

Soo Jin Min-Weißhorn  
Dr. sc. hum.

## **Etablierung und Charakterisierung von verschiedenen transgenen Mäuselinien**

Geboren am 11.01.1964 in Inchon (Süd-Korea)

Reifeprüfung am 19.12.1982 in Inchon

Biologiestudium an der Sungsim Universität in Seoul vom SS 1982 bis SS 1984

Studiengang der Fachrichtung Biologie vom WS 1986/1987 bis SS 1993

Vordiplom am 10.02.1987 an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

Diplomprüfung am 27.04.1993 an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

Promotionsfach: Biologie (Humangenetik)

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. habil. Werner Buselmaier

Im Rahmen meiner Dissertation wurden ursprünglich folgenden Arbeitsziele angestrebt:

- I. Mit Hilfe der Maus-Chromosom 16 Mikroklonbank sollten cDNA-Sequenzen isoliert und charakterisiert werden, um geeignete cDNA-Sequenzen für den Gentransfer in Mäuse zu erhalten.
- II. In einer weiteren Phase sollte ein transgenes Tiermodell mit geeigneten cDNA-Sequenzen erzeugt und charakterisiert werden
- III. sowie deren Expression nachgeprüft werden.

Bei der hier bearbeiteten Mikroklonbank handelt es sich um eine mikroklonierte Genbank im c-terminalen Bereich von MMU 16, die in weiten Bereichen der Down-Syndrom-Region auf HSA 21 homolog ist.

Die Charakterisierung der Mikroklonbank (Seipp et al., 1990) ergab 49 single copy Mikroklone mit einer Größe von 100 bp bis maximal 250 bp.

Die Versuch wurde in folgenden Schritten durchgeführt:

1. Screening der cDNA-Bank (murine cDNA-Bank NIH3T3, Stratagene) mit diesen 49 Mikroklon-Inserts
2. Charakterisierung der isolierten cDNA-Sequenzen
3. Charakterisierung der Mikroklon-Inserts
  - Sequenzierung der Mikroklon-Inserts
  - Identifizierung der Mikroklon-Inserts in der Genbank (HUSAR)
  - Zurückkartierung der Mikroklon-Inserts an das Maus-Chromosom mittels in situ Hybridisierung

Die erhaltenen Klone wurden überwiegend über repetitive Sequenzanteile isoliert und waren somit keine "Kandidatengene" für die Erstellung teiltrisomer Mäusestämme. Die abschließende Sequenzanalyse der Mikroklonbank-Inserts bestätigte nochmals, daß die meisten Mikroklonbank-Inserts kaum längere kodierende Regionen beinhalten konnten, da sie überwiegend nur sehr kurze

ununterbrochene Leseraster von weniger als 40 bp aufwiesen, die nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit Exon-Sequenzen beinhalten konnten.

Einige der Mikroklon-Inserts wiesen Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Sequenzen auf. Ein Insert der Mikroklonbank-Inserts zeigte eine sehr hohe Homologie von fast 100 % Übereinstimmung und konnte mit Sicherheit als Teil eines retroviralen DNA-Fragments eines "Mouse intracisternal A-particle" identifiziert werden. Die homologen Regionen erstrecken sich hierbei über eine längere ununterbrochene Region.

Die Sequenzierungsergebnisse zeigten oft Übereinstimmungen von Mikroklon-Inserts zu repetitiven Sequenzelementen. Dieses Ergebnis wurde jetzt nochmals überprüft, nachdem bei der Analyse der Mikroklonbank-Sequenzen keine Homologien zu bekannten Sequenzen auf Chromosom 16 auftraten.

Da jeder einzelne Mikroklonbank-Insert zu klein für eine Kartierung mittels in situ Hybridisierung war, wurden alle 49 Mikroklon-Inserts zusammengepoolt.

Mit einer Größe über 100 bp ergibt sich eine "Regiongröße" von 49 x 100 bp, d. h. ca. 5.000 bp, die bei der in situ Hybridisierungsmethode eine ausreichende Signalstärke ergeben. Überraschenderweise ergab die in situ Hybridisierung ein Signal auf Chromosom 4 und nicht wie erwartet auf Chromosom 16.

Mit diesem Resultat konnte das Projekt nicht wie geplant weitergeführt werden. Mit Hilfe dieser Sequenzen konnte aus diesem Grund auch kein transgenes Tiermodell für das partielle Down-Syndrom erzeugt und charakterisiert werden.

#### *Charakterisierung transgener Tiere*

Anstelle der Charakterisierung der geplanten teiltrisomen, transgenen Tiere wurden Nachkommen der TTG-2a, TTG-2b und pRen-Tag-Mäuse, die bereits im Labor vorhanden waren, untersucht.

Die Untersuchungen wurden folgendermaßen durchgeführt:

1. Transgenitätsnachweis durch Southern-Blot und PCR
2. Expressionsnachweis der Pronukleus-injizierten Sequenzen bei verschiedenen Organen von transgenen Mäusen durch RT-PCR
3. Sublokalisierung der Pronukleus-injizierten Sequenzen auf den Chromosomen durch in situ Hybridisierung

Von den transgen-positiven, heterozygoten Nachkommen zeigten außer bei einem Tier aus der F0-Generation (TTG-2b), bei dem sich starke Lymphome gebildet hatten, keine weiteren Tiere Krankheitserscheinungen. Offen bleibt, ob bei homozygoten Tieren vielleicht durch starke Überexpression doch Leukämie verursacht wird.

