SMA002 Leber- und Nierenerkrankungen als Ursache für die Veränderungen im IGF-System ausgeschlossen. Es ist jedoch möglich, dass eine chronische Energieunterversorgung der mutanten Tiere besteht, da zum einen die Futter- und Wasseraufnahme durch das veränderte Verhalten gestört waren. Zum anderen ist davon auszugehen, dass die mutanten Tiere aufgrund der höheren Aktivität einen erhöhten Energiebedarf haben (Dunnington et al., 1977a, 1977b, 1981).

Bisherige Ergebnisse eines laufenden Futteraufnahmeversuchs von weiblichen Tieren beider Gruppen (WT n=10, MUT n=6) zeigten, dass die mutanten Mäuse eine geringere absolute Menge Futter pro Tag aufnehmen (WT: 3,41 g; MUT: 2,77 g). Die aufgenommene Futtermenge pro Gramm Körpergewicht der Tiere liegt bei 1,01 g (WT) und 0,97 g (MUT), und pro Gramm metabolischen Körpergewichts bei 0,32 g (WT) und 0,30 g (MUT). Diese Befunde werden zur Zeit anhand einer größeren Tierzahl verifiziert. Eine weitere mögliche Ursache für die herabgesetzte IGF-I-Konzentration könnte im gestörten Schlafverhalten der mutanten Mäuse liegen, da die Tiefschlafphase einen positiven Effekt auf die Wachstumshormonproduktion hat (Löffler et al., 1995).

Mutante Mäuse der Linie SMA002 zeigten 25-30% geringere IGF-I-Serumkonzentrationen (♂ 25%, ♀ 30%) und erreichten 2/3 des Normalgewichts von Wildtyptieren. Igf-1-Knockout-Mäuse weisen im Alter von 2 Monaten ein 70% reduziertes KGW auf und zeigen eine generalisierte Unterentwicklung der Muskulatur (Muskelhypoplasie und Dystrophie). Durch diese Beobachtungen wurde die Bedeutung des IGF-I für das postnatale Wachstum und die Muskelentwicklung unterstrichen (Höflich et al., 2001; Chiao et al., 2002). Im Gegensatz zu den SMA002-Tieren ist bei den Igf-1-Knockout-Mäusen bereits die intrauterine Entwicklung gestört und das Geburtsgewicht vermindert (Liu & Le Roith, 1999). Dieses perinatale Wachstumsdefizit ist bis zum 20. Lebensstag unabhängig vom Wachstumshormon, da wachstumshormon-defiziente Mäuse bis zu diesem Zeitpunkt eine normale Körpergewichtsentwicklung zeigen (Wang et al., 1999). Die weitere Entwicklung wird durch beide Hormone beeinflusst, da Mäuse bei denen das GH- und das Igf-1-Gen ausgeschaltet wurden, nur ein Endkörpergewicht von 17% des KGW der Kontrollen erreichen (Lupu, 2001).

Neben den erniedrigten IGF-I-Werten zeigten die SMA002-Mäuse eine Erhöhung der IGFBP-2-Konzentration. Die Überexpression von IGFBP-2 bei transgenen Mäusen führt wie der IGF-I-Mangel zu einem postnatalen Wachstumsdefizit. Diese Wirkung wird einerseits auf

den inhibitorischen Effekt von IGFBP-2 auf IGF-I zurückgeführt, andererseits gibt es Hinweise, dass IGFBP-2 auch eine direkte wachstumsinhibitorische Wirkung besitzt, die unabhängig von seiner Wirkung über GH und IGF-I ist (Höflich et al., 2001).

Somit ist festzustellen, dass bei der Mauslinie SMA002 das reduzierte Körperwachstum durch eine Störung des IGF-Systems bedingt ist. Zur Abklärung der Pathogenese dieser Störung bedarf es zusätzlicher spezifischer Untersuchungen, wie z. B. der Messung von GH und IGFBP-3 sowie einer metabolischen Analyse in der Stoffwechselkammer.

5.3.3 Schilddrüsenfunktion

Schilddrüsenhormone beeinflussen fast alle Aspekte der normalen Entwicklung. Sie spielen eine Rolle bei der Myelinisierung des Nervensystems, beim Wachstum und in der Pubertät, in der Entwicklung von Zähnen und Skelett sowie in der Regulation des Stoffwechsels und der Funktion von Organen. Störungen der Schilddrüsenfunktion können zu einer permanenten irreversiblen Schädigung des Nervensystems und der Entwicklung in der frühen Kindheit führen (Bettendorf, 2002).

Im Tierexperiment wurde eine regulative Wirkung der Schilddrüsenhormone auf die zirkulierenden IGF-Konzentrationen nachgewiesen (Gluckman, 1995). Sie regulieren das Wachstum indirekt über die Stimulation von GH und damit über die Stimulation der IGF-I-Synthese (Ohlsson et al., 1998; Göthe et al., 1999). Bei Knockout-Mäusen, die defizient für alle T₃-Rezeptoren sind (TRα1^{-/-}β^{-/-}), wurde eine Reduktion der Körpergröße, eine 30%ige Körpergewichtsreduktion und eine um 21% niedrigere IGF-I-Konzentration im Blut festgestellt. Mutante Mäuse der Linie SMA002 zeigten analoge Ergebnisse bei Körpergewicht und IGF-I-Werten. Die Ursache der Wachstumsreduktion bei den Knockout-Mäusen liegt mit großer Wahrscheinlichkeit in einem GH-Defizit, da bei diesen Tieren auch die GH-Konzentration und die Anzahl GH-positiver Zellen erniedrigt ist. Im Gegensatz zu den SMA002-Mäusen weisen sie neben einem reduzierten Geburtsgewicht eine normale Lokomotorik und einen normalen zirkadianen Rhythmus auf (Göthe et al., 1999; Johansson et al., 1999).

Unter einer Hyperthyreose versteht man eine Überfunktion der Schilddrüse mit gesteigerter Produktion und Sekretion der Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T₃) und Thyroxin (T₄). In Folge dieser Erkrankung kommt es zu Veränderungen verschiedener klinisch-chemischer Messgrößen. Unter anderem wird ein Abfall von Cholesterin, Triglyceriden und Plasmaprotein festgestellt (Löffler et al., 1995), wie er auch bei den mutanten SMA002-Mäusen beobachtet wurde. Daher ist bei der weiteren Untersuchung der Linie SMA002 die Schilddrüsenfunktion zu berücksichtigen.

5.3.4 Weitere publizierte Wachstums-Mausmutanten

(Überblick: Efstratiadis, 1998; Sellier, 2000).

In der Literatur sind verschiedene Mausmodelle mit reduziertem Wachstum beschrieben. Zu diesen gehören die klassischen Mutationen little (lit), dwarf (Snell dwarf (dw) und ames dwarf (df)) sowie pygmy (pg). Bei diesen Linien handelt es sich im Gegensatz zur dominanten Mauslinie SMA002, um rezessive durch Spontanmutationen entstandene Mauslinien. Das Allel little stellt eine Punktmutation im Growth Hormon-Realising Hormon Rezeptor (Ghrhr) auf Chromosom 6 dar. Snell dwarf Mäuse weisen eine Mutation im Gen Pit-1 (pituitary-specific transcription factor 1) auf Chromosom 16 und die Ames dwarf Mäuse eine Mutation des Gens Prop-1 (Prophet von Pit-1) auf Chromosom 11 auf. Bei den Pygmy-Mäusen liegt eine Mutation des Hmgi-c-Genes (High-mobility group Protein I Isoform C) auf Chromosom 10 vor (Bartke et al., 2001). Die Mutation der Linie SMA002 wurde auf Chromosom 13 kartiert.

Daneben wird das Laron Syndrom beschrieben, welches beim Menschen einen proportionierten Minderwuchs, der sich im Kindesalter manifestiert, herbeiführt. Die Erkrankung beruht auf einer autosomal-rezessiven erblichen Mutation des GH-Rezeptors, die zu einer absoluten GH-Resistenz und niedrigen IGF-I-Werten führt. Das Laron Syndrom Knockout-Mausmodell mit Inaktivierung des GHR/BP-Gens auf Chromosom 15 (<http://www.jax.org>) wurde als Säugetiermodell hergestellt (Zhou et al., 1997; Coschigano et al., 2000).

5.4 Klinische Chemie und Hämatologie

Zur Abklärung der Pathogenese der beiden Syndrome „Verhaltensänderungen“ und „reduziertes Körperwachstum“ wurden klinisch-chemische und hämatologische Untersuchungen durchgeführt.

