

Aus dem Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung,
Bad Nauheim

**Gleichzeitige Fluoreszenz-Markierung multipler
Zelltypen zur Untersuchung der
Lungenentwicklung und –regeneration**

Inauguraldissertation

im Fachbereich Biologie und Chemie
an der Justus-Liebig-Universität Gießen
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Nicola Kuse

M.Sc. Biologie
aus Münster

Gießen 2014

Dekan:

Prof. Dr. Holger Zorn

Erstgutachter:

Prof. Dr. Adriaan Dorresteijn
Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Zweitgutachter:

Prof. Dr. med. Werner Seeger
Medizinische Klinik und Poliklinik II
Justus-Liebig-Universität Gießen

Für meine Familie

*Die Kunst ist, einmal mehr aufzustehen,
als man umgeworfen wird.*

(Winston Churchill)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung.....	10
1.1 Erkrankungen der Lunge.....	10
1.1.1 Chronisch obstruktive pulmonale Erkrankung (COPD)	11
1.1.2 Fibrotische Erkrankungen	12
1.1.3 Vermutete Ursachen und molekulare Grundlagen der IPF	13
1.1.4 Pulmonale Hypertonie	13
1.1.5 Ursachen der PAH	14
1.2 Fibrozyten.....	15
1.2.1 Die Rolle der Fibrozyten in Lungenerkrankungen.....	15
1.3 Lineage Tracing.....	16
1.3.1 Genetisches „Tracing“	17
1.3.1.1 Genetische Rekombination	17
1.3.1.2 Die Generierung transgener Mäuse	19
1.3.1.3 Temporäre Regulierung des <i>Lineage Tracing</i>	20
1.3.1.4 <i>Lineage Tracing</i> mit Vielfarben-Reportern.....	21
1.3.1.5 Charakterisierung der Zellfunktion durch gezielte Eliminierung	24
1.4 Konzepte zur Charakterisierung und Visualisierung verschiedener Zelltypen in der Lunge	25
1.4.1 LungGlow 1 – Die Detektion dreier Zelltypen in der Lunge.....	25
1.4.1.1 Ziel von LungGlow 1	25
1.4.1.2 Das Konzept von LungGlow 1	25
1.4.2 HSV-TK – Charakterisierung der Fibrozyten durch gezielte Eliminierung	26
1.4.2.1 Das Ziel des HSV-TK Projektes	26
1.4.3 LungGlow 2 – Dynamische Visualisierung von Trans-Differenzierungsprozessen	27
1.4.3.1 Das Ziel des LungGlow 2 Projektes	27
1.4.3.2 Das Konzept von LungGlow 2	27
2 Material und Methoden	30
2.1 Materialien	30
2.1.1 Geräte.....	30
2.1.2 Chemikalien	32
2.1.3 Laborbedarfsartikel	33
2.1.4 Zellkultur	35

2.1.4.1	Allgemeine Medien und Lösungszusätze für die Zellkultur	35
2.1.4.2	Verwendete Zelltypen und Kulturmedien.....	36
2.1.5	Molekularbiologie	38
2.1.5.1	Reagenzien, Kits, Standards und Enzyme für die Molekularbiologie.....	38
2.1.5.2	Medien, Puffer, Zusätze und Materialien für die Molekularbiologie	39
2.1.6	Histologie	40
2.1.7	Proteinbiochemie	41
2.1.8	Mauslinien.....	42
2.2	Methoden	43
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	43
2.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion	43
2.2.1.2	Plasmid-DNA Präparation.....	43
2.2.1.3	Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	44
2.2.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	44
2.2.1.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	44
2.2.1.6	Präparation von DNA für die Elektroporation in ES-Zellen.....	45
2.2.1.7	Phenol-Chloroform-Fällung	45
2.2.1.8	Ethanol-Natriumacetat-Aufreinigung	45
2.2.2	Molekularbiologische Klonierungsmethoden	46
2.2.2.1	Restriktionsverdau der DNA	46
2.2.2.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	46
2.2.2.3	Ligation	46
2.2.2.4	Klonierung in pGEM [®] -T-Vektor.....	46
2.2.2.5	Klonierung synthetischer DNA-Produkte	47
2.2.2.6	Plasmidtransformation in chemisch-kompetente <i>E. coli</i> -Zellen.....	47
2.2.2.7	Plasmid-Transformation in <i>E. coli</i> SCS110	48
2.2.2.8	(Einzel-)Kolonie-PCR.....	48
2.2.2.9	Kultivierung von <i>E. coli</i>	48
2.2.2.10	Bakterienglycerinstocks	49
2.2.2.11	Sequenzierung.....	49
2.2.3	Zellkultur	49
2.2.3.1	Die Kultivierung eukaryotischer Zellen	49
2.2.3.2	Trypsinisierung / Passagierung von Zellen.....	49
2.2.3.3	Bestimmung der Zellzahl	50
2.2.3.4	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	50
2.2.3.5	Transiente Transfektion	50
2.2.3.6	Behandlung der transfizierten Zellen mit Doxycyclin.....	51
2.2.3.7	Isolierung von Zellen für die Durchfluss-Cytometrie.....	51
2.2.4	Mausarbeit	52
2.2.4.1	Genotypisierung.....	52

2.2.4.2	Lungenentnahme aus der Maus.....	53
2.2.4.3	Isolierung von primären alveolaren Typ II Zellen	53
2.2.4.4	Isolierung von primären Lungenfibroblasten aus der Maus	55
2.2.4.5	<i>in vitro</i> Behandlung der primären Lungenfibroblasten mit Ganciclovir	55
2.2.5	Histologische Methoden	56
2.2.5.1	Erstellung von Kryoschnitten	56
2.2.5.2	Färbung von Kryoschnitten.....	56
2.2.6	Proteinbiochemie	57
2.2.6.1	Proteinisolierung - Zellen	57
2.2.6.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	57
2.2.6.3	Protein-Gelelektrophorese und Western Blot.....	57
2.2.7	Statistische Auswertung	58
2.2.8	Erklärung zu den Tierversuchs-Genehmigungen.....	58
3	Ergebnisse.....	59
3.1	LungGlow 1 – Die Visualisierung dreier Zelltypen in der Lunge.....	59
3.1.1	Die Generierung des LungGlow 1 Plasmids	59
3.1.2	<i>in vitro</i> Funktionalitätstests des LungGlow 1 Plasmids und seiner Einzelelemente	61
3.1.2.1	<i>SP-C-mCherry</i>	61
3.1.2.2	<i>SM22-GFP</i>	62
3.1.2.3	<i>Col1-YFP</i>	62
3.1.2.4	<i>in vitro</i> Überprüfung des LungGlow 1 Plasmids pGL3-final.....	63
3.1.3	Analyse der transgenen LungGlow 1 Mäuse	65
3.2	HSV-TK – Generierung einer Mauslinie zur Deletion von Kollagen I- exprimierenden Zellen.....	66
3.2.1	<i>in vitro</i> Funktionstest der HSV-TK basierten Deletion.....	67
3.3	LungGlow 2 – Transgene zur Visualisierung dynamischer Trans- Differenzierungsprozesse.....	68
3.3.1	Die Generierung eines Zweifarben-Reportergenplasmids	68
3.3.2	<i>in vitro</i> Funktionsüberprüfung der sequenzspezifischen Rekombination im LungGlow 2 Plasmid.....	70
3.3.3	Die Klonierung eines Tet-Operator/FLPe-Konstrukts zur Generierung einer Tetracyclin-abhängig induzierbaren Rekombinase.....	72
3.3.4	<i>in vitro</i> Funktionsüberprüfung des Gesamtkonzepts von LungGlow 2	73
4	Diskussion.....	78
4.1	Das Design von LungGlow 1	78
4.2	Das LungGlow 1 Projekt.....	79
4.3	Gezielte Zell-Dezimierung durch HSV-TK	82

4.4	Das Design von LungGlow 2	83
4.5	Das LungGlow 2 Projekt	84
4.6	Ausblick	87
5	Zusammenfassung	89
6	Summary	91
7	Literaturverzeichnis	93
8	Abbildungsverzeichnis	98
9	Tabellenverzeichnis	100
10	Anhang	101
10.1	Vektorkarten	101
10.1.1	LungGlow 1	101
10.1.2	LungGlow 2	102
10.2	Design der synthetischen <i>multiple cloning sites</i> (MCS)	107
10.2.1	LungGlow 1	107
10.2.2	LungGlow 2	107
10.3	Primer der Projekte LungGlow 1 und LungGlow 2	108
11	Eidesstattliche Versicherung	110

Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	α -Aktin der glatten Muskelzellen (<i>smooth muscle α-actin</i>)
μ	Mikro (10^{-6})
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
AK	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
ATII	Typ II Epithelzellen
bp	Basenpaare
ca	circa, etwa
CAG	<i>chicken β-actin</i> Promoter + Cytomegalovirus-Enhancer
CFP	blau fluoreszierendes Protein (<i>cyan fluorescent protein</i>)
cm	Zentimeter
cmv	Cytomegalovirus
COPD	chronisch obstruktive pulmonale Erkrankung
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
Dox	Doxycyclin
ECM	Extrazelluläre Matrix (<i>extracellular matrix</i>)
ER	Östrogen-Rezeptor (<i>estrogen receptor</i>)
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> - und andere
FITC	GFP- Fluorescein Isothiocyanat
FLP	Flippase
FLPe	<i>enhanced</i> Flippase
FRT	Flippase Erkennungssequenz (<i>Flippase recognition target</i>)
GCV	Ganciclovir
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
h	Stunde
Hg	Quecksilbersäule
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
IPF	idiopathische pulmonale Fibrose
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

min	Minute
mind.	mindestens
mm	Millimeter
mSP-C	Maus <i>Surfactant</i> Protein C
ng	Nanogramm
P(A)	Poly(A) Sequenz
PAH	pulmonale arterielle Hypertonie
PASMC	pulmonale arterielle glatte Muskelzellen
PGK	Phosphoglyceratkinase 1
PH	pulmonale Hypertonie
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration
RFP	rot fluoreszierendes Protein (<i>red fluorescent protein</i>)
rmp	Runden pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
rtTA	reverser Tetracyclin-Transaktivator
s	Sekunde
s.	siehe
SMC	glatte Muskelzellen (<i>smooth muscle cells</i>)
SV	Simian Virus
Tet	Tetracyclin
TetO	Tetracyclin-Operator
tTA	Tetracyclin-Transaktivator
ÜN	über Nacht
vgl.	vergleiche

1 Einleitung

Die Lunge der Säugetiere besitzt eine annähernd honigwabenartige Struktur, in der durch perfekt aufeinander abgestimmte Untereinheiten zwischen Luft und Blutkreislauf (Alveolen) eine Maximierung der Oberfläche stattfindet und mit Hilfe einer effektiven Ventilation der Gasaustausch optimiert ist. Im Menschen besteht die Membran für den Gasaustausch (ca. 1 μm dick) aus alveolaren Epithelzellen, einer Basalmembran und Endothelzellen mit einer absoluten Oberfläche von ca. 70 m^2 . Diese komplexe Struktur wird stufenweise in der Lungenentwicklung generiert, zunächst durch das Wachstum des epithelialen Tubus und später durch die Septierung der terminalen Alveolen, was koordiniertes Wachstum und Differenzierung einer Vielzahl verschiedener Lungenzellen voraussetzt. Veränderungen der Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, Migration und Form einer oder mehrerer Zelltypen führen direkt oder indirekt zu einer Störung des Entwicklungsprozesses, was abnorme Lungenstrukturen und letztlich einer Beeinträchtigung der Gasaustauschfunktion zur Folge hat. Die Komplexität der Lungenstruktur erschwert den Erhalt oder die Wiederherstellung dieser Funktion nach einer Lungenverletzung oder nicht adäquaten Regenerationsprozessen, sobald die Lunge voll entwickelt ist. Daher ist das Wissen um die Entwicklung der Lunge, den zugrunde liegenden molekularen und zellbiologischen Prozessen, essentiell für das Verständnis der Pathobiologie in der Lungenentwicklung und –regeneration, ebenfalls im Hinblick auf neue therapeutische Strategien um Lungenerkrankungen zu verhindern oder zu behandeln [1].

