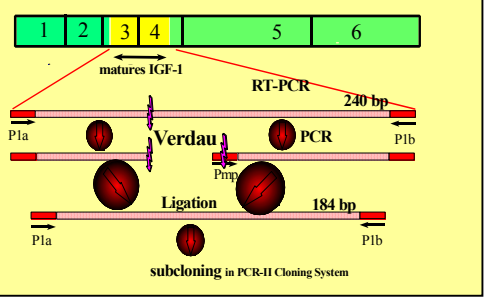
Insulin-like growth factor- 1 (IGF-1) mRNA Quantifizierung mittels kompetitiver RT-PCR: Standarddesign, Validierung und Anwendung zur Untersuchung der Muskelwachstumsregulation

M. Pfaffl, H.H.D. Meyer und H. Sauerwein
Institut für Physiologie, Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel der TU München-Weihenstephan, 85350 Freising-Weihenstephan

Einleitung:

Während des postnatalen Muskelwachstums stimuliert IGF-1 die Proteinsynthese, der Proteinabbau wird reduziert und gleichzeitig ist die Glukoseutilisation verbessert. Diese Effekte können sowohl durch IGF-1 aus dem Blut (endokrine Wirkung) als auch durch lokal in der Muskulatur exprimiertes IGF-1 (parakrine/autokrine Wirkung) zustande kommen. Da über die lokale hormonelle Regulation des Muskelwachstums beim Wiederkäuer kaum etwas bekannt ist, wurde in der hier vorgestellten Studie die IGF-1 mRNA Expression in verschiedenen Geweben beim Rind quantifiziert.

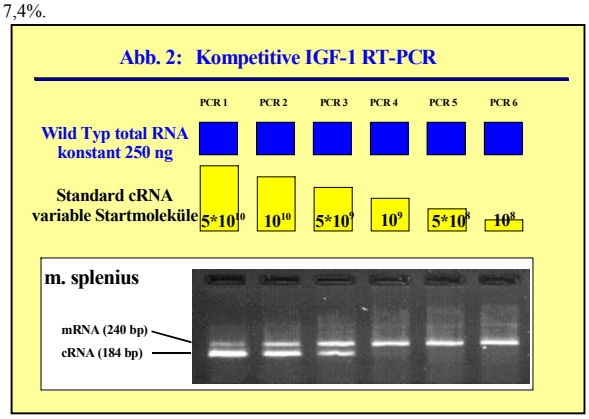
Abb. 1: Das IGF-1 Gen und IGF-1 cRNA Standard Design



Methodik:

Es wurde eine Methode entwickelt, die eine spezifische und sensitive Quantifizierung der IGF-1 mRNA ermöglicht: eine kompetitive intern standardisierte **R**everse **T**ranskription mit anschließender **P**olymerase **C**hain **R**eaction (**RT-PCR**). Eine Standard cRNA (184 b), die mit der nativen IGF-1 mRNA Sequenz (240 b) bis auf eine mittige Deletion von 56 b identisch ist, wurde rekombinant erstellt (Abbildung 1). Bekannte Mengen der IGF-1 cRNA wurden als Kompetitor zu konstanten Mengen Gewebe-RNA (250 ng Gesamt-RNA mit unbekanntem IGF-1 mRNA Gehalt) in die RT-PCR Reaktion eingesetzt (Abbildung 2). Nach RT-PCR wurden die beiden entstandenen DNA Amplifikate über eine HPLC-Anionentauschersäule getrennt und mit Hilfe eines UV-Detektors analysiert und quantifiziert. Dieser quantitative IGF-1 mRNA Test hat folgende Validitätskriterien: Die Empfindlichkeit liegt bei 1600 mRNA Molekülen, der lineare Meßbereich (r=0,997) zwischen 140 bis 840 ng Gesamt-RNA pro Reaktionsansatz und die Intra-Test Variation beträgt 7,4%.

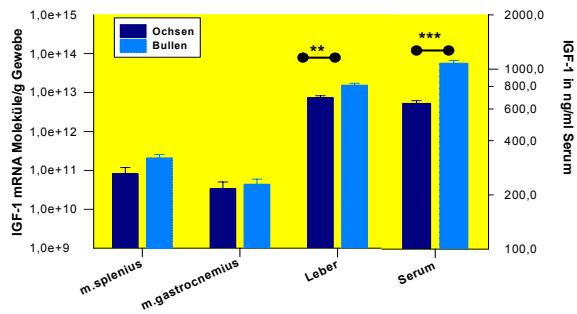
Abb. 2: Kompetitive IGF-1 RT-PCR



Versuchsaufbau:

In einem ersten Versuch wurde der Einfluß der Kastration auf die IGF-1 mRNA Expression in Leber und in zwei Muskeln (m.splenius und m. gastrocnemius) sowie auf die IGF-1 Serumkonzentrationen untersucht. 5 Ochsen und 5 Bullen der Rasse Braunvieh wurden nach identischer Haltung im Alter von 10 Monaten geschlachtet. Gewebeproben wurden entnommen, bei -80°C tiefgefroren und während des Schlachtvorgangs wurden Blutproben aus der *Vena jugularis* entnommen.

Abb. 3: IGF-1 mRNA Gewebeexpression und IGF-1 Serumkonzentrationen



Ergebnisse und Diskussion:

Tägliche Zunahmen, Schlachtendgewichte (Tabelle 1) und IGF-1 mRNA Expressionen waren bei Ochsen in allen untersuchten Geweben tendenziell reduziert (Abbildung 3).

Tabelle 1:

n = 5	tägl. Zunahmen in g/d	Schlachtgewicht in kg
Ochsen	816±21 a	356±2
Bullen	1040±69 b	401±25

Unterschiedliche Buchstaben bezeichnen signifikante (p<0,05) Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die Ergebnisse zeigen die gewebespezifische Regulation der IGF-1 mRNA Expression zwischen den verschiedenen Geweben und eine deutliche Abhängigkeit von der Kastration. In der Bullengruppe waren die IGF-1 mRNA Konzentrationen im m. splenius und m. gastrocnemius tendenziell erhöht, wobei der Unterschied im m. splenius deutlicher ausfiel (p=0,07). Die zirkulierende Menge an IGF-1 steht in direktem Zusammenhang (r=0,81) mit der hepatischen IGF-1 mRNA Expression (Abbildung 4). Beide Parameter sind in den Bullen erhöht (p<0,01) und zeigen einen steileren Anstieg auf ein höheres IGF-1 Endniveau. Ein Zusammenhang zwischen dem androgenen Status, den IGF-1 Konzentrationen und den täglichen Zunahmen deutet sich an. Der Einfluß der gewebespezifischen IGF-1 Expressionen auf das allometrische Muskelwachstum soll schließlich in Zusammenschau mit derzeit erhobenen Daten der IGF-1 Rezeptorausstattung abgeschätzt werden.

Abb. 4: Korrelation zwischen IGF-1 mRNA Expression und Plasmakonzentration