Zur Erfassung der Nierenfunktion wurden die Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen im Plasma gemessen. Harnstoff ist das wichtigste stickstoffhaltige Abbauprodukt des Eiweißstoffwechsels. Er wird in der Leber gebildet und durch glomeruläre Filtration mit dem Urin ausgeschieden. Ein Teil des glomerulär filtrierte Harnstoffes wird jedoch wieder rückresorbiert. Neben der Erhöhung des Harnstoffes weist ein Anstieg des Kreatinins auf eine Niereninsuffizienz bzw. eine verminderte glomeruläre Filtrationsleistung hin. Die Blutglukosebestimmung diente der Untersuchung des Kohlenhydratstoffwechsels.

Die Bestimmung von Gesamtcholesterin und Triglyceriden wurde zur Lipidstoffwechselfdiagnostik durchgeführt. Störungen des Fettstoffwechsels mit einem Anstieg der Plasmalipidkonzentrationen werden bei Leber- und Nierenerkrankungen beobachtet. Bei der Bestimmung der Enzymaktivitäten bedeutet ein Anstieg über den physiologischen Bereich immer eine erhebliche Zellschädigung. Da keines der intrazellulären Enzyme ausschließlich organspezifisch ist, sind immer mehrere Enzyme zu untersuchen (Kraft, 1999).

Die mutanten Mäuse zeigten signifikante Erniedrigungen der Cholesterin-, Triglycerid-, Gesamteiweiß- und Kaliumkonzentration. Bei den anderen klinisch-chemischen und hämatologischen Parametern traten keine abweichenden Befunde von den Normalwerten auf. In der Literatur beschriebene Untersuchungen verschiedener Mausstämme zeigten, dass der C3H-Stamm relativ hohe Cholesterinkonzentrationen besitzt (♂ 166 mg/dl, ♀ 126 mg/dl) (Yamamoto et al., 1963) und ein eher unaktiver Mausstamm ist (Rogers et al., 1999). Studien von Dunnington et al. (1977a, 1977b, 1981) an verschiedenen Mausstämmen und Hybridtieren haben außerdem gezeigt, dass der Cholesterinwert positiv mit dem Körpergewicht sowie negativ mit der Aktivität korreliert ist. Ein entsprechender Befund war auch bei der Mauslinie SMA002 festzustellen. Die aktiveren mutanten Tiere, die sich durch ihr ständiges Kratzen in steter Ruhelosigkeit befanden, wiesen einen niedrigeren Cholesterinwert und ein niedrigeres Körpergewicht als die Wildtyp-Mäuse auf.

Eine niedrige Cholesterinkonzentration in Zusammenhang mit einer Reduktion der Triglycerid- und Gesamteiweißkonzentrationen ist unter anderem bei Hyperthyreose beschrieben (Löffler et al., 1995). Zur biologischen Relevanz der erniedrigten Cholesterinwerte der mutanten Tiere lässt sich feststellen, dass Mäuse mit weit niedrigeren Cholesterinwerten lebensfähig und fertil sind (Dunnington et al., 1981; eigene unpublizierte Daten). Die Gesamteiweißkonzentration hängt in erster Linie vom Alter der Tiere und von der Proteinaufnahme mit dem Futter ab (Wiesner & Ribbeck, 1991). Geringe Gesamteiweißwerte können durch Mangelernährung bedingt sein, ebenso ursächlich können Resorptionsstörungen und Eiweißverluste bei Nierenerkrankungen sowie Synthesestörungen bei schweren Leberschäden sein (Quimby, 1999). Kommt es hierbei zu einer Hypoproteinämie sind jedoch klinische Symptome wie Ödembildung und Körperhöhlenergüsse vorhanden (Thomas, 1998). Erniedrigungen der Kaliumkonzentration treten infolge von gastrointestinalen Störungen, wie Erbrechen und Durchfall, auf. Auch eine unzureichende Kaliumzufuhr und ein erhöhter Kaliumverlust über die Nieren (z.B. bei Diabetes mellitus) können zu Hypokaliämie führen. Diese Veränderungen der Plasmakaliumwerte verursachen neuromuskuläre Störungen. Bei Hypokaliämie nimmt die neuromuskuläre Erregbarkeit ab und es kommt im Extremfall zur

schlaffen Lähmung (Hartmann, 1994). Als kritischer unterer Grenzwert des Menschen und wahrscheinlich auch bei Tieren wird ein Wert von 2,8 mmol/l angesehen. Geringere Absenkungen von 5-10% sind beim Menschen symptomlos (Riley & Cornelius, 1999). Dem zu Folge ist die Veränderung in der Linie SMA002 als unerheblich zu werten.

Aus den gewonnenen Ergebnissen wurde das Vorliegen einer Erkrankung der großen Organsysteme ausgeschlossen. Die erniedrigten Werte für die Parameter Cholesterin, Triglyceride, Gesamteiweiß und Kalium sind als Hinweis auf geringgradige Stoffwechselunterschiede zu werten. Die Lebensfähigkeit und Fertilität der Tiere wird durch diese Veränderungen nicht maßgeblich beeinflusst. Die Parameter, die im Vergleich zu C3H-Stammzuchttieren bei beiden Gruppen der Linie SMA002 gleichermaßen verändert waren, sind als linienspezifisch anzusehen.

5.5 Kartierung der Mutation

Die Lokalisation der Mutation in der Linie SMA002 wurde auf Chromosom 13, 35-37 cM kartiert. Cheverud et al. (1996) und Brockmann et al. (2000) veröffentlichten QTLs, die das Körpergewicht und Wachstum bei der Maus beeinflussen. Im Bereich der Kartierungsposition der Mutation der Mauslinie SMA002 wurden zwei QTLs identifiziert, die mit einer Veränderung des Wachstums und/oder Körpergewichts in Zusammenhang stehen.

Der Sequenzbereich zwischen den beiden Mikrosatellitenmarkern mit der höchsten Kopplung, D13Mit20 und D13Mit253, umfasst einen Bereich von 7,6 Mb mit 56 bekannten und 24 neuen postulierten Genen (www.ensembl.org, Stand Oktober 2003). Folgende Gene wurden nach ihrer chromosomalen Lage und ihrer schon beschriebenen Funktion zur weiteren Untersuchung ausgewählt: Neurod3 (neurogenic differentiation 3), Pitx1 (paired like homeodomaintranscription factor 1), Gas1 (growth arrest specific 1), Ntrk2 (neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2) und SMAD5 (Synonym MAD 5, mother against dpp). Die Kandidatengene werden auf genomischer Ebene durch Sequenzierung und/oder durch Expressionsanalyse untersucht.

Das weitere Vorgehen zur Identifizierung der Mutation umfasst die weitere Eingrenzung der chromosomalen Lage. Zur Zeit sind weitere Mikrosatellitenmarker in der Feinkartierung im Einsatz.

5.6 Ausblick

Die phänotypische und genotypische Charakterisierung der Linie SMA002 zeigte eine gesteigerte Aktivität und Verhaltensänderung bei heterozygot mutanten Tieren der Linie, die wahrscheinlich mit einer Erhöhung des Grundumsatzes einhergeht. Die Wachstumsreduktion war gekennzeichnet durch erniedrigte IGF-I- und erhöhte IGFBP-2-Werte. Daneben trat eine Erniedrigung der Stoffwechselfparameter Cholesterin, Triglyceride, Gesamteiweiß und Kalium auf.