1.1 Erkrankungen der Lunge

Die auf zellulärer Ebene hochkomplexe Anordnung und dreidimensionale Organisation der Lunge variiert entlang ihrer proximal-distalen Achse, wobei distinkte Regionen verschiedene Aufgaben übernehmen. Pathologische Veränderungen der zellulären Komposition und physiologischen Funktion des Lungenepithels sind gemeinsame Charakteristika einer Vielzahl verschiedener Lungenerkrankungen, wie Lungenkrebs, chronischer Bronchitis, Asthma und dessen weitreichende Folgen, die fibrotische Erkrankungen und die chronisch obstruktiven pulmonale Erkrankung (COPD) beinhalten können [2]. Letztgenannte Erkrankungen treten ebenfalls ohne vorangehende Lungenerkrankungen auf, ihre Ursachen sind teilweise unbekannt. Die Fokussierung der Forschung auf diese Erkrankungen liegt in ihrer globalen Relevanz, was in der Inzidenz sowie der Prognose für die Erkrankten begründet ist.

Für die COPD wird angenommen, dass sie bis zum Jahr 2020 die dritthäufigste Todesursache der Welt sein wird [3] [4], da eine Vielzahl ihrer vermuteten Ursachen vermehrt in den Auswüchsen der modernen Welt akkumuliert sind, insbesondere

Tabakkonsum und Umweltgifte/Feinstäube. Der Ausdruck „fibrotische Erkrankungen“ der Lunge umschreibt eine Vielzahl verschiedener Krankheitsbilder interstitieller Lungenerkrankungen. Von diesen ist die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF) als diejenige Erkrankung mit der schlechtesten Prognose für die Patienten ein Forschungsschwerpunkt, da die mittlere Überlebensrate bei nur 2 – 3 Jahren liegt [5].

Neben der isolierten Betrachtung der einzelnen Erkrankungsfelder ergeben sich aus den bisher bekannten pathologischen Charakteristika nennenswerte Überschneidungspunkte. So werden für die COPD auch fibrotische Veränderungen der Lungenstruktur beschrieben [6]. Darüber hinaus wird in Folge des schweren Emphysems bei fortgeschrittener COPD die pulmonale Hypertonie als ein weiteres Krankheitsbild erwähnt, verursacht durch eine Endothel-Dysfunktion [6].

Während hier die Ursache in der zu Grunde liegenden COPD zu suchen ist, gibt es auch bei der pulmonalen Hypertonie idiopathische Formen, die als (idiopathische) pulmonale arterielle Hypertonien bekannt sind. Der Forschungsfokus ist hierbei in der Schnittstelle von Herz- und Lungenforschung anzusiedeln, da das umfassende Zusammenwirken des Herz- und Lungensystems für die tödliche Folge dieser Erkrankung, das Rechtsherz-Versagen, letztlich verantwortlich ist [7].

Trotz der unterschiedlichen Erscheinungsformen der Erkrankungen werden bei jeder einzelnen von ihnen zelluläre Veränderungen sowie Trans-Differenzierungen als Ursache und/oder Folge der Krankheiten beschrieben. Diese *Remodeling*-Prozesse, die je nach Erkrankung ganz unterschiedliche Zelltypen betreffen können, tragen erheblich zum Krankheitsverlauf bei. Die den Prozessen zu Grunde liegenden Ursachen und molekularen Mechanismen sind aktueller Gegenstand der Forschung, die auch die Entwicklung labortechnischer Methoden zur Untersuchung einzelner molekularer Aspekte beinhalten.

1.1.1 Chronisch obstruktive pulmonale Erkrankung (COPD)

Die chronisch obstruktive pulmonale Erkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) wird ursächlich meist mit dem Tabakkonsum (Rauchen) sowie einer längerfristigen Aufnahme verschiedener Umweltgifte/Stäube in die Lunge in Verbindung gebracht. Die COPD verursacht eine langsam fortschreitende und nur partiell reversible Limitierung des Gasaustauschs. Einige Charakteristika dieser Erkrankung sind die chronische Bronchitis, ein inflammatorischer Aspekt der COPD, der unter anderem mit der Veränderung (*Remodeling*) der bronchialen Mikrovaskulatur einhergeht [3, 4, 8-12], das Emphysem, charakterisiert durch den Verlust alveolarer Strukturen, verbunden mit extensiven Entzündungsprozessen und Gewebeerstörungen sowie – als Konsequenz einer endothelialen Dysfunktion bei schwerem Emphysem – die pulmonale Hypertonie, deren vaskuläre *Remodeling*-Prozesse

aus einer Kombination aus hypoxischen Bedingungen, Entzündungsprozessen und dem Verlust von Kapillaren resultieren, was eine Erhöhung des pulmonalen arteriellen Blutdruck zur Folge hat [13-16]. Die umfassenden pathologischen *Remodeling*-Prozesse der COPD sind sehr komplex und beinhalten verschiedene Aspekte. Fibrotische Veränderungen zeichnen sich unter anderem durch pathologische Verschiebungen in der Struktur, Verteilung und Funktion der Fibroblasten-Subtypen und der von ihnen exprimierten Proteine (z. B. Kollagen) aus, daraus resultierend ist die Struktur und Kontrolle der extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*, ECM) ebenfalls gestört [6]. Degradation oder verminderte Produktion verschiedener Proteine, die im Normalzustand Grundlage bestimmter Zellphänotypen darstellen, sind Zeichen vermehrter Trans-Differenzierungsprozesse, die zu einem Verlust von Zellpopulationen (z. B. Epithelzellen) und damit einer Zerstörung funktionaler Gewebeteile führen [6].

1.1.2 Fibrotische Erkrankungen

Die alveolären Strukturen der Lunge sind sehr fein und daher anfällig für Verletzungen und Infektionen. Als Antwort auf diese Störungen im Lungengewebe kann es zu Vernarbungen des Gewebes kommen, wodurch sich fibrotische Inseln bilden. Unter Umständen verselbstständigt sich dieser Heilungsprozess, die Folge der unkontrollierten Fibrose ist dann eine Lungendysfunktion bis hin zum Tod [5]. Die Ursachen dieser Erkrankungen werden unter anderem in wiederholten Verletzungen/Infektionen verschiedener Teile der Lunge vermutet sowie in einer fehlenden Regulation des Heilungsprozesses. Die unkontrollierte Vernarbung des Lungengewebes kann große Teile der Lunge betreffen. Die daraus resultierenden unterschiedlichen Krankheitsbilder werden als interstitielle Lungenerkrankungen (*interstitial lung diseases*) zusammengefasst [17], da die histopathologischen Veränderungen meist das Interstitium betreffen, bestehend aus alveolärem Epithelium, kapillarem Endothelium, Basalmembran, perivaskulärem und perilymphatischem Gewebe [5]. Eine weitere Unterteilung nach dem Ursachenprinzip – bekannt oder idiopathisch – kann unternommen werden. Darüber hinaus sind Klassifizierungen auf Grund der Vielzahl der Erscheinungsbilder und Ursachen der Erkrankungen schwierig, jedoch konnten für die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF) Kriterien erarbeitet werden, da es sich hierbei um die häufigste und tödlichste Erscheinungsform der interstitiellen Lungenerkrankungen handelt. Viele Studien zu fibrotischen Erkrankungen der Lunge beziehen sich aus eben diesen Gründen auf die IPF [5].

1.1.3 Vermutete Ursachen und molekulare Grundlagen der IPF

Die Pathogenese der IPF ist heterogen, jedoch scheint eine primäre Ursache für die Erkrankung eine nicht mehr erreichte Rekonstitution der beschädigten Epithelschicht zu sein. Die Beschädigung, verursacht u. a. durch Rauchen, Infektionen, Feinstäube und/oder *Ageing*, führt zu einer Abgabe von profibrotischen Mediatoren durch Typ II-Epithelzellen, bei gleichzeitig erhöhter Wahrscheinlichkeit dieses Zelltyps, Apoptose zu unterlaufen. Als Folge kommt es zu einer Migration von Fibroblasten in den verletzten Bereich und zu einer Akkumulation von Myofibroblasten verschiedenen Ursprungs (aus resistenten Fibroblasten, zirkulierenden Fibrozyten, epithel- mesenchymaler Transition). Der Vernarbungsprozess, einhergehend mit einer Akkumulation von Bindegewebe (speziell Kollagen) bei gleichzeitigem Scheitern einer Epithelrekonstitution, führen zur Etablierung der Fibrose [5]. Das Einwandern bestimmter Zellen des Immunsystems in den Bereich der Verletzung des alveolären Raums ist zu beobachten, jedoch erscheint die Induktion der Fibrose unabhängig von eventuell vorhandenen Entzündungsreaktionen [18]. Es wird vermutet, dass die Ursprünge der IPF durch wiederholte, kaum zu detektierende Mikro-Entzündungsherde mitbegründet werden und die pathologische Antwort darauf fibrotisch ist. Studien zur IPF fokussieren daher vermehrt auf Erforschung und Analyse fibrotischer Stoffwechselwege, um neue Therapieansätze für diese Erkrankung zu finden [5]. Dennoch können die bisher beschriebenen Teilaspekte zu dieser Erkrankung nur als Ansatzpunkte für weiterführende Forschungen interpretiert werden, da die Ursachen und Mechanismen der IPF bisher immer noch im Dunkeln liegen.

1.1.4 Pulmonale Hypertonie

Als pulmonale Hypertonie (PH) wird eine Erkrankung in sehr heterogenen Erscheinungsformen beschrieben, die - als eine der wenigen durchgängigen Charakteristika - durch den pulmonalen Arteriendruck von ≥ 25 mm Hg im Ruhezustand definiert wird, im Screening durch überprüft durch Echokardiographie, im Verdachtsfall bestätigt durch einen Rechtsherz-Katheter (als Goldstandard) [19]. Eine weitere Einordnung folgt dem Ursachenprinzip, das zwischen idiopathischen und sekundären Formen mit bekannten Gründen unterscheidet [20]. Weiterhin wurden Klassifizierungskriterien entwickelt (insgesamt 5 Gruppen), die die Assoziation mit anderen Erkrankungen beinhalten. Wichtige Untergruppen sind hierbei die pulmonale arterielle Hypertonie (PAH, Gruppe 1), charakterisiert durch strukturelle Veränderungen der kleinsten pulmonalen Arteriolen und damit verbundener klinischer Parameter [19, 20], die PA, verbunden mit Linksherz-Erkrankungen (Gruppe 2) und die PA, verbunden mit chronischen Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie (Gruppe 3) [21, 22]. Über diese Kriterien hinaus ist eine klinische Einordnung der Erkrankungsformen in fortlaufender Diskussion, da sie eine individuell unterschiedlich ausgeprägte Symptomatik aufweist. Selbst bei ähnlichen Stimuli kann die PH

milde bis schwere Ausprägungsformen zeigen, wodurch sich Fragen ergeben, welche distinkten Aspekte für die Differenzierung des Schweregrades ursächlich sind [23].

