

Jana Höckner
Dr. med.

Generation And Characterization Of Transgenic Mice That Express A CreERT2 Fusion Protein Specifically In Megakaryocytes And Platelets

Promotionsfach: Pharmakologie

Doktormutter: Priv.-Doz. Dr. med. N. Wettschureck

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung und Analyse eines transgenen Mausstamms, der spezifisch in Thrombozyten und Megakaryozyten ein Tamoxifen induzierbares CreERT2-Fusionsprotein exprimiert. Für die Generierung dieser Mauslinie wurde der murine BAC-Klon RP24-98A4, welcher die regulatorischen Sequenzen des Plättchenfaktor 4 (PF4) Promotors sowie das PF4-Gen enthält, verwendet. Dieser BAC-Klon wurde mittels RedE/T vermittelter homologer Rekombination so modifiziert, dass die Sequenz vom ATG des Exon 1 bis zum siebzigsten Basenpaar von Exon 2 des PF4-Gens mit der CreERT2 cDNA ersetzt wurde. Durch die Injektion des modifizierten BAC in die Pronuklei befruchteter Mausoozyten konnten 8 transgene *PF4-CreERT2^{+/-}* Mäuse erzeugt werden. Die Transgenexpression in den *PF4-CreERT2^{+/-}* Mäusen wurde nach Verpaarung dieser mit *ROSA26-LacZ^{fl/wt}* and *ROSA26-mTOM/mEGFP^{fl/wt}* Reporterstämmen untersucht. Die höchste Rekombinationseffizienz wurde beim Founder #45 gefunden. Bei diesem zeigten ca. 60 % der peripheren Thrombozyten den rekombinierten Phänotyp nach Induktion mit Tamoxifen in beiden Reportersystemen. Um diese Befunde weiter zu untermauern, wurden die *PF4-CreERT2^{+/-}* Founder mit *ITG-β1^{fl/fl}* Mäusen verpaart. In diesem Modell zeigten 70 % der Thrombozyten des Founder #45 den rekombinierten Phänotyp, während keine Veränderungen der Integrin-β1 Expression (*ITG-β1*) auf Granulozyten, Monozyten, B- und T-Lymphozyten beobachtet wurden. Der CreERT2 Rekombinationseffekt war nicht nur Megakaryozyten-spezifisch induzierbar, sondern auch vollständig reversibel ist. Die gesamte Thrombozytenpopulation mit dem rekombinierten Phänotyp wurde innerhalb von 15 Tagen nach Ende der Tamoxifenbehandlung mit einer Wildtyp-Thrombozytenpopulation ersetzt. Die Reversibilität unterstreicht, dass die CreERT2 vermittelte Rekombination nur in Linien-determinierten Megakaryozyten, nicht aber in Stammzellen stattfindet. Mit den *ROSA26-mTOM/mEGFP^{fl/wt}* und *ITG-β1^{fl/fl}* Modellen konnten wir flusszytometrisch Thrombozyten mit einem intermediären Phänotyp identifizieren (Koexpression von mTomato und mEGFP bzw. schwache Expression von *ITG-β1*). Dieses Phänomen spricht für eine partielle Rekombination, welche auf einer Ineffizienz der CreERT2-Rekombinase beruht, alle mit loxP-Seiten flankierten Allele in polyploiden Megakaryozyten von *PF4-CreERT2^{+/-} x ROSA26-mTOM/mEGFP^{fl/wt}* und *PF4-CreERT2^{+/-} x ITG-β1^{fl/fl}* Mäusen auszuschneiden.