Für den Transgenitätsnachweis bei der TTG-2a- und TTG-2b-Mäusen wurde die F1- Generation durch Southern-Blot getestet, die weiteren Nachkommen und die Nachkommen der pRen-Tag-Mäuse wurden durch PCR getestet.

Die ausgesuchten Primerpaare lagen in beiden (TTG-2a, TTG-2b) kodierenden Sequenzen. Aufgrund der ausgewählten Primersequenzen konnte der Transgenitätsnachweis sowohl bei den TTG-2a- als auch bei den TTG-2b-Nachkommen mit dem selben Primerpaar durchgeführt werden. Die Primersequenzen enthielten auch die Start- und Stopcodons des TTG-2-Gens und erlaubten eine Amplifikation der gesamten kodierenden cDNA-Sequenz. Die Gefahr, daß das

endogene Maus-TTG-2-Gen amplifiziert wird, wurde hier aus folgenden Gründen ausgeschlossen.

Das ausgesuchte Primerpaar lag bei den pRen-Tag-Mäusen im SV40-spezifischen Anteil und ist deshalb spezifisch für das Transgen-Konstrukt (PCR-Amplifikat 500 kb).

Die untersuchten pRen-Tag-Mäuse waren hinsichtlich Transgenität negativ und somit für eine weitere Charakterisierung nicht geeignet.

Für den Expressionsnachweis bei TTG-2a und TTG-2b transgenen Mäusen wurde die gesamte RNA aus verschiedenen Maus-Organen wie Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Milz, Nieren und Thymus isoliert und die TTG-2-Expression über RT-PCR nachgeprüft.

Die RT-PCR-Untersuchung lieferte folgende mRNA-Expressionsnachweise:

Bei TTG-2a: Lunge und Leber

Bei TTG-2b: Milz, Thymus und Herz

Die Expression sowohl von TTG-2a als auch von TTG-2b in den wenigen untersuchten Gewebearten zeigte deutlich, daß das Transgen noch intakt war und die entsprechenden mRNAs transkribiert wurden. Inwieweit die Transkription gewebespezifisch variiert, müßte in weiteren Versuchen abgeklärt werden.

Für die Sublokalisierung der Pronukleus-injizierten Sequenzen (TTG-2a/TTG-2b) auf den transgenen Maus-Chromosomen wurden Metaphasen-Chromosomen durch Milzkultur gewonnen. Bei den TTG2a- und TTG2b-Plasmiden wurden an den Chromosomen in situ Hybridisierung durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde auch die in situ Hybridisierung an normalen Maus-Chromosomen durchgeführt.

Die Sublokalisierung von TTG-2a auf dem Chromosom 9 und von TTG-2b auf Chromosom 4 konnte nachgewiesen werden.

Die beiden Plasmide TTG-2a und TTG-2b zeigten keine Signale an den nicht transgenen Maus-Chromosomen. Somit war nachgewiesen, daß das Maus- endogene TTG-2-Gen bei der weiteren in situ Hybridisierung keine Probleme durch Kreuzhybridisierung machen sollte. Die Hybridisierungsprobe erkennt folglich spezifisch das menschliche TTG-2-Gen des Konstrukts.

Nach der in situ Hybridisierung wurde unter den transgenen TTG-2b-Tieren festgestellt, daß homozygote Tiere vorhanden waren. Dies bedeutete, daß der Aufbau einer stabilen, homozygoten, transgenen Tierlinie durch Verpaarung erfolgreich durchgeführt wurde. Dieses Resultat lieferte darüberhinaus die Erkenntnis, daß die homozygoten, transgenen TTG-2b-Tiere lebensfähig waren.

In Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Bachmann (Uni Berlin) und Herrn Dr. Michael Bader (MDC Berlin) haben wir das pRen-Tag-Konstrukt (Februar 1997) erhalten, um transgene Mäuse zu erzeugen.

Die Mikroinjektion und der Mikrotransfer ist ein technisch, zeitlich und ökonomisch aufwendiges Verfahren. Man kann davon ausgehen, daß die in dieser Arbeit geschilderten Schwierigkeiten, wie z. B. hohe Absterberate, die geringe Geburtenrate, die Degeneration der entnommenen Oozyten während der Mikroinjektion, der Fehltransfer der injizierten Oozyten durch die im Laufe der Zeit hinzu gewonnenen Erkenntnisse verringert werden.

Es konnten nicht alle injizierte Oozyten in die Empfängermaus transferiert werden, weil manche Oozyten degeneriert sind. Nur 10 % der injizierten Oozyten konnten für den Transfer benutzt werden, wobei jedoch nicht alle transferierten Oozyten sich zu Embryos weiter entwickelten. Letztlich konnte kein transgenes Foundertier nachgewiesen werden.