1.1.5 Ursachen der PAH

Ein Schwerpunkt der Grundlagenforschung ist der durchgängig beobachtete erhöhte Widerstand der pulmonalen Blutgefäße und dessen Ursache, insbesondere in der Reinform der PAH. Neben vermehrter Vasokonstriktion und genetischer Prädisposition sind vor allem die ausgeprägten *Remodeling*-Prozesse der pulmonalen Blutgefäße im Fokus der Untersuchungen [23]. Ein Ursprung dieser Prozesse scheint in Verletzungen der Endothelschicht der pulmonalen Blutgefäße zu liegen (z. B. durch Toxine, reaktive Sauerstoffspezies, Autoimmun-Mechanismen) [24-27]. Verschiedene Studien belegen ein Konzept, in dem eine vermehrte Apoptose von Endothelzellen zu einer Selektion Apoptose-resistenter, (hyper-)proliferierender Endothelzellen führt, die wiederum PAH zur Folge hat. Die Herkunft dieser resistenten Endothelzellen sowie die zu Grunde liegenden Mechanismen sind nicht abschließend geklärt [20], jedoch sind (zirkulierende) Vorläuferzellen als Ursprung in der Diskussion [28, 29]. Endothelzellen bilden eine funktionale Einheit mit glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) auf der Basis einer endothel-induzierten Rekrutierung, Proliferierung und Differenzierung von SMC während der Bildung neuer Blutgefäße [30-32]. In schwerer PAH scheint die Balance zwischen Proliferation und Apoptose der pulmonalen arteriellen SMC (*pulmonary arterial smooth muscle cells*, PASMC) zu Gunsten einer vermehrten Proliferation und geringerer Apoptose gestört, was zur Verdickung der Gefäßwände führt [20]. Des Weiteren wird eine phänotypische Veränderung der PASMC als ein zentraler Prozess im vaskulären *Remodeling* beschrieben, eine Dedifferenzierung vom reifen, nicht-proliferierenden hin zu einem proliferierenden Zelltyp. Zusammen mit der verringerten Apoptose scheint dies für die Formierung der Neointima erforderlich zu sein [33-37]. Fibroblasten sind bei Verletzungen der pulmonalen Blutgefäße involviert, was eine schnelle Migration, Proliferation, Synthese von Bindegewebe, Kontraktionsfähigkeit und Cytokin-Produktion beinhaltet [20]. In der Neointima-Formierung sowie der vaskulären *Remodeling*-Prozesse der PAH scheinen durch Hypoxie induzierte Trans-Differenzierungsprozesse von Fibroblasten-Subtypen hin zum Phänotyp der Myofibroblasten (Expression von *smooth muscle α -actin* (α -SMA)) ebenfalls eine Rolle zu spielen [38]. Welche Einflüsse für die Entstehung und die Schwere der Ausprägung der PAH verantwortlich sind, ist auf Grund der Vielzahl der beteiligten Faktoren nicht endgültig definiert und Gegenstand der Forschung [23].

1.2 Fibrozyten

Zirkulierende Fibrozyten wurden als erstes 1994 in einem experimentellen Modell der Wundheilung als spindelförmige, Kollagen, Prokollagen und CD34 exprimierende Zellen beschrieben [39] und haben ihren Ursprung im Knochenmark [40]. Sie gelten als intermediärer Zelltyp zwischen der mesenchymalen und der hämatopoietischen Linie, da sie über die sehr spezifische Coexpression einiger Marker beider Zelllinien identifiziert werden [41], die sie von Fibroblasten, Monozyten und Makrophagen unterscheidet [42]. So exprimieren sie Kollagen I, Kollagen III, Vimentin, teilweise *α-smooth muscle actin* (α -SMA) (mesenchymale Marker) und CD34, CD45 (hämatopoietische/leucozytische Marker). Des Weiteren tragen Fibrozyten verschiedene Chemokin-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche wie z. B. CXCR4, durch die sie entlang bestimmter Chemokin-Gradienten (z. B. CXCL12) in Gewebe einwandern können [43].

1.2.1 Die Rolle der Fibrozyten in Lungenerkrankungen

Fibrozyten sind in die Wundheilung durch verschiedene Mechanismen involviert, z. B. präsentieren sie Antigene [44], tragen durch die Expression von α -SMA zum Wundverschluss bei [43, 45], sekretieren Chemokine und hämatopoietische Wachstumsfaktoren und bilden eine fibroblasten-ähnliche, Kollagen I exprimierende Zellpopulation. Letztere Fähigkeit der Fibrozyten lässt darauf schließen, dass sie eine kritische Rolle in Erkrankungen übernehmen, in denen es zur pathologischen Umstrukturierung von Bindegewebe kommt [46]. Verschiedene Studien in experimentellen Fibrosemodellen (Bleomycin-, Bestrahlungs- oder GFP- Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-induzierte Fibrose) zeigen eine vermehrte Rekrutierung von Fibrozyten, eine direkte Korrelation zur Hochregulierung von Prokollagen I und -III in der Lunge bzw. Kollagen-exprimierende Fibroblasten mit zirkulierenden, aus dem Knochenmark stammenden Vorläuferzellen [47-49]. Weiterhin wurde eine erhöhte Anzahl an Fibrozyten (durch CD45, Kollagen I, CXCR4 Expression identifiziert) in Patienten mit fibrotischen interstitiellen Lungenerkrankungen festgestellt [50]. Darüber hinaus bestand eine positive Korrelation zwischen der Anwesenheit fibrotischer Inseln und der Anzahl von Fibrozyten in der Lunge [51]. Die Verbindung zwischen zirkulierenden Fibrozyten und der pulmonalen Hypertonie, die teilweise durch fibroproliferierende Veränderungen in den pulmonalen Blutgefäßen charakterisiert ist [38], wurde durch Studien nachgewiesen, in denen die Fibrozyten entweder gezielt entfernt wurden, was zu geringerer Ausprägung der Verdickung der Adventitia sowie verringerter Fibrose führte [52] oder durch die Transplantation Reporter-genmarkierten Knochenmarks mit anschließender Induktion der Erkrankung durch Hypoxie. Letzteres hatte deutliche vaskuläre *Remodeling*-Prozesse sowie eine vermehrte Ansammlung der markierten Zellen in der Adventitia pulmonaler Arterien zur Folge [53].

Darüber hinaus konnte eine signifikante Anreicherung von zirkulierenden Fibrozyten im peripheren Blut von Kindern und Jugendlichen mit PH festgestellt werden [54].

Trotz dieser Erkenntnisse bleiben die Identifizierung von Fibrozyten und ihrer Aufgaben in verschiedenen pulmonalen Erkrankungen problematisch. Das liegt vor allem in den verschiedenen Expressionsprofilen, die von diesem Zelltyp in den verschiedenen Publikationen zur Identifizierung herangezogen wurden und die sich, *in vitro* und *in vivo* sowie nach Reifegrad und Lokalisation des Zelltyps über die Zeit anscheinend verändern. So ist der „Goldstandard“ [54] zur Identifizierung der Fibrozyten – Kollagen – um eine effektive Abgrenzung zu Monozyten, Makrophagen und Fibroblasten zu gewährleisten, in kritischer Diskussion [42]. Die in verschiedenen Publikationen über die Zeit (*in vitro*) und bei Migration ins Gewebe beobachtete verringerte Expression von CD34 bei Heraufregulierung der α -SMA Expression wird als Reifungsprozess der Zellen interpretiert und wirft die Frage auf, ob zirkulierende Fibrozyten in (Myo-)Fibroblasten differenzieren (können) oder ob es sich weiterhin um distinkte Populationen handelt [43, 48, 49, 55].

1.3 Lineage Tracing

Lineage Tracing im engeren Sinn wird als Identifizierung aller Nachfolger einer bestimmten Zelle definiert. Hierbei wird eine einzelne Zelle so markiert, dass sie den Marker an die ihr nachfolgenden Zellen weitergibt, wodurch sich Kolonien markierter Klone ergeben. *Lineage Tracing* liefert Informationen über die Anzahl der Nachfolger aus einer Ursprungszelle, ihre Lokalisierung und ihren Differenzierungsstatus. Ursprünglich in der klassischen Entwicklungsbiologie verwendet wird *Lineage Tracing* vermehrt eingesetzt, um das Schicksal von Stammzellen in intakten Geweben zu verfolgen, was einen großen Vorteil gegenüber der Isolierung und *in vitro* Kultivierung dieser Zellen darstellt. Die wichtigsten Aspekte bei der Wahl des Markers sind, dass dieser die Eigenschaften der markierten Zelle, ihrer Nachkommen und benachbarten Zellen unverändert lässt, sich auf alle nachkommenden Zellen überträgt und nicht auf unbeteiligte, benachbarte Zellen übergeht [56].

Die ursprünglichste Form des *Lineage Tracing* stellt die direkte Beobachtung nichtmarkierter Zellen über einen bestimmten Zeitraum dar, die jedoch auf transparente Organismen und Gewebe beschränkt ist. „Lebendfarbstoffe“ (Marker, die die Zellen nicht töten) und radioaktive Markierungen, mit denen Zellen imprägniert werden können, die in Zellen injiziert oder als lipidlösliche Marker direkt in die Plasmamembran von Zellen eingebracht werden, bilden eine Alternative. Die Limitierung dieser Methoden ist jedoch eine zunehmende Verdünnung des Markers durch Zellteilung sowie durch Diffusion. Für die Untersuchung von Stammzellfunktionen in adulten Geweben werden Knochenmarkstransplantationen durchgeführt. Durch die Rekonstitution der zirkulierenden, aus dem Knochenmark stammenden Vorläuferzellen verschiedener Zelllinien und deren anschließende Migration in

Gewebe können die Stammzellerneuerung sowie die Differenzierung verschiedener Zelltypen untersucht werden [56].

1.3.1 Genetisches „*Tracing*“

Das Einbringen genetischer Marker in Bezug auf *Lineage Tracing* hat den Vorteil, dass diese nicht in benachbarte Zellen diffundieren und, sofern sie stabil exprimiert sind, an alle nachfolgenden Zellgenerationen der einmal markierten Zelle weitergegeben werden. Jedoch ist hierfür eine Balance zwischen einer adäquaten Expressionseffizienz, der möglichen Veränderung des Zellstoffwechsels durch die Expression und damit verbundenen potentiellen Toxizität des Markers notwendig. Als Reportergene werden Gene eingesetzt, deren Expressionsprodukte eine Fluoreszenz aufweisen (z. B. das grün fluoreszierende Protein; *green fluorescent protein*, GFP) oder bei Zugabe bestimmter Substrate eine visualisierbare Aktivität zeigen (z. B. β -Galaktosidase). Für Gesamtgewebe-Untersuchungen eignen sich Chimären, die durch die Verpaarung von Tieren entstehen, die einen genetischen Marker ubiquitär exprimieren oder gar nicht. Durch die Generierung genetischer Mosaikere können die Gewebe detektiert werden, deren genetischer Hintergrund vom Markertier vererbt wurde [56].

1.3.1.1 Genetische Rekombination

Für gezielte, auf einzelne Zellen oder Gewebe abgestimmte Untersuchungen sind Methoden zur genetischen Rekombination sehr weit verbreitet. Hierbei werden Rekombinasen zell- oder gewebespezifisch exprimiert und durch ihre Aktivität eine permanente genetische Markierung durch ein konditionales Reportergen geschaffen. Die am weitesten verbreiteten Rekombinase-Systeme sind *Cre-LoxP* (aus Bakteriophage P1) und *FLP-FRT* (aus *Saccharomyces cerevisiae*). Das Prinzip (Abbildung 1-1) basiert auf der Kreuzung zweier genetisch veränderter Organismen. Der eine trägt die genetische Information für die über die Promoterwahl definierte Expression der Rekombinase (*Cre* oder die Flippase *FLP*), der andere eine Expressionskassette, flankiert von den jeweiligen Erkennungssequenzen (*sites*) für die Rekombinase (*LoxP* oder *FRT* (*flippase recognition target*)), kombiniert mit einem Stop-Codon (*loxP-STOP-loxP*; „*floxed*“ *STOP* oder *FRT-STOP-FRT*). In den Nachkommen wird die Rekombinase, abhängig von dem Promoter und damit zell- oder gewebespezifisch exprimiert. Das Rekombinase-Enzym wirkt auf seine jeweiligen Erkennungssequenzen insofern, als dass der zwischen den *sites* liegende DNA-Abschnitt herausgeschnitten, oder, je nach Orientierung der *sites*, invertiert wird. Bei der Deletionsreaktion wird das Stop-Codon entfernt, so dass ein anderer Promoter nun die Reportergenkassette exprimiert und eine zell- oder gewebespezifische Markierung stattfindet.