Die Rekombinationseffizienz in unserer Tamoxifen-induzierbaren Thrombozyten spezifischen Cre-Mauslinie ist mit einem Maximum von 60 – 70 % geringer als in der nicht-induzierbaren PF4-Rsko-Cre-Mauslinie. Die Induzierbarkeit unseres Mausmodells bietet jedoch das Potential, dass letale embryonale Hämostasestörungen verhindert werden können. Darüber hinaus erlaubt die inkomplette Rekombination die Effekte des rekombinierten Phänotyps auf die Thrombozytenfunktion sowie die Megakaryo- und Thrombozytopoiese im direkten Vergleich mit dem wildtypischen Phänotyp innerhalb eines Individuums zu untersuchen. Dieser intra-individuelle Vergleich schließt die Störgrößen der inter-individuellen Variabilität aus. Weiterhin ermöglicht die Induzierbarkeit und die Reversibilität (1.) die Rolle eines bestimmten Phänotyps der Thrombozyten in Abhängigkeit vom Alter der Tiere oder eines Krankheitsstadiums zu untersuchen sowie (2.) die Differenzierung von jungen und alten Thrombozyten. Da die Tamoxifen-induzierte Rekombination in

Megakaryozyten stattfindet, ist der Rekombinationseffekt initial nur in neu gebildeten, jungen Thrombozyten beobachtbar. Andererseits, können Thrombozyten die 12 Tage nach Absetzen von Tamoxifen noch den rekombinierten Phänotyp zeigen als alt betrachtet werden. Damit kann mit unserem Mausmodell der Zusammenhang zwischen Alter und Größe sowie Alter und Funktion der Thrombozyten untersucht werden.

Mittels Analyse des Vorwärts-Streulichts als Maß für die Größe eines Thrombozyten konnten wir zeigen, dass junge Thrombozyten signifikant größer waren als Thrombozyten heterogenen Alters. Dagegen waren alte Thrombozyten signifikant kleiner als Thrombozyten heterogenen Alters. Aufgrund der starken Überlappung der Vorwärts-Streulicht-Verteilungen von jungen und alten Thrombozyten mit der Vorwärts-Streulicht-Verteilung einer Thrombozytenpopulation heterogenen Alters, ist die Thrombozytengröße weder ein trennscharfes noch ein empfindliches Maß für das Alter eines Thrombozyten. Weiterhin zeigte der Vergleich der Thrombozyten-Verteilungs-Breite (PDW - **platelet distribution width**) im Vorwärts-Streulicht von jungen und alten Thrombozyten mit einer Thrombozytenpopulation heterogenen Alters zeigen keinen Unterschied. Dies spricht dafür, dass die Heterogenität der Thrombozytengröße ein Resultat der Thrombozytopoiese und nicht der Thrombozytenreifung in der Blutzirkulation ist.

Um die Thrombozytenfunktion in Abhängigkeit vom Alter zu untersuchen, bestimmten wir die P-selektin Expression nach Stimulation mit U46619 bei jungen und alten Thrombozyten mittels Flusszytometrie. Die Fraktion der P-selektin positiven Thrombozyten war nach Stimulation mit U46619 in der jungen Thrombozytenpopulation kleiner als in der Thrombozytenpopulation heterogenen Alters (22 % vs. 48 %). Dagegen bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den P-selektin positiven Fraktionen von alten Thrombozyten (74 %) und der Thrombozytenpopulation heterogenen Alters (78 %). Demnach sind junge Thrombozyten in Bezug auf ihre Sekretionsantwort weniger reaktiv als eine Thrombozytenpopulation heterogenen Alters, und alte Thrombozyten unterscheiden sich bezüglich ihrer Sekretionsantwort nach U46619 Stimulation nicht von einer Thrombozytenpopulation heterogenen Alters.

Unsere *PF4-CreERT2^{+/-}* Mauslinie bietet ein neues Modell zur Untersuchung altersabhängiger Veränderungen der Größe und Funktion von Thrombozyten. Zusätzlich bietet unser Modell durch die Verpaarung mit Reportermausen, wie z.B. der *ROSA26-mTOM/mEGFP^{fl/wt}* Maus, die Möglichkeit die Funktion der Thrombozyten in Thrombose, Hämostase und Atherothrombose in einer altersabhängigen Weise in-vivo zu untersuchen.