Die Mauslinie SMA002 stellt somit ein neues, von den bereits beschriebenen Mausmutanten abgrenzbares Modell für Wachstumsdefizit und Verhaltensänderungen dar. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass der mutante Phänotyp aufgrund eines neurologischen Defekts kombiniert mit hormonell bedingten Stoffwechselstörungen zustande kommt. Diese Linie eignet sich als potentiell Modell zur Aufdeckung von neuen Funktionsweisen eines schon bekannten Gens bzw. zur Entdeckung eines noch unbeschriebenen Gens im kartierten Bereich. Sollte die Kandidatengenanalyse nicht zum Erfolg führen, wird eine umfassende Expressionsanalyse der im chromosomalen Bereich der Mutation lokalisierten Gene mittels Mikroarray-Technik durchgeführt. Zur Verwendung der Mauslinie SMA002 als Tiermodell für die beiden Komplexe „Verhalten“ und „Wachstum“ sind weitere spezifische Untersuchungen des Phänotyps erforderlich.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die dominant vererbte Mutation in der Mauslinie SMA002, welche durch chemische Mutagenese mit Ethylnitrosourea induziert wurde, phänotypisch und genotypisch charakterisiert. Die Untersuchung wurde an heterozygot mutanten Tieren, die auf dem genetischen Hintergrund von C3H gezüchtet wurden, durchgeführt. Die Mauslinie zeigte die beiden Hauptsyndrome „Verhaltensänderungen“ und „reduziertes Körperwachstum“. Der abnorme Phänotyp zeigte in den mutanten Tieren aller untersuchten Generationen eine vollständige Penetranz. Das Hauptsyndrom „Verhaltensänderungen“ wurde durch das Auftreten einer gesteigerten Unruhe und von übermäßigen Putz- und Kratzaktivitäten bestimmt. Die Putzaktivitäten waren dabei um ein 5-faches gesteigert, beinhalteten aber nicht immer den vollständigen Ablauf aller Komponenten. Eine allergisch bedingte Ursache wurde anhand der pathologischen Untersuchung der Haut und der Erhebung von immunologischen Parametern ausgeschlossen. Die klinische Untersuchung der Tiere erbrachte einen signifikanten Körpergewichtsunterschied, wobei die mutanten Mäuse 2/3 des normalen Körpergewichts von Wildtypkontrollen erreichten. Daneben zeigten die mutanten Tiere eine signifikant geringere Nasenrumpflänge und ein signifikant niedrigeres Karkassengewicht. Durch die im Blut erhobenen hämatologischen und klinisch-chemischen Parameter wurde das Vorliegen einer Organerkrankung von Nieren, Leber und Pankreas als Ursache für den abnormen Phänotyp ausgeschlossen. Dieses Ergebnis wurde durch die pathologische Untersuchung dieser Organe erhärtet. Die in den mutanten Tieren identifizierte Erniedrigung der Cholesterin-, Triglycerid-, Gesamteiweiß- und Kaliumwerte deutet auf eine gesteigerte Stoffwechsellage der Tiere und eine mögliche hormonelle Störung hin und ist durch weiterführende Untersuchungen abzuklären. In diese Untersuchung sollten auch die festgestellten Veränderungen im IGF-System einbezogen werden. Die Kartierung der Mutation mit Hilfe von polymorphen Mikrosatellitenmarkern erbrachte die höchste Kopplung der Mutation mit den Markern D13Mit20 (35 cM) und D13Mit253 (37 cM) auf Chromosom 13.

Der Phänotyp dieser Mauslinie ist in der Literatur noch nicht beschrieben. Somit stellt die Linie SMA002 ein neues Tiermodell zur Untersuchung von Verhalten und Wachstum dar. Dafür ist in weiterführenden Untersuchungen die Mutation zu identifizieren und der abnorme Phänotyp durch spezifische Untersuchungen detailliert zu evaluieren.

7 Summary

Phenotypic and genotypic characterisation of the ENU-induced mutant mouse SMA002 as an animal model for growth deficit and hyperactivity

This thesis describes the phenotypic and genotypic analysis of the dominant mutation in the ENU-induced mutant mouse line SMA002. The results were derived from the analysis of heterozygous mutant animals on the C3H genetic background. As the main phenotype of SMA002, an abnormal behavior combined with reduced body weight was revealed.

The mutant phenotype showed complete penetrance in all generations analyzed. Abnormal behavior, as the most prominent phenotype was characterized by the occurrence of restlessness and an increased grooming behavior. The grooming behavior was increased fivefold but did not always contain all aspects of the standard repertoire. Pathological examinations of the skin and the analysis of parameters of the immune system indicated that this behavior was not caused by an allergic reaction. Clinical examination of the animals revealed a significant difference in body weight between mutant and control littermates. The body weight of the mutant animals was about 30% lower than control. In addition mutant animals had a significant lower nose-rump length and a significant lower carcass weight. Analysis of the peripheral blood for hematological and clinical chemical parameters as well as subsequent pathological examinations excluded a kidney, liver or pancreas disease as the potential cause of the abnormal phenotype. Decreased values for cholesterol, triglyceride, total protein and potassium in the mutant animals referred to an increased metabolism and a hormonal deviation in these mice. Furthermore, deviations of the IGF-system were found in the mutants. Linkage analysis of the causative mutation was carried out by genome wide polymorphic microsatellite marker analysis. The highest correlation for the mutation was found with the markers D13Mit20 (35cM) and D13Mit253 (37cM) of chromosome 13.

This aberrant phenotype of the line SMA002 has not yet been reported. Thus, SMA002 represents a novel mouse model for the analysis of abnormal behavior and growth defects. Subsequent analysis will identify the exact mutation in the line. In addition, further analysis of the phenotype will result in detailed information on the metabolism and hormonal regulation of SMA002.

8 Literaturverzeichnis

- Al Murrani W.K., Roberts R.C.** (1978) Maternal effects on body weight in mice selected for large and small size. *Genet Res.* 32:295-302.
- Alemán C.L.,** Noa M., Más R., Rodeiro I., Mesa R., Menéndez R., Gámez R., Hernández C. (2000) Reference data for the principal physiological indicators in three species of laboratory animals. *Lab Anim.* 34:379-385.
- Alessandrini F.,** Jakob T., Wolf A., Wolf E., Balling R., Hrabé de Angelis M., Ring J., Behrendt H. (2001) ENU mouse mutagenesis: generation of mouse mutants with aberrant plasma IgE levels. *Int Arch Allergy Immunol.* 124:25-28.
- Allen L.H.** (1998) Zinc and micronutrient supplements for children. *Am J Clin Nutr.* 68 (2 Suppl):495S-498S.
- Ball S.G.,** Baer L., Otto M.W. (1996) Symptom subtypes of obsessive-compulsive disorder in behavioral treatment studies: a quantitative review. *Behav Res Ther.* 34, 1:47-51.
- Bartke A.,** Brown-Borg H., Mattison J., Kinney B., Hauck S., Wright C. (2001) Prolonged longevity of hypopituitary dwarf mice. *Exp Gerontol.* 36:21-28.
- Benavides F.,** Giordano M., Fiette L., Brunialti A.L.B, Palenzuela N.M, Vanzulli S., Baldi P., Schmidt R., Pasqualini C.D, Guénet JL. (1999) Nackt (nkt), a new hair loss mutation of the mouse with associated CD4 deficiency. *Immunogenetics*, 83, 49:413-419.
- Benavides F.,** Starost M., Flores M., Gimenez-Conti I.B., Guénet JL., Conti C.J. (2002) Animal model, impaired hair follicle morphogenesis and cycling with abnormal epidermal differentiation in nackt mice, a cathepsin L-deficient mutation. *Am J Pathol.* 161, 2:693-703.
- Benson K., Chada K.** (1994) Mini-mouse: phenotypic characterisation of a transgenic insertional mutant allelic to pygmy. *Genet Res.* 64:27-33.
- Bettendorf M.** (2002) Thyroid disorders in children from birth to adolescence. *European J. of Nucl Med Mol Imaging*, 29, Suppl. 2:S439-446.
- Branca F., Ferrari M.** (2002) Impact of micronutrient deficiencies on growth: stunting syndrome. *Ann Nutr Metab.* 46 (suppl): 8-17.
- Brayton C.,** Justice M., Montgomery C.A. (2001) Animal models- evaluating mutant mice: anatomic pathology. *Vet Pathol.* 38:1-19.
- Brenner S.** (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77:71-94.
- Brockmann G.A.,** Haley C.S., Renne U., Knott S.A., Schwerin M. (1998) Quantitative trait loci affecting body weight and fatness from a mouse line selected for extreme high growth. *Genetics*, 150:369-381.
- Brockmann G.A.,** Kratzsch J., Haley C.S., Renne U., Schwerin M., Karle S. (2000) Single QTL effects, epistasis, and pleiotropy account for two-thirds of the phenotypic F₂ variance of growth and obesity in DU6i x DBA/2 mice. *Genome Res.* 10:1941-1957.