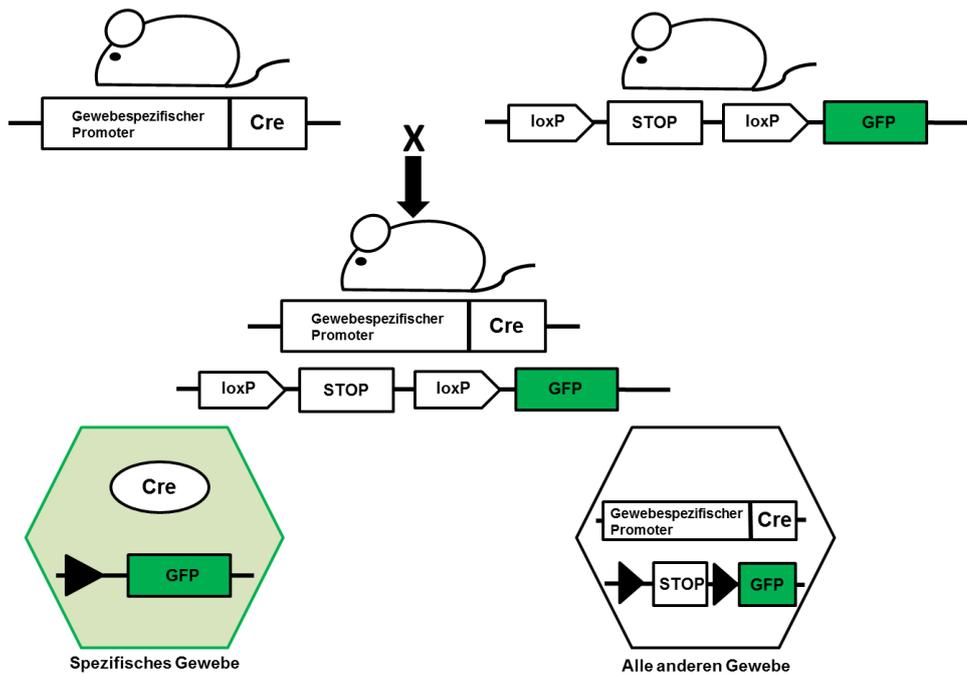


Abbildung 1-1: Das Prinzip der genetischen Rekombination.

Die Kreuzung zweier transgener Mauslinien führt zu einer Cre-Expression unter einem gewebespezifischen Promoter. Hierdurch wird in diesem Gewebe die zwischen den *loxP*-Sequenzen liegende Expressionkassette deletiert und das Reportergen GFP exprimiert, so dass das Gewebe eine grün-fluoreszente Markierung erhält (nach [57]).

Als Promotoren für die Reportergenkassette werden in der Regel ubiquitär aktive, starke Promotoren verwendet, um eine effektive Expression zu gewährleisten. [56, 58]. Durch die Verwendung von Fluorochromen, detektierbar in unterschiedlichen Wellenlängen-Bereichen, erschließen sich mehr Möglichkeiten zur spezifischen Markierung. Additiv zu der Generierung einzelner Reporter-Linien können durch die Kombination der Rekombinase-Charakteristika sowie verschiedener, inkompatibler Rekombinase-*sites* mit verschiedenen, hintereinander geschalteten Expressionskassetten/Fluorochromen eine Deletion und/oder Inversion einzelner Kassetten erfolgen, wodurch ermöglicht wird, Zelltypen vor und nach der Rekombination spezifisch zu markieren und zu unterscheiden (Abbildung 1-2) [59, 60].

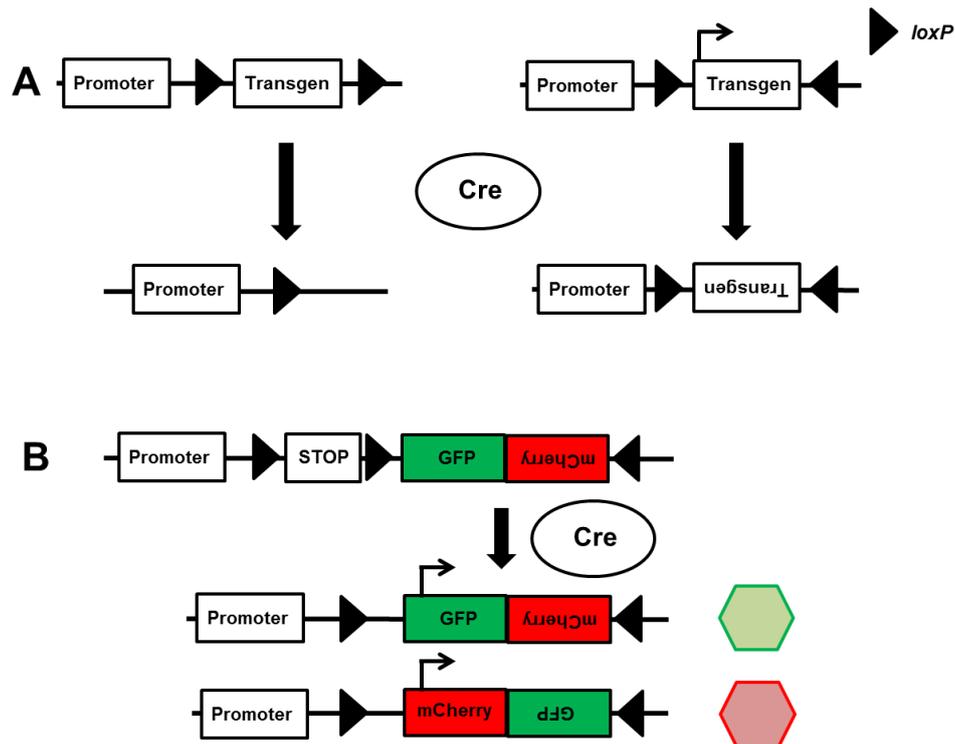


Abbildung 1-2: Auswirkungen der Anordnung von Rekombinase-sites und ihre praktische Anwendung.

A) Werden Rekombinase-sites (*loxP*) in Reihe hintereinander angeordnet, bewirkt die von der Rekombinase (Cre) katalysierte Reaktion eine Deletion der zwischen den sites liegenden Sequenz (Transgen). Sind die sites in einer gegensätzlichen Richtung angeordnet, resultiert daraus die Cre-abhängige Inversion der Sequenz. **B)** Durch die spezielle Orientierung der *loxP*-sites in einem Transgen wird Cre-abhängig eine Expressionskassette (STOP) deletiert und eine Reporter-Gen-Expression gestartet. Abhängig von einer weiteren von Cre katalysierten Reaktion wird durch die Inversion der Sequenz entweder das Reporter-Gen für die grüne Fluoreszenz (*GFP*) oder die rote Fluoreszenz (*mCherry*) exprimiert und die Zellen/Gewebe markiert (nach [61, 62]).

1.3.1.2 Die Generierung transgener Mäuse

Die Generierung der transgenen parentalen Tiere (Maus) kann durch eine Pronuklear-Injektion geschehen, wobei die linearisierte, in die Maus einzubringende DNA in einen der beiden Vorkerne der Eizelle nach der Befruchtung injiziert wird. Es kommt hierbei zu zufallsbasierten Einfügungen diverser Kopien der DNA in das Wildtyp-Genom, die im besten Fall weitervererbt werden [63]. Darüber hinaus werden vermehrt gezielte Insertionen in bekannte, aktive DNA-Loci (namentlich z. B. *Rosa26* oder der Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 Locus, *HPRT*) vorgenommen, um eine konstante Expression der genetischen Manipulation zu gewährleisten [64, 65]. Im Fall des *Rosa26* Locus wurde - durch die Insertion des starken exogenen Promoters *CAG* (*chicken β -actin* Promoter gekoppelt mit einem Cytomegalovirus-Enhancer) - die Expressionseffizienz der eingebrachten Reportergene weiter optimiert [58, 66].

1.3.1.3 Temporäre Regulierung des *Lineage Tracing*

Die zeitlich kontrollierte Aktivierung von Rekombinase-Systemen und damit verbundenen Reportergenen ist notwendig, wenn die zu Grunde liegenden Promotoren sowohl in der Embryonalentwicklung als auch im adulten Tier aktiviert sind, womöglich noch in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen, die Untersuchung jedoch nur die adulte Entwicklung betreffen soll. Um dieser Problematik zu begegnen, wurden induzierbare Rekombinations-Methoden entwickelt. So ist die Cre-Rekombinase oftmals mit dem humanen Östrogen-Rezeptor (*estrogen receptor*, ER) fusioniert. In Abwesenheit des Rezeptor-Liganden verbleibt die Rekombinase im Cytoplasma der Zelle. Das Anbieten eines Liganden, im Experiment das Anti-Östrogen Tamoxifen, führt zur Konformationsänderung des Rezeptors und zu einer Translokation der Cre in den Zellkern, wo sie die vorhandenen *loxP*-Erkennungssequenzen rekombiniert. Die notwendige Optimierung des Systems bezüglich Tamoxifen-Sensitivität und Spezifität der Induzierung erfolgte durch die Generierung eines mutierten humanen Östrogen-Rezeptors (*Cre-ER^{T2}*) [67]. Dieses Fusionsprotein benötigt nur geringe Tamoxifenkonzentrationen zur Aktivierung und wird nicht mehr durch den endogenen Liganden 17 β -Östradiol der Maus aktiviert [56].

Ein weiterer transkriptionaler Mechanismus zur zeitlichen Kontrolle von Genexpressionen (z. B. von Reportergenen oder einer Cre- oder FLP-Expression) ist das Tetracyclin (Tet)-basierte System [68]. Dieses System benötigt zwei Komponenten (1) einen Transaktivator, welcher Tet oder das Tet-Analogon Doxycyclin (Dox) spezifisch bindet und (2) eine Operator-Sequenz des Tet-Operon (*tetO*), kombiniert mit einem weiteren Gen, z. B. der Rekombinase (*tetO::Rekombinase*) [69, 70]. Der Transaktivator wird als *tTA* bezeichnet und ist eine Fusion des *Escherichia coli* (*E. coli*) Tetracyclin-Repressors und einer Transaktivator-Domäne des *Herpes simplex* Virus. In Abwesenheit von Tet oder Dox bindet das Protein tTA an die *TetO*-DNA und aktiviert die Transkription der mit dem *TetO* gekoppelten Rekombinase. Für die Repression der Rekombinase ist somit eine beständige Tet- oder Dox-Zugabe notwendig (Abbildung 1-3). Alternativ dazu wurde das „reverse“ tTA (*rtTA*) entwickelt, das nur bei der Zugabe von Tet oder Dox an das *TetO* bindet und die Rekombinase-Expression induziert.

