

Maren Gruner
Dr. med.

Funktionelle Charakterisierung eines neuen Mausmodells für die konditionale Genexpression in der Lunge

Promotionsfach: Kinderheilkunde
Doktorvater: Prof. Dr. med. M. A. Mall

Inhalt dieser Arbeit war die funktionelle Untersuchung sowie der Vergleich von zwei neuen Aktivatormauslinien zur induzierbaren gewebespezifischen Überexpression von Transgenen in der Lunge. Die induzierbare Überexpression wurde durch den lungenspezifischen Promotor CCSP und das Tet-on System erreicht. In das Genom der Mäuse wurde ein transgenes Konstrukt integriert, in dem der optimierte reverse Transaktivator $rtTA2^S$ -M2 unter der Kontrolle des lungenspezifischen CCSP-Promotors aus der Ratte synthetisiert wird.

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, die Möglichkeit der Geninduktion zu testen. Dazu wurden die beiden CCSP- $rtTA2^S$ -M2-Aktivatorlinien (76 und 38) mit der Reporterlinie LC-1 verpaart, welche sowohl Luciferase als auch Cre-Rekombinase unter Kontrolle von Tet-Operatorsequenzen exprimiert. Wir untersuchten nach Doxgabe die Luciferaseaktivität in Lungenhomogenaten von neugeborenen und adulten Mäusen beider Linien im Vergleich zu Wt- und LC-1-Geschwistertieren. Sowohl die CCSP- $rtTA2^S$ -M2/LC-1-doppeltransgenen Neugeborenen als auch die erwachsenen Mäuse beider Linien zeigten sehr hohe Luciferaseaktivität in ihren Lungen, während die Kontrolltiere sowie nicht induzierte doppeltransgene Mäuse beider Linien keine Luciferaseaktivität aufwiesen. Somit konnten wir eine starke doxabhängige Geninduktion nachweisen und ein Leck ausschließen. Entsprechend der zeitabhängigen CCSP-Promotoraktivität und dem Expressionsmuster des endogenen CCSP zeigten Neugeborene beider Linien vielfach höhere Genexpression als adulte Tiere. Anschließend untersuchten wir die Geschwindigkeit der Induktion, die Dosis-Wirkungsbeziehung, den maximalen Induktionslevel und die Reversibilität der Genexpression. Schon nach 24 h stellten wir in beiden Linien eine fast maximale Genexpression fest. Die Maximalwerte der Genexpression waren in beiden Linien nahezu gleich. Nach 7-tägiger Doxbehandlung mit anschließendem 7-tägigem Doxentzug war die Reportergenaktivität bereits unter 8% der ursprünglichen Aktivität, während nach 21-tägigem Doxentzug in beiden Linien keine Aktivität mehr nachweisbar war.

Die Lungenspezifität wiesen wir durch Untersuchung von Luciferaseaktivität in Homogenaten verschiedener Organe sowie durch Biolumineszenzmessungen in vivo nach. In induzierten doppeltransgenen Tieren beider Linien zeigte kein anderes Organ als die Lunge Luciferaseaktivität. Mittels Immunhistochemie und vergleichender Morphometrie konnten wir zeigen, dass die Genexpression in Linie 76 weitgehend atemwegsspezifisch ist, während sie sich in Linie 38 in den Alveolen signifikant stärker darstellt.

Der $rtTA2^S$ -M2 weist in vitro eine 10-fach höhere Doxsensitivität als der ursprüngliche $rtTA$ auf. Auch in unseren CCSP- $rtTA2^S$ -M2-Aktivatorlinien 76 und 38 konnten wir eine größere Sensitivität gegenüber Dox feststellen als in früheren $rtTA$ -Mäusen. So wird man Effekte von quantitativen Schwankungen von Genexpression breitflächig und fein reguliert untersuchen können.

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Arbeit zwei neue lungenspezifische CCSP- $rtTA2^S$ -M2-Aktivatorlinien charakterisiert, die eine äußerst schnelle Induzierbarkeit sowie vollständige Reversibilität aufweisen. Zudem wird die Transgenexpression in den Lungen der beiden Linien in unterschiedlichen Zelltypen (Atemwege versus Alveolen) reguliert, was

einen größeren Einsatzbereich der beiden Linien in zukünftigen Lungenuntersuchungen bietet.