

Katharina Heinzle

Dr. med.

## **Charakterisierung einer tetrazyklininduzierbaren Mauslinie mit einer zeitlich und örtlich gerichteten Regulation der Überexpression der $\beta$ -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals zur Nachahmung chronischer Lungenerkrankungen wie der Mukoviszidose**

Promotionsfach: Kinderheilkunde

Doktorvater: Prof. Dr. med. Marcus A. Mall

Mukoviszidose ist die häufigste hereditäre Erkrankung in der kaukasischen Bevölkerung. Durch einen Defekt im „Cystic fibrosis conductance regulator protein“ (CFTR) ist der epitheliale  $\text{Cl}^-$ -Transport und die Regulation anderer Kanäle wie dem epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanal (ENaC) gestört. Dies führt in der Lunge zu einer verminderten  $\text{Cl}^-$ -Sekretion, einer erhöhten  $\text{Na}^+$ -Rückresorption und somit zu einer verminderten bronchialen Flüssigkeitsmenge. Die Höhe des Atemwegsoberflächenfilms (AOF), der zur Bewegung der Zilien nötig ist, ist reduziert und somit die mukoziliäre Clearance eingeschränkt. Die Patienten leiden folglich unter einer Mukusobstruktion und rezidivierenden Infekten.

Die lungenspezifische Überexpression von  $\beta\text{ENaC}$  führt zu einer Mukoviszidose-ähnlichen Lungenerkrankung mit verminderter Höhe des AOF, Mukusobstruktion und neutrophiler Inflammation, ist jedoch aufgrund fehlender Regulierbarkeit der Ausprägung des Phänotyps und dem frühen Krankheitsbeginn in gewissen Punkten in der weiteren Erforschung der CF-Lungenerkrankung eingeschränkt. Um die  $\beta\text{ENaC}$ -Expression quantitativ und zeitlich steuern zu können, wurde ein neues Mausmodell entwickelt, das mittels tetrazyklinabhängiger Induktion die Genexpression regulieren kann. Hierbei wird durch Gabe von Doxyzyklin der reverse Transaktivator  $\text{rtTA}2^{\text{s}}\text{-M2}$  lungenspezifisch exprimiert.  $\text{rtTA}2^{\text{s}}\text{-M2}$  bindet an das Tetrazyklin-responsive Element (TRE), wodurch über Promotoren die Transgenexpression aktiviert wird. Als Aktivatorlinie steht die strikt doxyzyklinabhängige und gut induzierbare CCSP- $\text{rtTA}2^{\text{s}}\text{-M2}$  Mauslinie zur Verfügung. Durch pronukleäre Induktion wurden mehrere Respondermäuse mit dem bidirektionalen Transgenkonstrukt Luciferase-TRE- $\beta\text{ENaC}$  generiert, das die Transkription von Luciferase und  $\beta\text{ENaC}$  erlauben soll. Von diesen Tieren wies eine Linie in Voruntersuchungen eine starke Induzierbarkeit über mehrere Generationen

auf. Zur Charakterisierung dieser Linie wurden Mäuse unterschiedlichen Alters auf Expressionsaktivität und deren funktionalen Auswirkungen getestet.

Neugeborene Mäuse zeigten bis auf wenige Ausnahmen eine sehr geringe Transgenaktivität. Eine frühe Induktion mit Doxyzyklin bereits in utero zeigte in 5 Tage alten Mäusen eine hohe Variabilität in den Messungen der Luciferaseaktivität im Lungengewebe, jedoch keine Erhöhung der mRNA-Expression von  $\beta$ ENaC im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Elektrophysiologische Messungen von Trachealgewebe in der Ussingkammer ergaben ebenfalls sehr unterschiedliche Erhöhungen des Basalstroms und des Amilorid-hemmbareren Stroms im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren, die im Vergleich zu CCSP- $\beta$ ENaC überexprimierenden Mäusen wesentlich geringer waren. Auch mittels Immunhistochemie konnte nur teilweise ein erhöhter  $\beta$ ENaC-Proteingehalt in den Atemwegsepithel- und Clarazellen nachgewiesen werden. Die Untersuchung juveniler Mäuse, die ab Verpaarungsbeginn der Elterntiere mit Doxyzyklin induziert wurden, zeigte ebenfalls eine hohe Variabilität in der Luciferaseaktivität in doppeltransgenen Mäusen. Ein durch erhöhte  $\beta$ ENaC-Expression induzierter Lungenphänotyp mit Mukusobstruktion, neutrophiler Inflammation und Emphysembildung konnte nicht nachgewiesen werden. Zur Untersuchung der Möglichkeit einer späten Induktion wurde erwachsenen Tieren über 2 Wochen Doxyzyklin verabreicht. Luciferasemessungen zeigten erneut eine hohe Variabilität. Elektrophysiologische Messungen zeigten keinen eindeutigen Unterschied zu Wildtyp-Tieren. Aufgrund der Inkonsistenz der Messwerte und der mangelnden  $\beta$ ENaC-Überexpression, gehen wir von einer Teilinaktivierung des Genkonstruktes Luciferase-TRE- $\beta$ ENaC in der Respondermaus aus. Als Ursache hierfür kann eine Inaktivierung durch epigenetische Veränderungen, eine Transgenregulation durch benachbarte Regionen des Integrationsortes, eine unzureichende Anzahl an integrierten Transgenkonstrukten bzw. ein Transgenverlust durch Segregation diskutiert werden. Sequenzfehler im Transgenkonstrukt konnten ausgeschlossen werden.

Dieses Mausmodell eignet sich aufgrund der fehlenden zuverlässigen Induzierbarkeit nicht für eine weitere Untersuchung der CF-Lungenerkrankung. Die Analysen könnten jedoch in Zukunft zum Vergleich für neu generierte Respondermäuse und als mögliches Screeningmodell dienen.