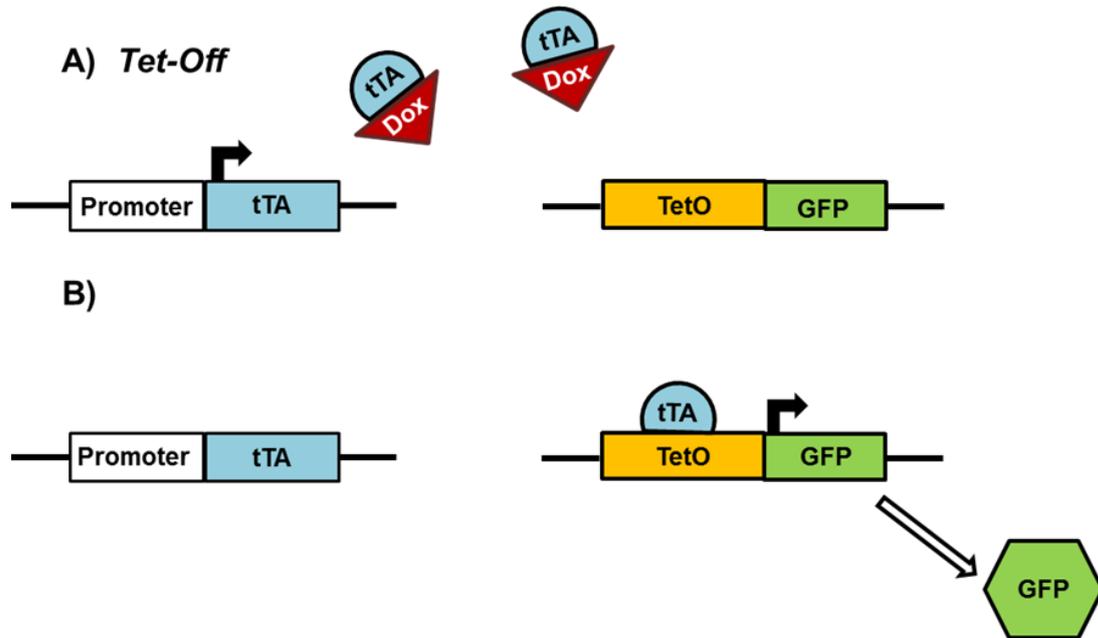


Abbildung 1-3: Prinzip des Tetracyclin-basierten Systems (*Tet-Off*) zur temporären Expressionskontrolle.

A) Voraussetzung für das System ist ein doxycyclin-sensitives Transaktivator-Gen *tTA* sowie die Sequenz des Tet-Operators (*TetO*), an das ein weiteres Gen (hier das Reportergen für das grüne Fluoreszenzprotein GFP) gekoppelt ist. Die Bindung von Doxycyclin an die *tTA*-Sequenz unterbindet eine Aktivierung des *TetO* sowie die darauf folgende Genexpression. **B)** Ist kein Doxycyclin vorhanden, kann der dem *tTA* vorgeschaltete Promoter den Transaktivator exprimieren. Dieser bindet an das *TetO*, das daran anschließende Gen wird exprimiert, so dass das grün fluoreszierende Protein in der Zelle vorliegt, die dann durch grüne Fluoreszenz markiert ist.

1.3.1.4 Lineage Tracing mit Vielfarben-Reportern

Die bekannten genetischen Methoden des *Lineage Tracing* werden zunehmend miteinander verbunden, wobei unter anderem Vielfarben-Reporterkonstrukte entwickelt wurden, um verschiedene Zelltypen in gegebenem Gewebe voneinander zu unterscheiden. Durch die Verwendung zweier Fluorochrome und den entsprechenden Einsatz von *loxP-sites* können bestimmte Zelltypen vor und nach einem Rekombinaseinsatz unterschieden werden [59]. Ein weiteres Beispiel für die vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten der unterschiedlichen Methoden ist die Entwicklung eines multifunktionalen *Cre/FLP* Reporters (Abbildung 1-4), der eine gefloxt Stop-Kassette, eine FRT-flankierte β -Galaktosidase und ein verstärktes GFP (*enhanced GFP, EGFP*) in Reihe enthält [60]. Je nachdem, in welcher Reihenfolge die Rekombinasen eingesetzt werden, ist eine unterschiedliche Detektierung möglich. Die Entfernung des gefloxt Stop (durch Cre) im ersten Schritt hat die FRT-flankierte β -Galaktosidase Expression zur Folge, die in einem zweiten Schritt durch FLP deletiert werden kann, was zu einer GFP-Expression führt. Kommt es zunächst nur zur Deletion der FRT-flankierten β -Galaktosidase (durch FLP), bleibt die Stop-Kassette erhalten. Es findet keine Expression statt. Durch den anschließenden Einsatz von Cre kann jedoch die GFP-

Expression wiederum aktiviert werden. Werden beide Rekombinasen gleichzeitig eingesetzt, kann GFP direkt exprimiert werden.

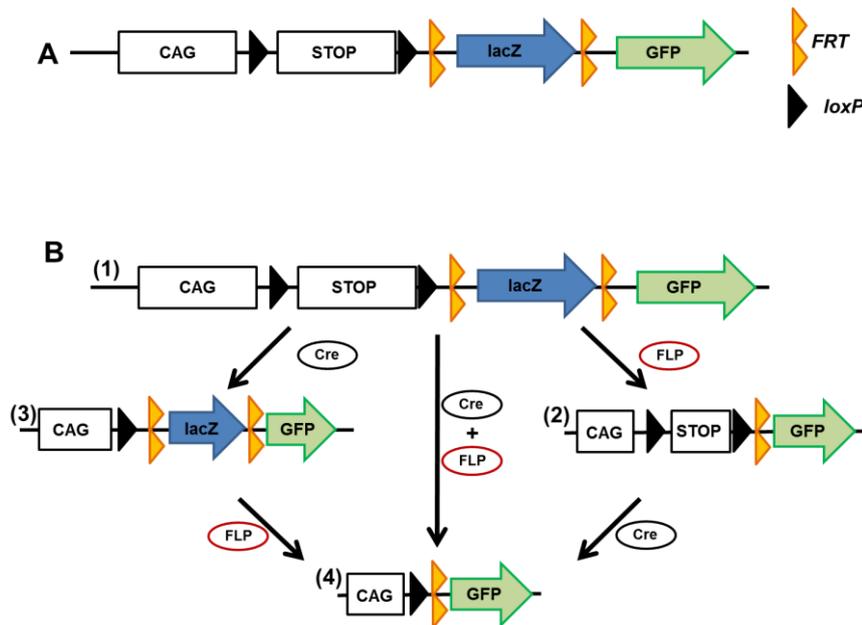


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung eines multifunktionalen Cre/FLP Reporters.

A) Design des Konstruktes, bestehend aus dem ubiquitären Promoter CAG, einer gefloxtten Expressionskassette (STOP), einem FRT-flankierten lacZ-Gen und dem Reporter gen für das grün fluoreszierenden Protein (GFP). **B)** Prinzip der Cre- und FLP abhängigen Rekombination und den daraus folgenden Konstrukten. (1) ist ein Cre abhängiger lacZ-Reporter, der durch eine FLP Rekombinase abhängige Deletion der lacZ-Kassette in einen Cre abhängigen GFP-Reporter konvertiert werden kann (siehe 2). Eine Cre Rekombinase abhängige Reaktion konvertiert (1) in einen FLP abhängigen GFP Reporter (siehe 3), der in Abwesenheit von FLP lacZ exprimiert. Die gleichzeitige Verwendung von Cre und FLP führt zu einem dualen Reporter (siehe 4), der lacZ nach der Cre abhängigen und GFP nur nach der Cre- und FLP abhängigen Rekombination exprimiert (nach [60]).

Eine weiteres Reportersystem, die „Brainbow“-Maus [62] erlaubt eine kombinierte Expression von Fluoreszenzproteinen in einer stochastischen Verteilung (Abbildung 1-5). „Brainbow-1“ verwendet dabei drei Transgene mit jeweils drei Fluorochromen für eine rote, eine gelbe und eine blaue Fluoreszenz (*red fluorescent protein RFP, yellow fluorescent protein YFP, cyan fluorescent protein CFP*), die mit unterschiedlichen, inkompatiblen lox-Varianten flankiert sind. Bei Einsatz der Cre bedingt der Zufall, welche lox-Variante rekombiniert wird und somit, welche Fluorochrom-codierenden DNA-Abschnitte entfernt werden. Dieses stochastische Ereignis findet in allen drei Transgenen pro Zelle statt. Durch die daraus folgenden Misch-Fluoreszenzen werden distinkte Farbunterschiede in den Zellen erzielt. Jede Zelle und die aus ihr nachfolgenden Zellen zeigen nun unterschiedliche Fluoreszenzen und können demnach detektiert werden. „Brainbow-2.1“ verwendet vier verschiedene Fluoreszenzen, von denen jeweils zwei von loxP-sites flankiert sind, die eine Inversion verursachen. Darüber hinaus können die beiden gekoppelten Fluoreszenzen in einer Deletions-Reaktion entfernt werden. Durch die stochastische Rekombination von Cre werden Inversions- oder Deletions-Reaktionen durchgeführt, was zu der Expression

unterschiedlicher Fluorochrome pro Zelle führt. Dies auf einem Transgen beruhende Modell wurde weiterentwickelt und gezielt in den *Rosa26* Locus eingebracht, um ein ubiquitär exprimierendes Mausmodell zu erhalten („*Rosa26-Confetti-Maus*“) [71]. In den bisherigen Modellen wurden für die Visualisierung der Fluoreszenzen fixiertes Gewebe mit anschließender Antikörperfärbung verwendet, so dass die Limitierung in der Verwendung der vorhandenen Antikörper liegt. Eine Alternative dazu ist die Visualisierung der endogenen Fluoreszenz der Reporter, wodurch die Möglichkeit eröffnet wird, Reporter in dickeren sowie lebenden Geweben zu detektieren [72]. Die dadurch ermöglichten dynamischen Analysen bezüglich Zellschicksal und Differenzierung werden durch hochentwickelte Mikroskopie-Techniken unterstützt, die Tiefenscans sowie die distinkte Detektion unterschiedlicher Fluoreszenzen gestatten [56].

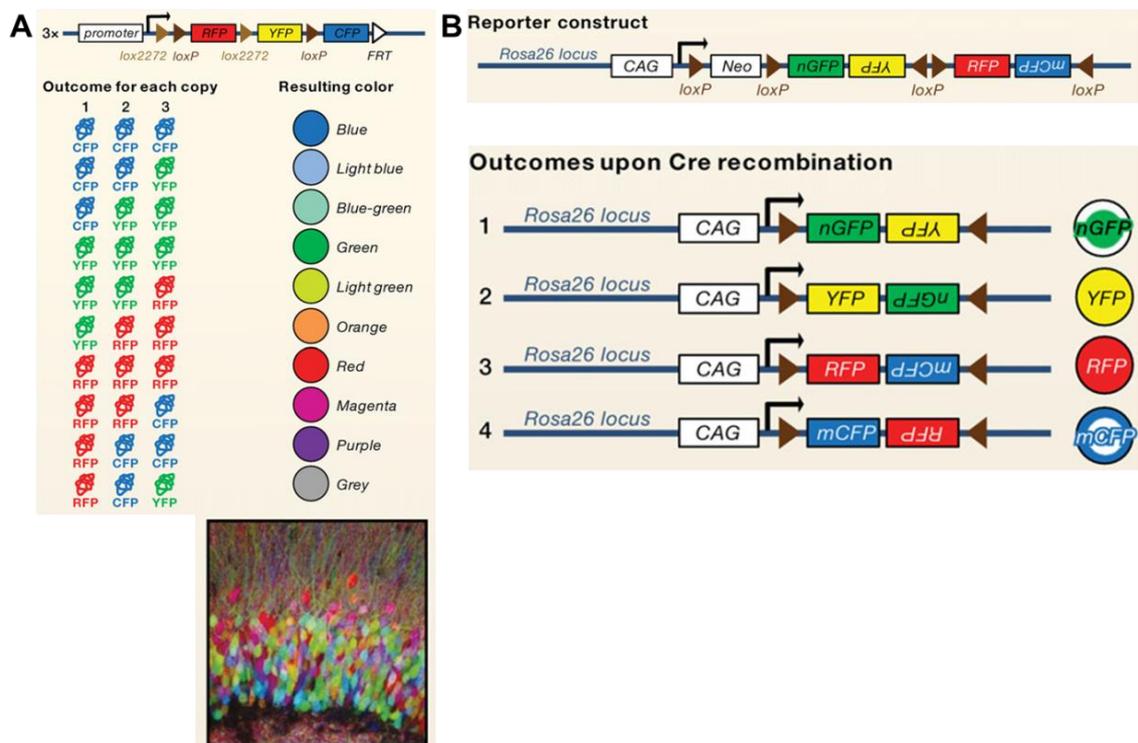


Abbildung 1-5: Beispiele für vielfarbige Reporter-Systeme.