- Brown S.D., Nolan P.M.** (1998) Mouse mutagenesis-systematic studies of mammalian gene function. *Hum Mol Genet.*, 7:1627-1633.
- Cabib S., Puglisi-Allegra S., Ventura R.** (2002) The contribution of comparative studies in inbred strains of mice to the understanding of the hyperactive phenotype. *Behav Brain Res.*, 130:103-109.
- Capecchi M.R.** (2001) Generating mice with targeted mutations. *Nat Med.*, 10:1086-1090.
- Caston J., Chianale C., Delhaye-Bouchaud N., Mariani J.** (1998) Role of the cerebellum in exploration behavior. *Brain Res.*, 808:232-237.
- Charles D.J., Pretsch W.** (1987) Linear dose-response relationship of erythrocyte enzyme-activity mutations in offspring of ethylnitrosourea-treated mice. *Mutat Res.*, 15, 176:81-91.
- Cheverud J.M., Routman E.J., Duarte F.A.M., van Swinderen B., Cothran K., Perel C.** (1996) Quantitative trait loci for murine growth. *Genetics*, 142:1305-1319.
- Chiao E., Fisher P., Criponi L., Deiana M., Dragatsis I., Schlessinger D., Pilia G., Efstratiadis A.** (2002) Overgrowth of a mouse model of the Simpson-Golabi-Behmel Syndrome is independent of IGF signaling. *Dev Biol.*, 243:185-206.
- Coschigano K.T., Clemmons D., Bellush L.L., Kopchick J.J.** (2000) Assessment of growth parameters and life span of GHR/BP Gene-disrupted mice. *Endocrinology*, 141, 7:2608-2613.
- Cromwell H.C., Berridge K.C.** (1996) Implementation of action sequences by a neostriatal site: a lesion mapping study of grooming syntax, *J. Neurosci.*, 16:3444-3458.
- Dämmrich K.** (1990) Wachstum und Anpassung. In: Stünzi H., Weiss E., *Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin*. 8. Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, ISBN 3-489-51116-6.
- Dämmrich K., Loppnow H.** (1990) Stoffwechselstörungen In: Stünzi H., Weiss E., *Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin*. 8. Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, ISBN 3-489-51116-6.
- Darsow U., Drzezga A., Frisch M., Munz F., Weilke F., Bartenstein P., Schwaiger M., Ring J.** (2000) Processing of histamine-induced itch in the human cerebral cortex: a correlation analysis with dermal reactions. *J Invest Dermatol.*, 71, 115:1029-1033.
- DeMora F., Garcia G., Puigdemont A., Arboix M., Ferrer L.** (1996) Skin mast cell releasability in dogs with atopic dermatitis. *Inflamm Res.*, 45:424-427.
- DiMaio S., Grizenko N., Jooper R.** (2003) Dopamine genes and attention-deficit hyperactivity disorder: a review. *J Psychiatry Neurosci.*, 28, 1:27-38.
- Dragani T.A., Zeng Z.B., Canzian F., Gariboldi M., Ghilarducci M.T., Manenti G., Pierotti M.A.** (1995) Mapping of body weight loci on mouse chromosome X. *Mamm. Genome*, 6:778-781.
- Driever W., Stemple D., Schier A., Solnica-Krezel L.** (1994) Zebrafish: genetic tools for studying vertebrate development. *Trends Genet.*, 10, 5:152-159.

- Dunnington E.A.**, White J.M., Vinson W.E. (1977a) Genetic parameters of serum cholesterol levels, activity and growth in mice. *Genetics*, 85:659-668.
- Dunnington E.A.**, White J.M., Vinson W.E. (1977b) Serum cholesterol, activity, feed intake, and body weight in lines of mice selected for growth. *Can J Genet Cytol.*, 19:415-424.
- Dunnington E.A.**, White J.M., Vinson W.E. (1981) Selection for serum cholesterol, voluntary physical activity, 56-day weight and feed intake in randombred mice. II. Correlated responses. *Can J Genet Cytol.* 23:545-555.
- Earley C.J.** (2003) Restless legs syndrome. *N Engl J Med.*, 348: 2103-2109.
- Efstratiadis A.** (1998) Genetics of mouse growth. *Int J Dev Biol.*, 42:955-976.
- Eklblom A.** (1995) Some neurophysiological aspects of itch. *Semin Dermatol.*, 14:262-270.
- Fang D.**, Elly C., Gao B., Fang N., Altman Y., Joazeiro C., Hunter T., Copeland N., Jenkins N., Liu Y.C. (2002) Dysregulation of T lymphocyte function in itchy mice: a role for itch in TH2 differentiation. *Nat Immunol.*, 3:281-287.
- Favor J.**, Sund M., Neuhauser-Klaus A., Ehling U.H. (1990) A dose-response analysis of ethylnitrosourea-induced recessive specific- locus mutations in treated spermatogonia of the mouse. *Mutat Res.*, 24, 231:47-54.
- Fernandes J.**, Saudubray J.M., Tada K. (1995) Inborn metabolic diseases - Diagnosis and treatment. Heidelberg, New York: Springer.
- Flaswinkel H.**, Alessandrini F., Rathkolb B., Decker T., Kremmer E., Servatius A., Jakob T., Soewarto D., Marschall S., Fella C., Behrendt H., Ring J., Wolf E., Balling R., Hrabé de Angelis M., Pfeffer K. (2000) Identification of immunological relevant phenotypes in ENU mutagenized mice. *Mamm Genome*, 5, 11:526-527.
- Freedom T.**, Michael P., Merchut M.D. (2003) Arm restlessness as the initial symptom in Restless Legs Syndrome. *Arch Neurol.*, 60:1013-1015.
- Froesch E.R.**, Schmid C., Schwander J., Zapf J. (1985) Actions of insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol.*, 47:443-467.
- Froesch E.R.**, **Zapf J.** (1985) Insulin-like growth factors and insulin: comparative aspects. *Diabetologia*, 28:485-493.
- Fuchs H.**, Schughart K., Wolf E., Balling R., Hrabé de Angelis M. (2000) Screening for dysmorphological abnormalities- a powerful tool to isolate new mouse mutants. *Mamm. Genome*, 11:528-530.
- Gao WQ.**, Shinsky N., Ingle G., Beck K., Elias K.A., Powell-Braxton L. (1999) IGF-I deficient mice show reduced peripheral nerve conduction velocities and decreased axonal diameters and respond to exogenous IGF- I treatment. *J Neurobiol.*, 39:142-152.
- Gluckmann P.D.** (1995) The endocrine regulation of fetal growth in late gestation: The role of insulin-like growth-factors. *J Clin Endocrinol Metab.*, 80, 4:1047-1050.

