

Claudia Falter
Dr. sc. hum.

Die molekulare Genetik einer Insertions-Mutation bei transgenen Ratten der Linie TGN1273

Geboren am 19.10.1965 in Walldorf
Reifeprüfung im Mai 1989 in Wiesloch
Studiengang der Fachrichtung Biologie von WS 90/91 bis SS 97
Vordiplom am 14.07.1993 an der Universität Heidelberg
Diplom am 10.08.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Humangenetik
Doktorvater: Professor Dr. rer. nat. habil Werner Buselmaier

Die transgene Rattenlinie 1273 wurden durch die Pronukleusmikroinjektion des Gens hPMCA4Cl, welches für die Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase codiert, generiert.

Diese Linie zeigte, im Gegensatz zu fünf weiteren Rattenlinien, die für das gleiche Transgen etabliert waren, einen abweichenden auffälligen Phänotyp. Im Vergleich zu den Tieren der anderen transgene Linien konnte bei den Tieren der Linie 1273 nur eine verminderte Expression des Transgens festgestellt werden und demzufolge nicht ursächlich für den pathologischen Phänotyp sein. Die homozygoten Ratten zeigten eine starke Entwicklungsretardierung bezüglich der Körpergröße und damit einhergehend ein im Vergleich zu Altersgenossen um über 50% verringertes Körpergewicht. Die Ratten zeigten Bewegungsstörungen durch Ataxie und Dystonie und unspezifisches „im Kreis gehen“ mit unklarem Auslöser. Die betroffenen Ratten werden maximal sieben Wochen alt.

Des Weiteren waren Skelettdeformationen der Wirbelsäule, im Schädelbereich, verkürzter Unterkiefer und überlange auseinanderstehende Schneidezähne zu erkennen. Die Lebensdauer dieser Tiere betrug nur maximal 7 Wochen (Hammes 1997).

Unter Annahme, dass durch die Insertion des Transgens ein endogenes Gen zerstört wurde, wurden weitergehende molekularbiologische Untersuchungen vorgenommen.

Die Prä- und Postintegrationsstelle konnte durch die Fluoreszenz in situ Hybridisierung an Metaphasechromosomen von transgenen und Wildtyp Ratten lokalisiert werden. Der Insertionsort wurde auf RNO 18p2 lokalisiert.

Genomische DNA von transgenen Ratten wurde für die Erstellung einer Genome-Walker Bibliothek verwendet. An Restriktionsfragmente wurden Adapter ligiert und anschließend durch PCR flankierende Elemente des Transgens zu amplifizieren. Mit PCR Fragmenten dieser Genome Walker Bibliothek wurde eine Interspezieshybridisierung durchgeführt. Das Ergebnis, eine Hybridisierung mit DNA von Schwein, Rind und Maus, wies darauf hin, dass es sich bei den untersuchten flankierenden Segmenten wahrscheinlich um konservierte Bereiche handelt. Nach der Klonierung und Sequenzierung dieser Fragmente wurde mit der 3,9 kb großen Sequenz, die fs1273 bezeichnet wurde, eine ausführliche Datenbankrecherche unternommen. Es wurden sieben Sequenzen gefunden, die bezüglich der Homologie einen signifikanten Grad an Übereinstimmung mit der Sequenz fs1273 erreichten. Die Auswertung der Daten zeigte, dass die Insertion des Transgens in einen Bereich im Rattengenom stattgefunden hat, der zum einen im murinen und humanen Genom über größere Bereiche syntän ist und zum anderen eine Prädisposition für Mutationen im neurodegenerativen Bereich aufweist. Die Mutationen twirler, ataxia und in einer etwas entfernteren chromosomalen Region die Mutation shiverer sowie die humane Mutation im NPC1 Gen zeigen pathologische Symptome mit

neurodegenerativem Hintergrund. Die Untersuchungen haben ergeben, dass das Gen, das durch die Insertion des Transgens beeinträchtigt wurde, ein Kandidatengens für den neurodegenerativen Anteil am Niemann-Pick Syndrom Typ C ist.

Sollten zukünftige Untersuchungen eine Etablierung der Rattenlinie TGN1273 als Tiermodell für den neurodegenerativen Anteil des Niemann-Pick Syndroms erlauben, würde es sich hierbei um das erste Rattenmodell handeln, das nicht durch die Expression eines Transgens oder durch Spontanmutation entstanden ist.