

Dominik Maximilian Vogt
Dr. med.

TMEM2 – Konstruktion von Targetingvektoren zur subzellulären Lokalisation und Bedeutung hinsichtlich der CCl₄-induzierten Leberfibrose in der Maus

Promotionsfach: Pharmakologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Marc Freichel

Das Protein TMEM2 kann phylogenetisch der TRP-Kanal-Familie zugeordnet werden. Die größte Ähnlichkeit besteht zu den TRPML-Kanälen, deren Vertreter TRPML1 in Lysosomen als Kalzium- und Eisen-Kanal dient. Eine Expression von TMEM2 konnte auf RNA-Ebene in Aorta-Endothelzellen, Colon, Herz, Hirn, Lunge, Niere, Plazenta und Leber nachgewiesen werden. Subzelluläre Lokalisation und Funktion sind dabei bislang noch ungeklärt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei klassische Gtargetingvektoren kloniert. Diese sollten es ermöglichen, über eine homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) transgene Mausmodelle zu generieren, in denen TMEM2 unter Kontrolle des endogenen Promotors in C-terminaler in frame Fusion mit einem Fluoreszenzprotein exprimiert wird. Diese böten ausgehend von stabil modifizierten Primärzellen die Möglichkeit einer direkten mikroskopischen Beobachtung des Proteins TMEM2 unter Basal- wie auch Stimulationsbedingungen. Daneben wären auch eine visuelle Kolo-kalisation mit anderen fluoreszenzmarkierten Zellbestandteilen sowie eine Untersuchung deren Interaktion mittels Messung des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) denkbar.

Die beiden nahezu identischen Vektoren unterscheiden sich vornehmlich durch das gewählte Fluoreszenzprotein. Während eYFP bereits vielfach erfolgreich als Fusionsprotein mit hohen Helligkeitswerten und einer guten Stabilität verwendet wurde, handelt es sich bei TagRFP-T um ein relativ neues, jedoch vielversprechendes Protein, welches die Vorteile des langwelligeren Anregungsspektrums bietet. Die Konstrukte beinhalten neben der Sequenz des jeweiligen Fluoreszenzproteins ein Neomycinresistenzgen, welches der Positivselektion in einer embryonalen Stammzellkultur dient sowie eine Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des in der männlichen Keimbahn aktiven Promotors des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE). Neomycinresistenz und Cre-Rekombinase sind wiederum loxP-flankiert, sodass sie in der männlichen Keimbahn deletiert werden sollten. Weiterhin findet sich 3' des Fusionsproteins die 3'-UTR des β -Globin-Gens des Kaninchens, welche im Rahmen der Proteinbiosynthese die mRNA stabilisiert. Die an Stelle des endogenen Stop-Codons von TMEM2 in das murine Genom zu integrierenden Transgene werden von zwei homologen Armen von je circa 5000 bp Länge umschlossen und ermöglichen so eine Rekombination am gewünschten Locus. Zur Durchführung einer Negativselektion in ES-Zell-Kultur wurden außerhalb der homologen Bereiche die kodierenden Sequenzen von Diphtherietoxin A, eGFP und Thymidinkinase kloniert. Um in ES-Zellen sowie in murinem Gewebe die korrekte Integration der Transgene mittels Southern-Blot-Analyse überprüfen zu können, wurden durch PCR aus ES-Zell-DNA entsprechende 5'- sowie 3'-Sonden hergestellt, welche im Test in Wildtyp-DNA spezifische Signale bei geringem Hintergrund lieferten. Neben der

Unterscheidung von Wildtyp und Mutante sollte mit der entworfenen Strategie auch der Nachweis der Exzision des Neomycinresistenzgens gelingen.

Wie bereits erwähnt, findet eine Expression von TMEM2 auch in murinen Hepatozyten statt. In einer Pilotstudie unserer Arbeitsgruppe zur hepatischen Fibrogenese TMEM2-defizienter Mäuse in einem CCl₄-Leberfibrosemodell zeigten sich bei einer histologischen Analyse mit Hilfe eines semiquantitativen Scores Hinweise auf eine im Vergleich zum Wildtyp verminderte Fibrosierung. Den Mäusen wurden hierbei zweimal wöchentlich 0,7 ml CCl₄ pro kg Körpergewicht, gelöst in Mineralöl, über eine Gesamtdauer von 6 Wochen intraperitoneal injiziert. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte dieses Ergebnis mit einer größeren Tierzahl und unter Einführung eines objektiveren Messverfahrens überprüft werden. Für die Quantifizierung der Fibroseausprägung wurde hierfür in unserer Arbeitsgruppe die computergestützte Vermessung des Flächenanteils der mittels Sirius Red spezifisch angefärbten Kollagenfasern am Gesamtlebergewebe etabliert. Dabei wurde das AutMess-Modul des Programms AxioVision verwendet. Dieses Verfahren bietet gegenüber den semiquantitativen Scores die Vorteile einer größeren Objektivität und einer einfacheren statistischen Auswertbarkeit. Gleichzeitig zeigte es sich relativ anfällig für Störfaktoren, welche, wie beispielsweise die Einwirkzeit der Färbelösung oder die Einstellungen des Mikroskops, die Farbintensität der ausgemessenen Schnitte beeinflussen. Bei der Durchführung der Tierversuche bestand zunächst das Problem einer Sterblichkeit der Versuchstiere von bis zu 60 % der Wildtypen und bis zu 71 % der TMEM2-Knock-outs unter der Behandlung mit 0,7 ml CCl₄ pro kg Körpergewicht über 6 Wochen, entsprechend dem von unserem Kooperationspartner angewandten und aus der Literatur bekannten Protokoll. In einer parallel mitgeführten Kontrollgruppe, welcher nur die Trägersubstanz Mineralöl injiziert wurde, überlebten alle Tiere. Es erfolgte eine Reduzierung der verabreichten CCl₄-Einzeldosis auf 0,5 ml/kg, woraufhin keine weiteren Todesfälle während der Induktion auftraten. Letztlich fand sich mit dieser reduzierten Dosis weder bei einer Behandlungsdauer von 6 Wochen noch von 9 Wochen ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der untersuchten Größen Hydroxyprolinegehalt, Anstieg der Alanin-Aminotransferase (ALT), relativem Lebergewicht und Anteil kollagener Fasern am Gesamtlebergewebe. Dementsprechend waren die Werte für Albumin, Bilirubin, Cholinesterase und ALT im Serum unbehandelter Tiere ebenfalls nicht signifikant verschieden. Ein Vergleich der unterschiedlichen Induktionsprotokolle erbrachte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des erreichten hepatischen Fibrosierungsgrades bei Wildtypen. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass eine für belastbare Aussagen ausreichende Leberfibrose in Mäusen des Inzuchtstamms C57Bl/6N, beziehungsweise gendefizienten Mauslinien auf diesem genetischen Hintergrund, bereits mit einer CCl₄-Dosis von 0,5 ml/kg verabreicht über einen Zeitraum von 6 Wochen zu erreichen ist. Diese Dosis scheint dabei für die Versuchstiere verträglicher zu sein.