A) „Brainbow-1“ [62], bei dem bis zu 10 verschiedene Fluoreszenzen exprimiert werden können. Die Eingabe von drei Kopien dieses Konstrukts mit 3 Fluorochromen (*red fluorescent protein RFP*, *yellow fluorescent protein YFP*, *cyan fluorescent protein CFP*) ermöglicht durch eine zufallsbasierte Cre Rekombination untereinander inkompatibler *lox*-sites eine kombinierte Expression der Fluoreszenzen, wodurch jede Zelle nach dem Zufallsprinzip eine individuell unterschiedliche Fluoreszenz erhalten kann. **B)** Confetti-Maus, ein stochastischer Vielfarben-Cre-Reporter, basierend auf „Brainbow 2-1“ [62]. Durch die Cre Rekombination wird die Stop-Kassette (*Neo*) deletiert und das Vielfarben-Konstrukt rekombiniert - zufallsbasiert mit Deletionen und Inversionen - wodurch vier verschiedene Fluoreszenzen exprimiert werden können [71].

1.3.1.5 Charakterisierung der Zellfunktion durch gezielte Eliminierung

Eine Möglichkeit, unabhängig von definierten Zellmarkierungen die Funktion bestimmter Zelltypen zu charakterisieren, ist die gezielte und induzierbare Eliminierung der Zellen, die Ziel der jeweiligen Untersuchung sein sollen. Dazu werden transgene Mäuse generiert, die über die genetische Information der Thymidin-Kinase 1 aus *Herpes simplex* (HSV-TK) unter der Kontrolle eines zell-oder gewebespezifischen Promoters verfügen. HSV-TK ist in der Lage, bestimmte Nukleosid-Analoga wie das antivirale Medikament Ganciclovir (GCV) zu Nukleosid-Monophosphaten zu phosphorylieren. Durch zelleigene Kinasen ergibt sich eine Verstoffwechslung zu Nukleosid-Triphosphaten, welche in die DNA integriert werden, wodurch die DNA-Synthese inhibiert und der Zelltod induziert wird [73].

Die sich daraus ergebenden eventuell veränderten Phänotypen umgebender Zellen und Gewebe in der Entwicklung oder in Krankheitsbildern lassen Rückschlüsse auf die Funktion der eliminierten Zellen zu und bieten darüber hinaus die Möglichkeit, mögliche Ansatzpunkte für neue Therapieformen in verschiedenen Erkrankungen zu definieren [74, 75].

1.4 Konzepte zur Charakterisierung und Visualisierung verschiedener Zelltypen in der Lunge

Um eine Charakterisierung bestimmter Zelltypen in der Lunge zu erreichen, werden verschiedene Konzepte verfolgt, die sowohl die gezielte Fluoreszenzmarkierung bestimmter Zelltypen als auch die Eliminierung einzelner Zellpopulationen beinhalten. Hierdurch soll die Funktion der verschiedenen Zellpopulationen in Lungenkrankheiten näher definiert und weitere molekularbiologische und biochemische Untersuchungen ermöglicht werden.

1.4.1 LungGlow 1 – Die Detektion dreier Zelltypen in der Lunge

1.4.1.1 Ziel von LungGlow 1

Die Generierung einer Mauslinie mit paralleler Fluoreszenzmarkierung dreier verschiedener Zelltypen verfolgt das Ziel, in experimentellen Erkrankungsmodellen von IPF, COPD und PAH verschiedene Interaktionen der involvierten Zellpopulationen direkt *in vivo* zu lokalisieren und zu quantifizieren. Durch die spezifische Fluoreszenzmarkierung wird es ermöglicht, die Zelltypen in Abhängigkeit zueinander zu isolieren und weiteren molekularbiologischen und biochemischen Untersuchungen zuzuführen.

1.4.1.2 Das Konzept von LungGlow 1

Das Zusammenspiel von Epithel- und mesenchymalen Zellen ist für die adäquate Lungenentwicklung von großer Bedeutung. Eine Störung der Formierung oder der pathologische Verlust von Alveolarstrukturen bei gleichzeitig abnormen *Remodeling*-Prozessen, in die Fibroblasten und/oder SMC involviert sind, geht mit schwerwiegenden Lungenerkrankungen, wie z. B. der IPF, COPD und PAH einher (s. Kapitel 1.1.1; 1.1.3; 1.1.5.).

Für das LungGlow 1 (LG1) Projekt werden daher Zelltypen aus dem Epithel (alveoläre Typ II-Epithelzellen), SMC und Fibroblasten aus dem Mesenchym ausgewählt. Für die spezifische Markierung soll ein Konstrukt in die Maus integriert werden, das drei verschiedene, für die Zelltypen spezifische Promotoren enthält, die mit drei verschiedenen Reportergenen gekoppelt sind (Abbildung 1-6). Das Konstrukt besteht im Einzelnen aus:

- einem *surfactant protein-C*-Promoter der Maus (*mSP-C*), spezifisch für Alveolare Typ II-Epithelzellen [76], gekoppelt mit dem Gen für *mCherry* (rot fluoreszierendes Protein);
- einem *SM22*-Promoter der Maus (spezifisch für SMC) [77], gekoppelt mit dem Gen für *GFP*;
- einem Promoter für die $\alpha 2$ -Untereinheit des *Kollagen I* (spezifisch für Fibroblasten) [78], gekoppelt mit dem Gen für *YFP*;

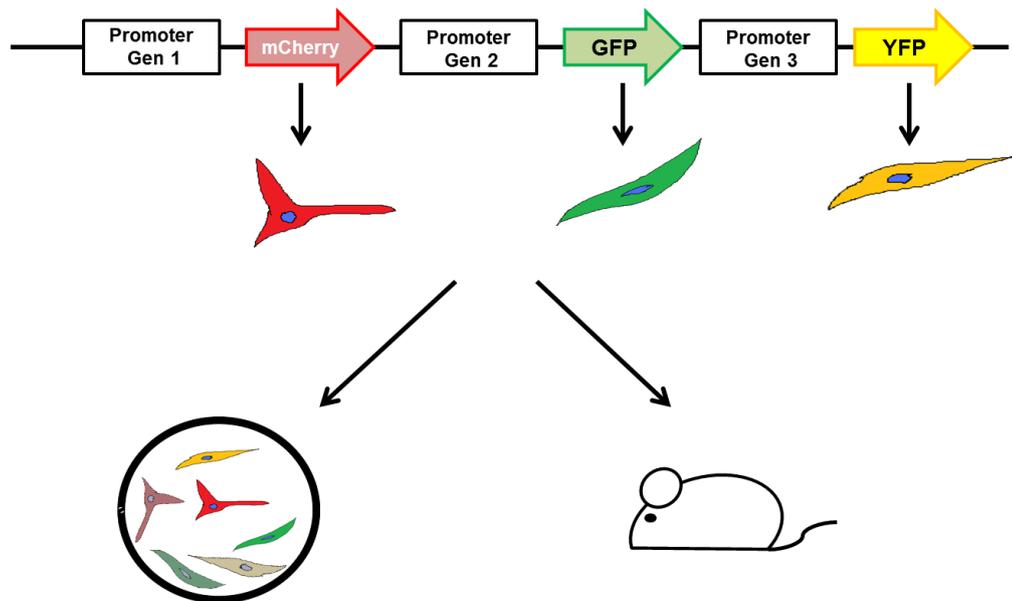


Abbildung 1-6: Das LungGlow-1 Prinzip.

Durch die Verwendung eines Konstrukts mit drei zellspezifischen Promotoren und drei verschiedenen Reportergenen ist es möglich, drei verschiedene Zelltypen parallel fluoreszent zu markieren.

Für das Projekt wird das Konstrukt kloniert, *in vitro* auf Funktionalität getestet, über eine Pronuklear-Injektion in die Maus eingebracht und eine *in vivo* Charakterisierung der Fluoreszenz-Expressionen vorgenommen.

1.4.2 HSV-TK – Charakterisierung der Fibrozyten durch gezielte Eliminierung

1.4.2.1 Das Ziel des HSV-TK Projektes

Die Bedeutung zirkulierender Fibrozyten in Lungenerkrankungen mit fibrotischen Aspekten wurde in diversen Publikationen nachgewiesen, wobei eine abschließende Charakterisierung dieser Zellpopulation in Bezug auf die verschiedenen Krankheitsbilder weiterhin schwierig bleibt (s. Kapitel 1.2.1). Daher wird eine transgene Mauslinie (Stamm CD-1) generiert, in der die Thymidin-Kinase von *Herpes simplex* unter dem Enhancer/Promoter der $\alpha 2$ -Untereinheit des *Kollagen I* exprimiert wird. Durch die gezielte Eliminierung der Fibrozyten in knochenmarkstransplantierten Mäusen soll eine Charakterisierung ihrer Rolle im experimentellen Tiermodell der PAH stattfinden.

Für dieses Projekt wird das von MD Craig Henke [75] zur Verfügung gestellte Konstrukt (Enhancer/Promoter der $\alpha 2$ -Untereinheit des *Kollagen I*-HSV-TK-GFP) *in vitro* auf Funktionalität getestet und über eine Pronuklear-Injektion für weitere *in vivo* Experimente in die Maus eingebracht.

1.4.3 LungGlow 2 – Dynamische Visualisierung von Trans-Differenzierungsprozessen

Lineage Tracing und die Untersuchung von Zellschicksalen unter der Berücksichtigung verschiedener wissenschaftlicher Fragestellungen hat zu der Entwicklung einiger Methoden und verschiedener „Werkzeuge“ (Tools) zur Visualisierung und Unterscheidung von Zellpopulationen *in vitro* und *in vivo* geführt, wobei der Schwerpunkt bei der tierexperimentellen Arbeit zunehmend auf den umfangreichen Möglichkeiten der genetischen Manipulation liegt (s. Kapitel 1.3.1).

1.4.3.1 Das Ziel des LungGlow 2 Projektes

Für das LungGlow 2 (LG2) Projekt sollen die Grundlagen für *knock-in* Mauslinien generiert werden, die in Kombination mit vorhandenen Mauslinien ein universell einzusetzender Tool für die Visualisierung von Trans-Differenzierungsprozessen darstellen. Dies soll durch einen gezielten Fluoreszenz-Farbumschlag während des Trans-Differenzierungsprozesses ermöglicht werden.

1.4.3.2 Das Konzept von LungGlow 2

Die Kreuzung verschiedener, genetisch veränderter Mauslinien ist die Basis des LungGlow 2 Konzeptes (Abbildung 1-7). Die Mauslinie 1, deren Existenz vorausgesetzt wird, trägt ein Transgen, bei dem ein für einen bestimmten Zelltyp spezifischer Promoter die Expression der Cre-Rekombinase antreibt. Solche Mauslinien sind in vielfältiger Form erhältlich (vgl. The Jackson Laboratory, <http://www.jax.org>). Die zellspezifische Expression sorgt dafür, dass die Cre-Rekombinase nur in den zu untersuchenden Zellen vorliegt und aktiv ist.