- Göthe S., Wang Z., Ng L., Kindblom J.M., Campos Barros A, Ohlsson C., Vennström B., Forrest D.** (1999) Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary- thyroid axis, growth, and bone maturation. *Gen Dev.*, 13:1329-1341.
- Graybiel A.M., Saka E.** (2002) A genetic basis for obsessive grooming. *Neuron*, 33:1-2.
- Greaves M.W., Wall P.D.** (1996) Pathophysiology of itching. *Lancet*, 348:938-940.
- Greer J.M., Capecchi M.R.** (2002) Hoxb8 is required for normal grooming behavior in mice. *Neuron*, 33:23-34.
- Greiling H., Gressner A.M.** (1995) Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie. 3. Auflage, Schattauer, Stuttgart, New York, ISBN 3-7945-1548-X.
- Hägermark O.** (1995) Itch mediators. *Semin. Dermatol.*, 14:271-276.
- Hamilton B.A., Smith D.J., Mueller K.L., Kerrebrock A.W., Bronson R.T., van Berkel V., Daly M.J., Kruglyak L., Reeve M.P., Nemhauser J.L., Hawkins T.L., Rubin E.M., Lander E.S.** (1997) The vibrator mutation causes neurodegeneration via reduced expression of PITP α : Positional complementation cloning and extragenic suppression. *Neuron*, 18:711-722.
- Hardouin S.N., Nagy A.** (2000) Mouse models for human disease. *Clin Genet.*, 57:237-244.
- Hartmann H., Meyer H.** (1994) Klinische Pathologie der Haustiere. Gustav Fischer Verlag. ISBN 3-334-60387-3.
- Heinzmann A., Daser A.** (2002) Mouse models for the genetic dissection of atopy. *Int Arch Allergy Immunol.*, 127:170-180.
- Hitotsumachi S., Carpenter D.A., Russell W.L.** (1985) Dose-repetition increases the mutagenic effectiveness of N-ethyl-N- nitrosourea in mouse spermatogonia. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 82:6619-6621.
- Höflich A., Schmidt P., Föll J., Rottmann O., Weber M.M., Kolb H.J., Pirchner F., Wolf E.** (1998) Altered growth of mice divergently selected for body weight is associated with complex changes in the growth hormone/insulin-like growth factor system. *Growth Horm IGF Res.*, 8:113-123.
- Höflich A., Wu M., Subburaman M., Föll J., Wanke R., Froehlich T., Arnold G.J., Lahm H., Kolb H.J., Wolf E.** (1999) Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in transgenic mice reduces postnatal body weight gain. *Endocrinology*, 140, 12:5488-5496.
- Höflich A., Nedbal S., Blum W.F., Erhard M., Lahm H., Brem G., Kolb H.J., Wanke R., Wolf E.** (2001) Growth inhibition in giant growth hormone transgenic mice by overexpression of insulin-like growth factor-binding protein 2. *Endocrinology*, 142, 5:1889-1898.
- Hoff J.** (2000) Methods of blood collection in the mouse. *Lab Animal*, 29, 10: 47-53.
- Hogan B., Beddington R., Costantini F., Lacy E.** (1994) Manipulating the mouse embryo. A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Hornick J.L.**, van Eenaeme C., Gérard O., Dufrasne I., Istasse L. (2000) Mechanisms of reduced and compensatory growth. *Domest Anim Endocrinol.*, 19:121-132.
- Hough T.A.**, Nolan P.M., Tsipouri V., Toye A.A., Gray I.C., Goldsworthy M., Moir L., Cox R.D., Clements S., Glenister P.H., Wood J., Selley R.L., Strivens M.A., Vizer L., McCormack S.L., Peters J., Fisher E.M., Spurr N., Rastan S., Martin J.E., Brown S.D.M., Hunter A.J. (2002) Novel phenotypes identified by plasma biochemical screening in the mouse. *Mamm Genome*, 13:595-602.
- Hrabé de Angelis M., Balling R.** (1998) Large scale ENU screens in the mouse: genetics meets genomics. *Mutat Res.*, 400:25-32.
- Hrabé de Angelis M.**, Flaswinkel H., Fuchs H., Rathkolb B., Soewarto D., Marshall S., Heffner S., Pargent W., Wuensch K., Jung M., Reis A., Richter T., Alessandrini F., Jakob T., Fuchs E., Kolb H., Kremmer E., Schaeble K., Rollinski B., Roscher A., Peters C., Meitinger T., Strom T., Steckler T., Holsboer F., Klopstock T., Gekeler F., Schindewolf C., Jung T., Avraham K., Behrendt H., Ring J., Zimmer A., Schughart K., Pfeffer K., Wolf E., Balling R. (2000) Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nat Genet.*, 25:444-447.
- Inagaki N.**, Nagao M., Igeta K., Kawasaki H., Kim J.F., Nagai H. (2001) Scratching behavior in various strains of mice. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.*, 14:87-96.
- Jaisoorya T.S.**, Janardhan Y.C., Srinath S. (2003) The relationship of obsessive-compulsive disorder to putative spectrum disorders: results from an indian study. *Compr Psychiatry*, 4, 4:317-323.
- Jinks S.L., Carstens E.** (2002) Responses of superficial dorsal horn neurons to intradermal serotonin and other irritants: comparison with scratching behavior. *J. Neurophysiol.*, 87:1280-1289.
- Johansson C.**, Göthe S., Forrest D., Vennström B., Thoren P. (1999) Cardiovascular phenotype and temperature control in mice lacking thyroid hormone receptor- β or both α_1 and β . *Am J Physiol Soc.*, 276:2006-2012.
- Jones J.I., Clemmons D.R.** (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.*, 16:3-34.
- Justice M.J.**, Carpenter D.A., Favor J., Neuhauser-Klaus A., Hrabé de Angelis M., Soewarto D., Moser A., Cordes S., Miller D., Chapman V., Weber J.S., Rinchik E.M., Hunsicker P.R., Russell W.L., Bode V.C. (2000) Effects of ENU dosage on mouse strains. *Mamm Genome*, 11:484-488.
- Kile B.T.**, Mason-Garrison C.L., Justice M. (2002) Sex and strain-related differences in the peripheral blood cell values of inbred mouse strains. *Mamm Genome*, 14:81-85.
- Kraft H.** (1999) *Klinische Labormethoden der Veterinärmedizin bei Haussäugetieren*, Helmut Kraft, unter Mitarbeit von Dieter Schillinger, 5. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, ISBN 3-432-97003-X.
- Kuraishi Y.**, Nagasawa T., Hayashi K., Satoh M. (1995) Scratching behavior induced by pruritogenic but not algesiogenic agents in mice. *Eur J Pharmacol.*, 275:229-233.

- Le Roith D.**, Werner H., Beitner-Johnson D., Roberts C.T. Jr. (1995) Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev.*,16:143-163.
- Lewis S.E.**, Barnett L.B., Sadler B.M., Shelby M.D. (1991) ENU mutagenesis in the mouse electrophoretic specific-locus test, 1. Dose-response relationship of electrophoretically-detected mutations arising from mouse spermatogonia treated with ethylnitrosourea. *Mutat Res.*, 249:311-315.
- Lewis S.E.**, Barnett L.B., Sadler B.M., Shelby M.D. (1992) ENU mutagenesis in the mouse electrophoretic specific-locus test, 2. Mutational studies of mature oocytes. *Mutat Res.*, 296:129-133.
- Linder C.C.** (2001) The influence of genetic background on spontaneous and genetically engineered mouse models of complex diseases. *Lab Animal*, 30,5:34-39.
- Liu J.L., Le Roith D.** (1999) Insulin-like growth factor I is essential for postnatal growth in response to growth hormone. *Endocrinology*, 140, 11:5178-5184.
- Lochner C.**, Simeon D., Niehaus D.J.H., Stein D.J. (2002) Trichotillomania and Skin-picking: A phenomenological comparison. *Depression and Anxiety*, 15:83-86.
- Löffler G.**, Arndt T., Wisser H., Knoll E., Kiess W., Höflich A., Vogt W., Bidlingmaier F., Kleesiek K. (1995) Endokrines System in: Greiling H., Gressner A.M., Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie. 3. Auflage, Schattauer, Stuttgart, New York, ISBN 3-7945-1548-X.
- Lupu F.**, Terwilliger J.D., Lee K., Segre G.V., Efstratiadis A. (2001) A. Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Dev Biol.*, 229:141-62.
- Miguel E.C.**, Shavitt R.G., Ferrão Y.A., Brotto S.A., Diniz J.B. (2003) How to treat OCD in patients with Tourette syndrome. *J. Psychom Res.*, 55:49-57.
- Mouse Genome Sequencing Consortium** (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420: 5: 520-562.
- Müller-Vahl K.R.**, Berding G., Brücke T., Kolbe H., Meyer G.H., Hundeshagen H., Dengler R., Knapp W.H., Emrich H.M. (2000) Dopamine transporter binding in Gilles de la Tourette syndrome. *J Neurol.*, 247:514-520.
- Nordstrom E.J.**, Burton F.H. (2002) A transgenic model of comorbid Tourette's syndrome and obsessive-compulsive disorder circuitry. *Mol Psychiatry*, 7:617-625.
- Noveroske J.K.**, Weber J.S., Justice M.J. (2000) The mutagenic action of N-ethyl-N-Nitrosourea in the mouse. 4. *Mamm Genome*, 11:478-483.
- Nüsslein-Volhard C.**, Wieschaus E. (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287:795-801.
- Ohlsson C.**, Bengtsson A.B., Isaksson O.G.P., Andreassen T.T., Słotweg M.C. (1998) Growth hormone and bone. *Endocr Rev.*, 19:55-79.
- Ozanne S.E.** (2001) Metabolic programming in animals. *Br Med Bull.*, 60:143-152.

