

Desi Wisdhajanti Soegiarto

Dipl. Biol.

## **Vitamin-D-Rezeptor defiziente Mäuse als Modell für die Vitamin-D-abhängige Rachitis Typ II**

Geboren am 27.12.1965

Reifeprüfung am 28.04.1984

Studiengang der Fachrichtung Biologie vom WS 1986/87 bis SS 1993

Vordiplom am 25.01.1989 an der Universität Heidelberg

Diplom am 27.05.1993 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Humangenetik

Doktorvater: Prof. Dr. Werner Buselmaier

In dieser Dissertationsarbeit wurde eine Mausmutante (VDR<sup>tmNeu1</sup>-Mäuse) mit inaktiviertem Vitamin-D-Rezeptor (VDR)-Gen erstellt. Das VDR-Gen der Maus wurde aus der Genbibliothek der 129/SvJ-Maus-DNA in  $\lambda$ -DASHII unter Verwendung der ersten zwei kodierenden Exons des VDR-Gens als Sonden isoliert. Das VDR-Gen wurde mittels homologer Rekombination zwischen dem endogenen Gen und einem Targeting-Vektor ausgeschaltet. Die Sequenzen 5' (6 kb lang) und 3' (2,7 kb lang) vom erstkodierenden Exon 2, welches die erste Zinkfingerregion der DNA-Bindungsdomäne kodiert, wurden für die Stellen der homologen Rekombination verwendet. Wie viele andere Steroidrezeptorgene wird das VDR-Gen in bestimmten Geweben und zu einem bestimmten Zeitpunkt nur schwach exprimiert. Die Expression des Gens läßt sich deswegen schwer detektieren. Der Einbau der bakteriellen *lacZ*-Kassette in das Konstrukt ermöglichte eine sensitivere Methode für die Expressionsanalyse des VDR-Gens. Die *lacZ*-Kassette wurde mit den ersten drei Aminosäuren des Exons 2 des VDR-Gens fusioniert, so daß das Reporter gen unter Regulation des endogenen Promotors und unter Verwendung des endogenen Startcodons des VDR-Gens exprimiert wurde. Der Targeting-Vektor wurde mit einer Neomycinphosphotransferase (*neo*)-Kassette für die positive und einem Herpes-simplex-Thymidinkinase (*HSV-tk*)-Gen für die negative Selektion der homologen Rekombination ausgestattet. Der linearisierte Vektor wurde durch Elektroporation in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Maus der Linie R1 bzw. E14 eingeschleust. Die Integration des Vektors wurde mit dem positiven Selektionsmetabolit G418 (Geneticin) und dem negativen Selektionsmetabolit Gancyclovir (GANC) selektioniert. Die homologe Rekombination wurde mittels Southern-Blot-Hybridisierung 5' und 3' von der Integrationsstelle überprüft. Bei der Transfektion des Vektors in die ES-Zellen der R1-Linie ergaben sich acht positive Klone von insgesamt 288 selektierten Klonen, während sich bei der Elektroporation

des Vektors in die E14 ES-Zelllinie nur ein Klon von 187 selektierten als positiv erwies. Zur Erstellung der chimären Mäuse wurden die positiven ES-Klone mit Morulae des Mausstammes CD1 aggregiert. Die Embryonen trugen scheinträchtige Mäuse, in deren Uteri die Embryonen transferiert wurden. Durch Verpaaren mit Mäusen des Stammes CD1 wurde anhand der Fellfarbe die Keimbahntransmission der chimären Mäuse getestet. Nur bei den chimären Mäusen aus dem Klon der E14 ES-Zelllinie wurde die Mutation an die Nachkommen weitergegeben. Für die Züchtung der Mausmutante wurden die Chimären mit den Mäusen des Stammes C57BL/6 verpaart und die Nachkommen mittels Southern-Blot-Hybridisierung genotypisiert. Homozygote Tiere wurden durch Verpaaren von heterozygoten Mäusen erhalten.

Durch den Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität konnte die breite Expression des VDR analysiert werden. Die Expression des VDR ist bereits am Tag 10,5 pc zu detektieren und persistiert während der embryonalen Entwicklung bis zum adulten Zustand. Nicht nur in den klassischen Zielorganen des  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , wie Knochen und Niere, und in der Nebenschilddrüse konnte die Expression des VDR nachgewiesen werden, sondern auch in Geweben, die nicht direkt in die Kalziumhomöostase involviert sind, z.B. im Pankreas, in der Leber, in den Reproduktionsorganen, im Zentralnervensystem und im Herz. Trotz der breiten Expression des VDR während der embryonalen Entwicklung haben  $\text{VDR}^{\text{tmNeu1}}$ -Mäuse nach der Geburt keinen Phänotyp. Die heterozygoten (+/-) Mäuse zeigen selbst im Alter von zwölf Monaten keine phänotypischen Veränderungen. Bis zum Absetzen vom Muttertier lassen sich die homozygoten (-/-) Mäuse von den Wildtyp (+/+) und +/- Mäusen nicht unterscheiden. Weibliche und männliche +/- und -/- Mäuse sind fertil und können miteinander verpaart werden. Die Phänotypen der -/- Nachkommen eines -/- Muttertieres sind stärker ausgeprägt als bei -/- Mäusen einer +/- Mutter. Das Alter der +/- und -/- Mäuse wird durch die Inaktivierung des VDR nicht beeinträchtigt, jedoch starben ein paar -/- Mäuse frühzeitig (im Alter von sechs Monaten). Bereits eine Woche nach dem Absetzen vom Muttertier lassen sich die Phänotypen der -/- Mäuse erkennen. Die -/- Mäuse entwickeln Alopezie und einen sekundären Hyperparathyreoidismus. Durch die Messung des Gesamtkalziumgehalts im Serum wird eine Hypokalzämie festgestellt, die jedoch nicht bei allen -/- Tieren vorliegt. Die -/- Mäuse zeigen typische Veränderungen am Knochen. Das Skelett der -/- Mäuse erscheint auf dem Röntgenbild als Folge einer Knochenmineralisationsstörung transparenter als das der +/+ oder der +/- Mäuse. Durch die Ossifikationsstörung wird das Längenwachstum des Knochens gestört. Die Mineralisationsstörung führt im Epiphysenfugenbereich zu Erweiterungen, die an den Rippen als rachitischer Rosenkranz bezeichnet werden. Zahlreiche Pseudofrakturen, sog. Looser-Umbauzonen, sind z.B. an den Rippen zu finden. Somit zeigen -/-  $\text{VDR}^{\text{tmNeu1}}$ -Mäuse Phänotypen, die den Symptomen der VDDR Typ II-Patienten entsprechen. Die  $\text{VDR}^{\text{tmNeu1}}$ -Mausmutante soll als Tiermodell für die Untersuchung dienen, um neue Expressionsdomänen des VDR zu finden und um sowohl die genomischen als auch die nicht-genomischen

Wirkungen des Vitamin D<sub>3</sub> in den sowohl klassischen als auch nicht-klassischen Zielorganen zu klären.