Die Mauslinien 2 und 3 basieren auf dem Tet-System (s. Kapitel 1.3.1.3) und werden miteinander gekreuzt (Mauslinie 4). Mauslinie 2 (Existenz wird vorausgesetzt, vgl. The Jackson Laboratory, <http://www.jax.org>) ist dabei Trägerin des *tTA* (Transaktivators) unter der Kontrolle eines zellspezifischen Promoters, Mauslinie 3, deren Generierung im Rahmen dieses Projektes vorbereitet werden soll, trägt das *TetO*, kombiniert mit der *FLP*. Unter permanenter Gabe des Doxycyclin wird die Expression der FLP unterdrückt, ansonsten wird die FLP in den Zellen exprimiert, in denen der zellspezifische Promoter das tTA exprimiert.

Die andere, im Rahmen von LG2 zu generierende Mauslinie ist die Mauslinie 5. Das Konstrukt, das in die Maus gebracht werden soll, basiert auf bekannten Rekombinase-Systemen (s. Kapitel 1.3.1.1) und besteht aus einem ubiquitär exprimierenden Promoter, der durch eine geflochte Expressionskassette von einem Reporter gen (codierend für eine rote Fluoreszenz; *mCherry*) getrennt ist. Ein weiterer ubiquitärer Promoter wird durch eine *FRT-site* flankierte Expressionskassette vom Reporter gen *GFP* getrennt. Die ubiquitären

Promotoren würden in jeder Zelle der Maus die Fluoreszenzen exprimieren, was jedoch durch die Expressionskassetten unterbunden wird.

Ferner wird die Mauslinie 5 mit den Mauslinien 1 und 4 gekreuzt.

In der so entstehenden Mauslinie 6 können die Trans-Differenzierungsprozesse wie folgt visualisiert werden: in einem spezifischen Zelltyp 1 ist der Promoter 1 aktiv, der die Expression der Cre-Rekombinase antreibt. Die Cre-Rekombinase erkennt die für sie spezifischen *loxP-sites* und entfernt die dazwischen liegende Expressionskassette, so dass der ubiquitäre Promoter im spezifischen Zelltyp das Reporterogen mCherry exprimiert. Der spezifische Zelltyp 1 wird durch eine rote Fluoreszenz markiert.

In einem zweiten spezifischen Zelltyp der gleichen Maus ist der Promoter 2 aktiv und treibt (nach Absetzen des Doxycyclin) die Expression der FLP-Rekombinase an. Die Rekombinase erkennt die spezifischen *FRT-Sequenzen* und entfernt das dazwischenliegende DNA-Segment, wodurch der ubiquitär exprimierende Promoter im zweiten Zelltyp die Expression des GFP ermöglicht.

Wenn Zelltyp 1 in Zelltyp 2 trans-differenziert, also durch den Differenzierungsprozess seinen Status bezüglich der Gen- und damit auch Promoteraktivitäten ändert, wird der zellspezifische Promoter 1 ausgeschaltet. Die Zelle exprimiert jedoch weiterhin mCherry unter dem ubiquitären Promoter, da durch die vorherige Rekombinase-Aktivität eine permanente DNA-Veränderung vorgenommen wurde. Durch die Trans-Differenzierung wird der Promoter 2 aktiviert, die FLP-Rekombinase exprimiert und die *FRT* flankierte Expressionskassette aus dem Genom entfernt. So exprimiert die zum Zelltyp 2 trans-differenzierte Zelle jetzt auch die zweite Fluoreszenz, das GFP. In der Zelle entsteht aus der Überlappung der roten und grünen Fluoreszenzen eine gelbe Fluoreszenz, die als solche *in vitro* wie *in vivo* detektierbar ist.

Durch diese distinkte Fluoreszenzveränderung kann die Differenzierung des einen in den anderen Zelltyp verlässlich visualisiert werden. Die so markierten Zellen können durch ihre Fluoreszenz isoliert werden, um sie weiterreichenden Untersuchungen auf molekularbiologische und proteinbiochemische Eigenschaften zuzuführen, mit der Intention, konkrete Einblicke in die *Remodeling*-Prozesse verschiedener Lungenerkrankungen zu bekommen.

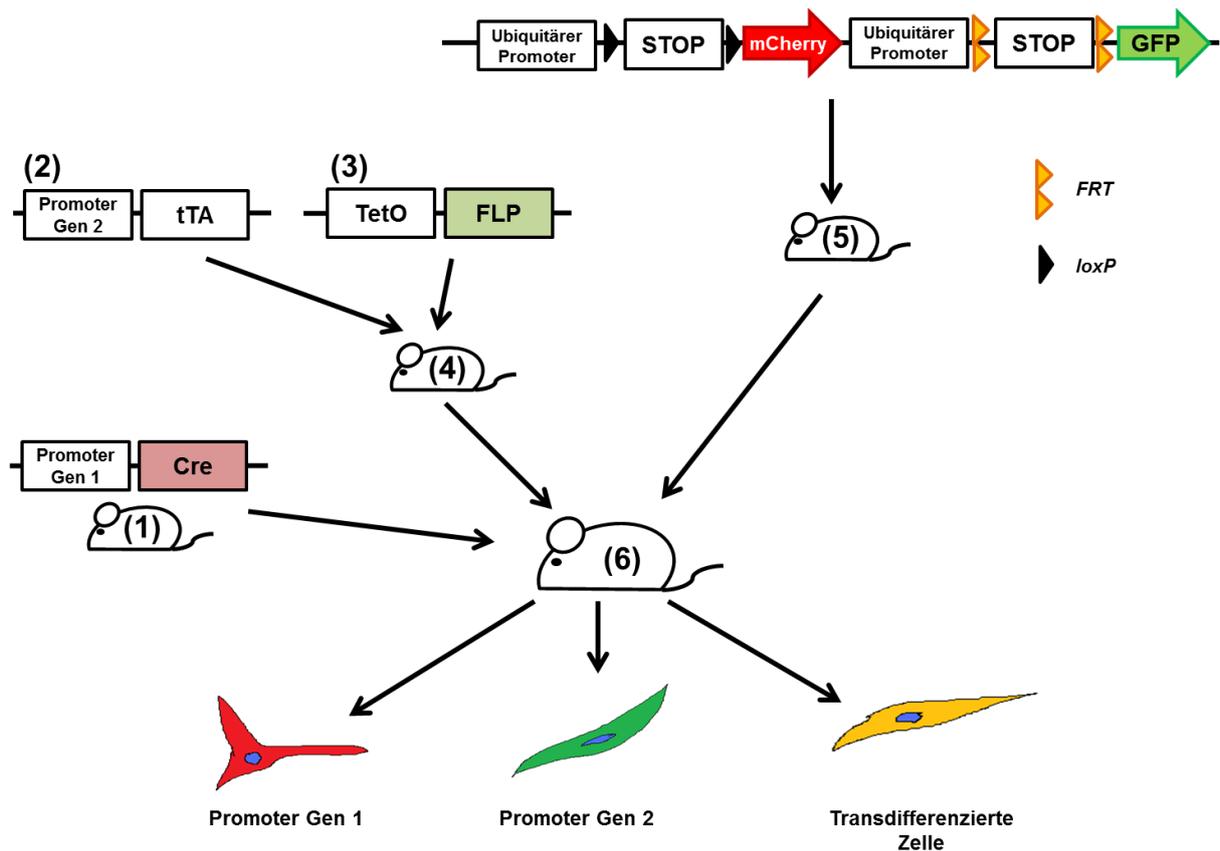


Abbildung 1-7: Das LungGlow 2 Prinzip.

Die im Rahmen dieses Projektes zu generierenden Konstrukte sind die der Mauslinien (3) und (5). Weitere Erläuterungen des Prinzips s. Kapitel 1.4.3.2.

Die Spezifität des LungGlow 2 Konzeptes ergibt sich einzig aus den einzukreuzenden „PromotorX“-Mauslinien, die je nach wissenschaftlicher Fragestellung veränderbar, frei wählbar und in verschiedenen Systemen schon vorhanden sind. Das bedeutet, dass durch diesen Tool Trans-Differenzierungsprozesse auf der Basis existierender Promoter-Cre- oder Promoter-Tet-System-Mauslinien visualisiert werden können, ohne für die jeweilige wissenschaftliche Fragestellung neue Mauslinien generieren zu müssen.

Für dieses Projekt werden die jeweiligen Konstrukte für die Mauslinie 3 und 5 designt, kloniert und *in vitro* auf ihre Funktionalität getestet. Danach erfolgt die Vorbereitung für den spezifischen *knock-in* in definierte DNA-Loci (*HPRT* und *Rosa26*).

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 2-1: Verwendete Laborgeräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Abzug		Norddeutsche Laborbau, Kaltenkirchen, Deutschland
Amaya Transfektionssystem CO ₂ -Inkubator	DHD Autoflow CO ₂ Air- Jacketed incubator	Lonza Köln GmbH, Deutschland NUAIRE, Plymouth, USA
Elektroporation	GenePulser Xcell Eucaryotic System CE- Module	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
FACS-Gerät	FACSalibur LSR II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Feinwaage	Pinnacle	Denver Instruments/ Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C)	STA 358 CP 3501	Liebherr, Heidesheim, Deutschland
Gefrierschrank (-80 °C)	HEF	New Brunswick Scientific/ Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Geldokumentation	Gel iX Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Gelkammern	Model 40-1214	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Homogenisierer	Precellys 24	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Inkubationsschüttler	Innova 44R	New Brunswick Scientific/ Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Inkubatoren Kryostat	Heraeus Inkubator Leica CM3050 S	Thermo Scientific, Waltham, USA Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Kühlschrank (4 °C)	STA++ 305L CP 3501	Liebherr, Heidesheim, Deutschland
Mikroskop	Primo Vert DMI 3000 B	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Mikrowelle	Konfokalmikroskop Zeiss LSM 710 R93ST-AA	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland Sharp Electronics GmbH, Hamburg, Deutschland
Multipette	Multipette Plus	Eppendorf Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
NanoDrop	NanoDrop ND-1000	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
pH-Meter	PH 211	HANNA Instruments

Photospectrometer	Smart Spec™ Plus	Deutschland GmbH, Kehl am Rhein, Deutschland Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Pipetten	Eppendorf <i>Research</i>	Eppendorf Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetboy	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
Power-Supplier (Agarosegel)	EV 261	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Power-Supplier (Western Blot)	PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Protein-Konzentrationsbestimmer für 96-well Platten	Infinite M200Pro	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Rollapparat	SRT6 Stuart	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, USA
Schüttler	Unimax2010	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Nu-437 Klassell TypA/B3	NUAIRE, Plymouth, USA
Thermocycler	Mastercycler gradient 5333 Thermocycler	Eppendorf Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Thermocycler	Mastercycler gradient 5333 Thermocycler	Eppendorf Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Trockenschrank	Memmert Typ VLE 500	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Vortexer		IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q plus	EMD Millipore Corporation, Billerica, USA
Western Blot Entwickler	Image Quant LAS 4000	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Transferkammer für Western Blot		Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Zählkammer für Zellen	Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland
Zentrifugen	Fresco14	Heraeus/ Thermo-Scientific Waltham, USA
	Eppendorf 5430R	Eppendorf Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
	Multifuge 3S-R	Heraeus/ Thermo-Scientific Waltham, USA
	Multifuge 1S	Heraeus/ Thermo-Scientific Waltham, USA
	Sorvall RC6+ C130 1T	Thermo-Scientific Waltham, USA Labnet international, Edison, USA

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2-2: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Aceton	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid/Bis (Roti-Phorese Gel 30)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Agarose NEEO ultra	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Agarose (Low melting)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
Chloroform:Isoamylalkohol (24:1)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Ethanol unvergällt (Emsure®)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol vergällt	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Ethidumbromid (1 %)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Fluka Analytical, Schweiz
Formaldehyd (≤ 37%)	VWR (Syngene) Darmstadt, Deutschland
Glycerin 99,5 % p.a.	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Glycerin 99,5 % p.a.	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
MOWIOL	Merck, Darmstadt, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Natrium-Acetat	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Di-natriumhydrogenphosphat-dihydrat	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge (NaOH; Pellets)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
SDS-Pellets	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide (SDS)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Stickstoff (N ₂), flüssig	Linde AG Pullach, Deutschland
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland

Triton® X-100	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Tween 80	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
β-Mercaptoethanol/ 2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Laborbedarfsartikel

Tabelle 2-3: Laborbedarfsartikel für Molekularbiologie, Histologie, Proteinbiochemie und Mausearbeit.