- Pfaff D.** (2001) Precision in mouse behavior genetics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:5957-5960.
- Powell-Braxton L.**, Hollingshead P., Warburton C., Dowd M., Pitts-Meek S., Dalton D., Gillett N., Stewart T.A. (1993) IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev.*, 7:2609-2617.
- Quimby F.W.** (1999) The mouse. In: Loeb W.F., Quimby F.W. (eds), *The clinical chemistry of laboratory animals*, Taylor and Francis Inc., 3-32, ISBN 1560327170.
- Rajaram S.**, Baylink D.J., Mohan S. (1997) Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev.*, 18:801-831.
- Rathkolb B.**, Decker T., Fuchs E., Soewarto D., Fella C., Heffner S., Pargent W., Wanke R., Balling R., Hrabé de Angelis M., Kolb H.J., Wolf E. (2000a) The clinical-chemical screen in the Munich ENU Mouse Mutagenesis Project: screening for clinically relevant phenotypes. *Mamm Genome*, 11:543-546.
- Rathkolb B.**, Fuchs E., Kolb H.J., Renner-Müller I., Krebs O., Hrabé de Angelis M., Wolf E. (2000b) Large-scale N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis of mice- from phenotypes to genes. *Exp Physiol.*, 85:635-644.
- Rees J.L., Laidlaw A.** (1999) Pruritus: more scratch than itch. *Clin Exp Dermatol.*, 24:490-3.
- Rijkers T.**, Peetz A., Ruther U. (1994) Insertional mutagenesis in transgenic mice. *Transgenic Res.*, 3:203-215.
- Riley J.H., Cornelius L.M.** (1999) Electrolytes, blood gases and acid-base balance. In: Loeb W.F., Quimby F.W. (eds), *The clinical chemistry of laboratory animals*, Taylor and Francis Inc., 549-642, ISBN 1560327170.
- Rinchik E.M.** (1991) Chemical mutagenesis and fine-structure functional analysis of the mouse genome. *Trends Genet.*, 7:15-21.
- Rinderknecht E., Humbel R.E.** (1978a) The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem.*, 253:2769-2776.
- Rinderknecht E., Humbel R.E.** (1978b) Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett.*, 89:283-286.
- Rogers D.C.**, Fisher E.M., Brown S.D., Peters J., Hunter A.J., Martin J.E. (1997) Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome*, 8:711-713.
- Rogers D.C.**, Jones D.N.C., Nelson P.R., Jones C.M., Quilter C.A., Robinson T.L., Hagan J.J. (1999) Use of SHIRPA and discriminant analysis to characterise marked differences in the behavioural phenotype of six inbred mouse strains. *Behav Brain Res.*, 105:207-217.
- Rogers D.C.**, Peters J., Martin J.E., Ball S., Nicholson S.J., Witherden A.S., Hafezparast M., Latham J., Robinson T.L., Quilter C.A., Fisher E.M.C. (2001) SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. *Neurosci Lett.*, 306:89-92.

- Rosado J.L.** (1999) Symposium: Causes and etiology of stunting - separate and joint effects of micronutrient deficiencies on linear growth. *J Nutr.*, 129:531S-533S.
- Russ A.**, Stumm G., Augustin M., Sedlmeier R., Wattler S., Nehls M. (2002) Random mutagenesis in the mouse as a tool in drug discovery. *Drug Discov Today*, 7, 23:1175-1183.
- Russell L.B.**, Russell W.L., Rinchik E.M., Hunsicker P.R. (1990) Factors affecting the nature of induced mutations. In: Allen J.W., Bridges B.A., Lyon M.F., Moses M.J., Russell L.B. (eds.) *Biology of mammalian germ cell mutagenesis*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, 271-289.
- Russell L.B., Russell W.L.** (1992) Frequency and nature of specific-locus mutations induced in female mice by radiations and chemicals: a review. *Mutat Res.*, 296:107-127.
- Russell W.L.**, Kelly E.M., Hunsicker P.R., Bangham J.W., Maddux S.C., Phipps E.L. (1979) Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:5818-5819.
- Russell W.L.**, Hunsicker P.R., Raymer G.D., Steele M.H., Stelzner K.F., Thompson H.M. (1982a) Dose-response curve for ethylnitrosourea-induced specific-locus mutations in mouse spermatogonia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:3589-3591.
- Russell W.L.**, Hunsicker P.R., Carpenter D.A., Cornett C.V., Guinn G.M. (1982b) Effect of dose fractionation on the ethylnitrosourea induction of specific-locus mutations in mouse spermatogonia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:3592-3593.
- Sachs L.** (2002) *Angewandte Statistik*, 10. Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg. ISBN 3-540-42448-2.
- Sambrook J., Russell D.W.** (2001) *Molecular cloning, a laboratory manual*. 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sarna R.J.**, Dyck R.H., Whishaw I.Q. (2000) The Dalila effect: C57BL6 mice barber whiskers by plucking. *Behav Brain Res.*, 108:39-45.
- Saudubray J.M., Charpentier C.** (1995) Clinical phenotypes: diagnosis/algorithms. In: Scriver C. et al., (eds.): *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, Inc., 327-400.
- Schmelz M.** (2001) A neural pathway for itch. *Nat Neurosci.*, 4:9-10.
- Schmelz M.** (2002) Itch- mediators and mechanisms. *J Dermatol Sci.*, 28:91-96.
- Schmidl M.** (1981) *Laboruntersuchung für die Diagnose und Verlaufskontrolle*. Boehringer Mannheim GmbH, 2. Auflage.
- Schnell M.A.**, Hardy C., Hawley M., Probert K.J., Wilson J.M. (2002) Effect of blood collection technique in mice on clinical pathology parameters. *Hum Gene Ther.*, 13:155-61.
- Schwander J.C.**, Hauri C., Zapf J., Froesch E.R. (1983) Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status. *Endocrinology*, 113:297-305.

- Sellier P.** (2000) Genetically caused retarded growth in animals. *Domest Anim Endocrinol.*, 19:105-119.
- Silver L.M.** (1995) *Mouse genetics - Concepts and applications*. New York, Oxford:, Oxford University Press, ISBN 0-19-507554-4.
- Sjögren K.**, Liu JL, Blad K., Skrtic S., Vidal O., Wallenius V., Le Roith D., Törnell J., Isaksson O.G.P., Jansson J.O., Ohlsson C. (1999) Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:7088-7092.
- Soewarto D.**, Fella C., Teubner A., Rathkolb B., Pargent W., Heffner S., Marschall S., Wolf E., Balling R., Hrabé de Angelis M. (2000) The large-scale Munich ENU-mouse-mutagenesis screen. *Mamm Genome*, 11:507-510.
- Solnica-Krezel L.**, Schier A.F., Driever W. (1994) Efficient recovery of ENU-induced mutations from the zebrafish germline. *Genetics*, 136:1401-1420.
- Spencer T.J.**, Biederman J., Harding M., O'Donnell D., Faraone S.V., Wilens T.E. (1996) Growth deficits in ADHD children revisited: Evidence for disorder-associated growth delays? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 35:1460-1472.
- Spencer T.J.**, Biederman J., Wilens T.E., Faraone S.V. (2002) Overview and neurobiology of Attention-Deficit/Hyperactivity disorder. *J Clin Psychiatry*, 63 (Suppl.12):3-9.
- Spruijt B.M.**, vanHoff J.A.R.A.M., Gispen W.H. (1992) Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiol Rev.*, 72, 3:825-852.
- Stanford W.L.**, Cohn J.B., Cordes S.P. (2001) Gene-trap mutagenesis: Past, present and beyond. *Nat Rev Genet.*, 2:756-768.
- Strazielle C., Lalonde R.** (1998) Grooming in Lurcher mutant mice. *Physiol Behav.*, 64, 1:57-61.
- Taylor J.R.**, Morshed S.A., Parveen S., Mercadante M.T., Scahill L., Peterson B.S., King R.A., Leckman J.F., Lombroso P.J. (2002) An animal model of Tourette's Syndrome. *Am J Psychiatry*, 159:657-660.
- Thomas L.** (1998) *Labor und Diagnose*. 5. Auflage, Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt Main. ISBN 3-980521-3-2.
- Threadgill D.W.**, Dlugosz A.A., Hansen L.A., Tennenbaum T., Lichti U., Yee D., LaMantia C., Mourton T., Herrup K., Harris R.C., Barnard J.A., Yuspa S.H., Coffey R.J., Magnuson T. (1995) Targeted disruption of mouse EGF receptor: Effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*, 269,14:230-238.
- Wang J.**, Zhou J., Powell-Braxton L., Bondy C. (1999) Effects of *igf1* gene deletion on postnatal growth patterns. *Endocrinology*, 140, 7:3391-3393.
- Weber J.S.**, Salinger A., Justice M.J. (2000) Optimal N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) doses for inbred mouse strains. *Genesis*, 26:230-233.

- Weisshaar E.**, Heyer G., Forster C., Hornstein O.P., Handwerker H.O. (1996) Antipruritic effect of antihistaminic and local anesthetic topical agents after iontophoretic histamine stimulation. *Hautarzt*, 47:355-360.
- Whishaw I.Q.**, Haun F., and Kolb B. (1999) Kapitel 38: Analysis of behavior in laboratory rodents. In U. Windhorst, D. Johansson (eds) *Modern techniques in neuroscience research*, Amsterdam: Springer-Verlag.
- Wiesner E., Ribbeck R.** (1991) *Wörterbuch der Veterinärmedizin*. Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 3. Aufl., ISBN 3-334-00388-4
- Wolf E.**, Kramer R., Blum W.F., Foll J., Brem G. (1994) Consequences of postnatally elevated insulin-like growth factor-II in transgenic mice: endocrine changes and effects on body and organ growth. *Endocrinology*, 135:1877-1886.
- Wolf E.**, Scherthaner W., Zakhartchenko V., Prella K., Stoikovic M., Brem G. (2000) Transgenic technology in farm animals- progress and perspectives. *Exp Physiol.*, 85, 6:615-625.
- Woychik R.P.**, Klebig M.L., Justice M.J., Magnuson T.R., Avner E.D., Avrer E.D. (1998) Functional genomics in the post-genome era. *Mutat Res.*, 400:3-14.
- Wurst W.**, Rossant J., Prideaux V., Kownacka M., Joyner A., Hill D.P., Guillemot F., Gasca S., Cado D., Auerbach A., Ang S.L. (1995) A large-scale gene-trap screen for insertional mutations in developmentally regulated genes in mice. *Genetics*, 139:889-899.
- Yakar S.**, Liu JL, Stannard B., Butler A., Accili D., Sauer B., Le Roith D. (1999) Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:7324-7329.
- Yakar S.**, Liu JL, Le Roith D. (2000) The growth hormone/insulin-like growth factor-I system: implications for organ growth and development. *Pediatr Nephrol.*, 14:544-549.
- Yamaguchi T.**, Nagasawa T., Satoh M., Kuraishi Y. (1998) Itch-associated response induced by intradermal serotonin through 5-HT₂ receptors in mice. *J Neurosci Res.*, 35:77-83.
- Yamamoto R.S.**, Crittenden L.B., Sokoloff L., Jay G.E. (1963) Genetic variations in plasma lipid content in mice. *J Lipid Res.*, 4, 3: 413-418.
- Zhou Y.**, Xu B.C., Maheshwari H.G., He L., Reed M., Lozykowski M., Okada S., Cataldo L., Coschigamo K., Wagner T.E., Baumann G. (1997) A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:13215-13220.

9 Anhang

Tabelle 22:
Körpergewichtsmittelwerte mit Standardabweichung der SMA002-Nachkommen aus der Erhaltungszucht (adult)

Alter (Wo)	Geschlecht	n	Wildtypen MW ± SD	n	Mutanten MW ± SD	Vergleich der Gruppen
3	m	35	12.7 ± 2.3	30	7.0 ± 2.3	***
	w	35	12.2 ± 1.8	35	8.7 ± 1.8	***
4	m	35	18.8 ± 2.6	30	12.2 ± 3.1	***
	w	35	16.8 ± 1.8	35	12.2 ± 1.8	***
5	m	35	21.7 ± 1.9	30	16.5 ± 2.6	***
	w	35	19.5 ± 1.4	35	15.1 ± 1.3	***
6	m	35	23.6 ± 2.0	30	18.2 ± 2.3	***
	w	35	20.9 ± 2.1	35	15.5 ± 1.2	***
7	m	35	24.9 ± 2.3	30	19.6 ± 2.5	***
	w	35	21.5 ± 1.9	35	16.1 ± 1.3	***
8	m	35	26.2 ± 2.2	30	20.9 ± 1.7	***
	w	35	22.1 ± 1.6	35	17.1 ± 1.6	***
9	m	35	27.3 ± 2.4	30	21.9 ± 1.4	***
	w	35	23.6 ± 2.0	35	17.8 ± 1.4	***
10	m	35	27.9 ± 2.6	30	22.3 ± 1.6	***
	w	35	24.3 ± 2.3	35	18.2 ± 1.6	***
11	m	35	28.9 ± 3.0	30	22.8 ± 1.7	***
	w	35	24.8 ± 2.4	35	18.8 ± 1.7	***
12	m	35	29.5 ± 3.0	30	22.9 ± 2.4	***
	w	35	25.8 ± 3.1	35	19.6 ± 1.8	***
13	m	35	30.6 ± 2.6	28	23.5 ± 2.0	***
	w	35	26.9 ± 2.7	35	20.2 ± 1.4	***
14	m	35	31.1 ± 3.4	28	24.0 ± 1.5	***
	w	35	26.9 ± 2.6	32	20.3 ± 1.7	***
15	m	35	31.5 ± 3.4	28	24.5 ± 1.7	***
	w	35	27.9 ± 2.9	32	20.8 ± 1.7	***
16	m	35	31.9 ± 3.6	28	24.8 ± 1.7	***
	w	35	29.4 ± 3.5	32	21.2 ± 1.9	***
17	m	35	33.0 ± 3.8	27	25.0 ± 1.4	***
	w	35	29.9 ± 3.9	32	21.4 ± 1.7	***
18	m	35	33.6 ± 3.9	27	25.3 ± 1.6	***
	w	35	30.3 ± 3.6	32	21.7 ± 1.8	***
19	m	35	33.8 ± 3.8	25	25.6 ± 1.7	***
	w	35	30.9 ± 4.2	28	21.8 ± 2.0	***
20	m	35	34.6 ± 4.0	25	25.8 ± 1.9	***
	w	35	32.0 ± 3.9	27	22.1 ± 1.9	***
21	m	35	35.2 ± 3.7	25	26.0 ± 1.9	***
	w	35	32.4 ± 4.7	27	22.1 ± 2.1	***
22	m	35	35.4 ± 4.1	25	26.0 ± 1.8	***
	w	35	32.0 ± 4.5	27	22.2 ± 1.8	***
23	m	35	36.7 ± 3.8	25	26.0 ± 1.7	***
	w	35	33.0 ± 4.3	27	22.3 ± 2.1	***
24	m	35	36.5 ± 4.0	25	26.5 ± 2.0	***
	w	35	34.0 ± 3.8	25	22.8 ± 2.2	***
25	m	35	36.7 ± 3.9	25	26.7 ± 1.9	***
	w	35	33.9 ± 4.2	25	23.2 ± 2.2	***
26	m	32	37.1 ± 4.0	24	26.7 ± 1.9	***
	w	32	35.1 ± 4.9	24	23.3 ± 2.5	***

Wo: Lebensalter in Wochen; n: Anzahl; Gruppenvergleich t-Test: *** p < 0,001.

Tabelle 23: Körpermaße und Organgewichte Hybridtiere					
Körpermaße/ Organgewicht (g)	Geschlecht	WT-Hybrid (n = 11) MW ± SD	MUT-Hybrid (n = 11) MW ± SD	MUT % KGW	MUT % Körpermaß/ Organgewicht WT-Hybrid
Körpergewicht	m	34,83 ± 4,3 ^c	27,50 ± 0,7 ^c	-	80 ± 8,93
	w	24,34 ± 0,98	21,28 ± 0,96	-	88 ± 6,54
Karkasse	m	14,12 ± 1,5 ^c	11,27 ± 0,4 ^c	41 ± 1,08	81 ± 8,72
	w	10,04 ± 0,45	8,43 ± 0,26	40 ± 1,61	84 ± 4,93
Haut	m	6,47 ± 1,39 ^b	4,67 ± 0,28 ^c	17 ± 0,72	74 ± 12,70
	w	4,25 ± 0,25	3,75 ± 0,25	18 ± 0,99	89 ± 8,84
Pankreas	m	0,35 ± 0,05 ^b	0,29 ± 0,02	1,1 ± 0,10	83 ± 12,42
	w	0,25 ± 0,04	0,25 ± 0,05	1,2 ± 0,20	102 ± 21,22
Milz	m	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,01 ^a	0,3 ± 0,03 ^c	92 ± 15,81
	w	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,4 ± 0,22	124 ± 35,33
Nieren	m	0,56 ± 0,04 ^c	0,46 ± 0,02 ^c	1,7 ± 0,06 ^c	83 ± 5,40
	w	0,34 ± 0,02	0,29 ± 0,02	1,4 ± 0,09	86 ± 5,78
Nebennieren	m	0,006 ± 0,001 ^c	0,007 ± 0,001 ^c	0,03 ± 0,004 ^c	118 ± 33,92
	w	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,001	0,05 ± 0,005	97 ± 11,63
Leber	m	1,72 ± 0,21 ^c	1,43 ± 0,13 ^c	5,2 ± 0,55	84 ± 6,38
	w	1,18 ± 0,09	1,03 ± 0,04	4,8 ± 0,24	88 ± 9,40
Lunge	m	0,16 ± 0,01 ^b	0,14 ± 0,01 ^b	0,5 ± 0,02 ^a	90 ± 6,88
	w	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,6 ± 0,06	91 ± 7,75
Herz	m	0,16 ± 0,02 ^b	0,14 ± 0,01 ^c	0,5 ± 0,03	91 ± 6,21
	w	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,5 ± 0,05	89 ± 12,45
Thymus	m	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01 ^c	0,1 ± 0,02 ^c	96 ± 33,67
	w	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,2 ± 0,02	125 ± 23,20
Speicheldrüsen	m	0,22 ± 0,01 ^c	0,19 ± 0,01 ^c	0,7 ± 0,02 ^c	89 ± 2,84
	w	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,6 ± 0,05	95 ± 3,66
Gehirn	m	0,51 ± 0,01	0,48 ± 0,01	1,8 ± 0,04 ^c	95 ± 2,27
	w	0,51 ± 0,01	0,48 ± 0,01	2,3 ± 0,08	94 ± 4,34

n: Anzahl; ^{a, b, c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen; t-Test: ^a p < 0,05; ^b p < 0,01; ^c p < 0,001
n. s.= nicht signifikant; MUT: mutante Mäuse, WT: Wildtypiere, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung

Tabelle 24: Körpermaße und Organgewichte Erhaltungszuchttiere					
Körpermaße/ Organgewicht (g)	Geschlecht	WT- Erhaltung (n = 2)	MUT-Erhaltung (n = 2)	MUT % KGW	MUT %Körpermaß/ Organgewicht WT-Erhaltung
Körpergewicht	m	43,1	27,5	-	64
	w	38,9	19,3	-	50
Karkasse	m	16,56	10,96	57	66
	w	14,76	7,37	38	52
Haut	m	8,51	4,78	13	56
	w	7,00	3,38	18	48
Pankreas	m	0,2896	0,2727	1	94
	w	0,2295	0,1623	0,9	71
Milz	m	0,1156	0,0869	0,3	75
	w	0,1461	0,0882	0,5	60
Nieren	m	0,8057	0,5498	2	68
	w	0,5652	0,2346	1,2	42
Nebennieren	m	0,0058	0,0122	0,04	210
	w	0,0064	0,0093	0,05	145
Leber	m	1,9519	1,456	7,5	75
	w	1,8879	1,0238	5,3	54
Lunge	m	0,1789	0,1506	0,6	84
	w	0,2521	0,1052	0,6	42
Herz	m	0,1580	0,1082	0,4	68
	w	0,1534	0,074	0,4	48
Thymus	m	0,0193	0,0174	0,1	90
	w	-	0,036	0,2	-
Speicheldrüsen	m	0,2206	0,1284	0,5	58
	w	0,1380	0,0689	0,4	50
Gehirn	m	0,4744	0,4858	1,8	102
	w	0,5345	0,4462	2,3	83

MUT: mutante Mäuse, WT: Wildtypiere; n: Anzahl

Tabelle 25: Gesundheitsüberwachung (Health Monitoring)

Mikroben oder Einzelproben (Specimen)	Test	Zeitraum	Februar 01	April 01	Juli 01	October 01	Januar 02
<u>Viren</u>							
MHV	ELISA	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
MVM	ELISA	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
PVM	ELISA	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
Sendai	ELISA	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
Reovirus 3	ELISA	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
GDV 11 (Theiler's) Virus	ELISA	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
Rotavirus (EDIM)	ELISA	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
Maus Adenovirus	ELISA	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
K Virus	ELISA	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
Maus Cytomegalie Virus	ELISA	Jährlich			0/17		
Ectromelia Virus	ELISA	Jährlich			0/17		
Hantavirus	IFA	Jährlich			0/17		
LCM	ELISA	Jährlich			0/17		
Polyoma Virus	ELISA	Jährlich			0/17		
<i>Maus Thymus Virus</i>	IFA	Jährlich			0/17		
LDV	Biochemisch	Jährlich			0/17		
<u>Mycoplasmen</u>							
Mycoplasma pulmonis	ELISA	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
<u>Bakterien</u>							
Clostridium piliforme	ELISA	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
Leptospira species	Mikroagglutination	Jährlich		0/17	0/17		
<u>Rachen/Trachea/Lunge/ Caecum Bakteriologie</u>							
Bordetella bronchiseptica	Kultur/Bakteriologie	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
Citrobacter freundii	Kultur/Bakteriologie	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
Corynebacterium kutscheri	Kultur/Bakteriologie	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
Pasteurella spp.	Kultur/Bakteriologie	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
Streptobacillus moniliformis	Kultur/Bakteriologie	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
Beta hämolysierende Streptokokken	Kultur/Bakteriologie	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
Klebsiella pneumonia/oxytoca	Kultur/Bakteriologie	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
Proteus spp.	Kultur/Bakteriologie	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
Pseudomonas aeruginosa	Kultur/Bakteriologie	Quartal	0/17	0/17	0/17	3/17	0/15
Staphylococcus aureus	Kultur/Bakteriologie	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	1/15
Pneumocystis carinii	Kultur/Bakteriologie	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
Yersinia pseudotuberculosis	Kultur/Bakteriologie	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
Thyzzler's disease	Pathologie	Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
Haarkleid/ Haut auf Ektoparasiten		Quartal	0/17	0/17	0/17	0/17	0/15
Inhalt des Caecums auf Endoparasiten		Quartal	1/17	1/17	0/17	1/17	1/15
Enteromonas species		Quartal	1/17	1/17	0/17	1/17	1/15
Bemerkungen zur Bakteriologie:							
regelmäßig nachgewiesen/isoliert:	E. coli, alpha hämolysierende Streptokokken, Enterococcus						
häufig nachgewiesen/isoliert:	Staphylococcus xylosus						
gelegentlich nachgewiesen/isoliert:	Staphylococcus sciuri, Staphylococcus hyicus chromogens, Staphylococcus epidermidis, Enterobacter cloacae						
(1-3 Tiere im Report-Zeitraum)	Enterobacter amnigenus, Brevundimonas vesicularis, Rhodococcus sp., Pantoea sp., Bacillus sp.						

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf möchte ich mich sehr herzlich für die Bereitstellung des Themas, seine hilfreichen Anregungen sowie die vielfältigen Möglichkeiten der wissenschaftlichen Arbeit bedanken, die mir durch eine Beschäftigung an seinem Institut zuteil wurden.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Birgit Rathkolb und Herrn Prof. Dr. Bernhard Aigner für die Betreuung dieser Arbeit und ihre jederzeit gewährte tatkräftige Unterstützung und Anregung.

Herrn Dr. Ottheinz Krebs und Herrn Dr. Andreas Höflich danke ich für umfangreiche praktische und wissenschaftliche Unterstützung, bei der Durchführung verschiedener Analysen.

Allen Mitarbeitern des Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekts möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken.

Diesen und allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern des Moorversuchsguts Badersfeld, insbesondere den zwei- und vierbeinigen Kollegen im Doktorandenzimmer, möchte ich meinen herzlichen Dank für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit aussprechen.

Ganz herzlicher Dank gebührt Frau Dr. Tanja Ruthsatz und Herrn Alf Vortanz, die durch unerschütterliche Geduld, Verständnis und Motivation einen besonderen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

Schließlich vielen Dank an meine Eltern für jegliche Unterstützung in diesen vier Jahren.

Durch die finanzielle Unterstützung des Deutschen Humangenomprojekts und der Firma SWITCH Biotech AG war die Durchführung dieser Arbeit möglich.

Lebenslauf

Maike Howaldt
Wilhelmshof 9
85764 Oberschleißheim

Geburtsdatum: 6.02.1966
Geburtsort: Glückstadt
Eltern: Dieter Howaldt
Renate Howaldt, geb. Wegner

Bildungsweg:

1972-1974	Grundschule Am Weiher, Hamburg
1974-1976	Grundschule Bargteheide Land
1976-1988	Kreisgymnasium Bargteheide
Juni 1988	Abitur
1989-1991	Berufsausbildung zur Tierpflegerin für Haus- und Versuchstierkunde
1991-1992	Berufstätigkeit als Tierpflegerin, Tierärztliche Klinik Dr. Bellwinkel, Hamburg
1992-1999	Studium der Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin
September 1999	Approbation als Tierärztin
seit 01.12.1999	Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Vorstand: Prof. Dr. E. Wolf, mit Anfertigung der Dissertation unter der Betreuung von Fr. Dr. B. Rathkolb