Artikel	Beschreibung	Hersteller
Anästhetika	Ketaminhydrochlorid (Ketavet®)	Bayer Vital Leverkusen, Deutschland
	Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2 %)	
	Isofluran CP	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland
Deckgläser	24 x 36 mm 24 x 60 mm	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Einbett-Medium	Tissue-Tek®	Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Einbettkassetten	Disposable Base Molds 24 x 24 30 x 24	Thermo Scientific, Waltham, USA
Einweg-Auslaufpipetten	1 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Einwegspritzen	1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Filter zur Medien-Herstellung	Bottle Top Filter 150 ml, 45 mm	Corning Incorporated Life Sciences, Twerksbury, USA
Filter-Aufsatz für Spritzen	SM 16532	VWR (Syngene) Darmstadt, Deutschland
Handschuhe	Rotriprotect-Nitrilhandschuhe	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Haushaltsbindfaden	Nr.12	
Homogenisiergefäße	Precellys Keramik-Kit 1.4 mm	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Instrumentenreiniger	Helizyme®	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Kanülen	20G, 24G, 26G, 27G, 30G	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Kryo-Röhrchen	2 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Laborflaschen		Schott, Mainz, Deutschland
Mikrotom	MB Dynasharp	Thermo-Scientific Waltham, USA
Objektträger	SuperFrostPlus (26 x 76 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland

	SuperFrost Ultra Plus® (26 x 76 mm)	
Objekträger-Kasten		Carl Roth GmbH & Co Karlsruhe, Deutschland
Operationsbesteck	Mikro-Pinzetten Moria MC31 & 32 Mikroschere ToughCut® Spring Scissors	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pap Pen	Dako Pen	Dako, Glostrup, Dänemark
Parafilm		American National Can Menasha, Wisconsin, USA
PCR-Reaktionsgefäße	PCR 8er Streifen und Deckel	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Petrischalen		VWR, Darmstadt, Deutschland
Pinsel		Carl Roth GmbH & Co Karlsruhe, Deutschland
Plastikpipettenspitzen	0,5-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl	Sarstedt AG & Co Nümbrecht, Deutschland
Plastikpipettenspitzen mit Filter	0,5-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
PP-Falconröhrchen	15 ml, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße	0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml und 2,0 ml Safe-Lock	Sarstedt AG & Co Nümbrecht, Deutschland
Schikane-Kolben		Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Sieb	20 µm, 40 µm	BD Falcon, Durham, USA
Skalpell	Typ 10	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Stechkartusche	C 206 Butan/Propan	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Sterilfilter	0,45 µm, 0,2 µm	Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
Western Blot Transfermembran	BioTrace™ NT Pure Nitrocellulose	Pall Filtersystems GmbH, Crailsheim, Deutschland
Zellkulturflaschen Filter Top	Kulturflasche/ Volumen: 75/ 250 und 25/ 50	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten, 12-well		Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten, 6-well		Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (8 Vertiefungen)	Cultureslides	BD Falcon, Durham, USA
Zellschaber	25 cm steril	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

2.1.4 Zellkultur

2.1.4.1 Allgemeine Medien und Lösungszusätze für die Zellkultur

Tabelle 2-4: Medien und Lösungszusätze für die Zellkultur.

Komponente	Hersteller
2,5 % Trypsin	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
0,05 % Trypsin-EDTA	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dispase	VWR (Syngene) Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12)	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), high glucose, GlutaMax mit Pyruvat	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium, ohne Glukose	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (1x) without Ca & Mg	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
huEGF (human Epidermal Growth Factor, 0,5 µg)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
β -Estradiol	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
bFGF (basic human Fibroblast Growth Factor, 100 ng)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Fibronektin	VWR (Syngene) Darmstadt, Deutschland
Fötales Bovines Serum (FBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
HEPES-Pufferlösung	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
Insulin-Transferrin-Selenium X	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Opti-MEM®	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich

Tabelle 2-5: Zusätze und Transfektionsreagenzien für Zellkulturexperimente.

Reagenzien	Hersteller
7-AAD (7-amino-actinomycin D)	eBioscience, San Diego, USA
Amaxa Basic Nucleofector Kit Prim. Fibroblasts	Lonza Köln GmbH, Deutschland
Doxycyclin Hydrochlorid	Fagron, Barsbüttel, Deutschland
Ganciclovir	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lipofektamin™ 2000	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PolyJet™ DNA Transfektion Reagent	SignaGen, Rockville, USA
TurboFect	Thermo Scientific, Waltham, USA
Puffer	Zusammensetzung
FACS-Puffer	PBS + 2 % FBS + 0,1 % NaN ₃

2.1.4.2 Verwendete Zelltypen und Kulturmedien

Tabelle 2-6: Verwendete Zelltypen.

Zellart	Bezeichnung	Organismus
Primärzellen	Alveolare Typ II Zellen	Maus Wildtyp
	arterielle glatte Muskelzellen (SMC)	Ratte
	Fibroblasten	Maus Wildtyp
Zelllinien	MLE 12 (<i>mouse lung epithelium</i>)	Maus
	NIH/3T3 (<i>mouse embryonic fibroblast</i>)	Maus
	HEK 293T (<i>human embryonic kidney cells</i>)	Mensch

Tabelle 2-7: Kulturmedien für die Zellkultur.

Zelltyp	Medien/Lösungen	Volumen
Primäre Fibroblasten	FCS (5 %)	5 ml
	HEPES Puffer (10 mM)	6,5 ml
	Penicillin/Streptomycin (1 %)	1 ml
	bFGF (100 ng)	2 µl
	huEGF (0,5 µg)	5 µl
	Insulin-Transferrin-Selenium X	1 ml
	DMEM/Glutamax	ad 100 ml
Primäre arterielle glatte Muskelzellen	L-Glutamin (2 mM)	5 ml
	Penicillin/Streptomycin (1 %)	5 ml
	FCS (10 %)	50 ml
	DMEM-F12	ad 500 ml

Primäre Alveolare Typ II Zellen	FCS (10 %)	5 ml
	Penicillin/Streptomycin (1 %)	0,5 ml
	DMEM/Glutamax	ad 50 ml
MLE 12 Zelllinie	FCS (2 %)	10 ml
	Penicillin/Streptomycin (1 %)	5 ml
	HEPES Puffer (10 mM)	5 ml
	Hydrocortison (10 µmol)	500 µl
	β-Estradiol (10 mM)	500 µl
	Insulin-Transferrin-Selenium X	5 ml
	L-Glutamin (2 mM)	5 ml
	DMEM-F12	ad 500 ml
NIH/3T3 Zelllinie	FCS (10 %)	50 ml
	Penicillin/Streptomycin (1 %)	5 ml
	DMEM/Glutamax	ad 500 ml
HEK Zelllinie	FCS (10 %)	50 ml
	Penicillin/Streptomycin (1 %)	5 ml
	DMEM/Glutamax	ad 500 ml
Kryo-Konservierungslösung (100 ml)	FCS	90 ml
	DMSO	10 ml

Tabelle 2-8: Verwendete Antikörper und Komponenten für die Alveolare Typ II Zell- Isolierung.

Antikörper	Hersteller
CD 16/32 (3 µl auf 10 ml Zellsuspension)	BD Falcon, Durham, USA
CD 45 (7 µl auf 10 ml Zellsuspension)	BD Falcon, Durham, USA
Weitere Komponenten	
Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles	Promega, Madison, USA

2.1.5 Molekularbiologie

2.1.5.1 Reagenzien, Kits, Standards und Enzyme für die Molekularbiologie

Tabelle 2-9: Verwendete Reagenzien, Kits und Standards für Molekularbiologie.

Reagenzien, Kits, Standards	Hersteller
Agarose Gel Extraction Kit	Jena Bioscience, Jena, Deutschland
dNTPs	Thermo Scientific, Waltham, USA
Expand Long PCR Kit	Roche Mannheim, Deutschland
Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit	Jena Bioscience, Jena, Deutschland
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA
ImmoMix™ Red	Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland
MangoMix™	Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland
NucleoBond Xtra Maxi	Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland
PCR Purification Kit	Jena Bioscience, Jena, Deutschland
QIAEX® II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

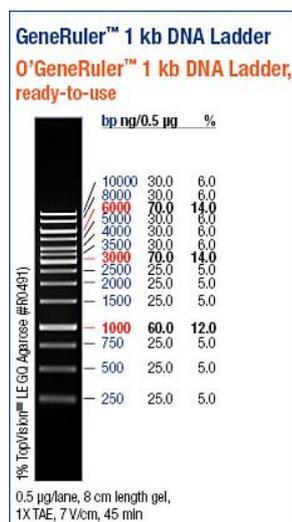


Abbildung 2-1: Verwendeter Größenstandard für die Molekularbiologie (Thermo Scientific).

Tabelle 2-10: Enzyme für die Molekularbiologie.

Komponente	Hersteller
Fast AP™ Alkaline Phosphatase	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>DpnI</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
Polymerasen	GoTaq
	Gold Taq
	Pfu Polymerase
Proteinase K	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Restriktionsenzyme	Thermo-Scientific Waltham, USA
T4 Polynucleotide Kinase (T4 PNK)	Thermo-Scientific Waltham, USA
T4 DNA Ligase	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.1.5.2 Medien, Puffer, Zusätze und Materialien für die Molekularbiologie

Tabelle 2-11: Medien, Puffer, Zusätze und Materialien für die Molekularbiologie.

Name	Zusammensetzung	Hersteller
Ampicillin	100 mg/ml dH ₂ O Stock (80 µg/ml in Lösung)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
IPTG (100 mM)	0,2383 g IPTG ad 10 ml dH ₂ O	
Kanamycin	30 mg/ml dH ₂ O Stock (1:1000 in Lösung)	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
KCM-Puffer (5x)	0,5 M KCl 0,15 M CaCl ₂ 0,25 M MgCl ₂ in dH ₂ O ad 100 ml dH ₂ O	
LB-Agar (Luria/Miller)		Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium (Lennox)		Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Millipore Membran Filter 0,025 µm		EMD Millipore Corporation, Billerica, USA
Proteinase K (20 mg/ml) Puffer:	50 mM Tris/HCl pH 7,5 (1 M Stock → 2ml) 5 mM CaCl ₂ (100 mM Stock → 2ml) ad 100 ml dH ₂ O →autoklavieren 500 mg Proteinase K ad 25 ml Puffer	
SOB Medium	250 mM KCl (2,5 ml 1M Stock) ad 1000 mL LB-Medium + 5 M NaOH → pH 7 → autoklavieren	
SOC Medium	1 M MgCl ₂ (100 µl) 1 M MgSO ₄ (100 µl) 1 M Glucose (200 µl) ad 10 ml SOB-Medium	
TAE-Puffer (50x)	Tris Base 242 g Essigsäure 57 ml 0,5 M EDTA 100 ml ad 1000 ml dH ₂ O	
TE-Puffer	10mM Tris (1M Stock) 2,5 ml 1 mM EDTA (0,5 M Stock) 500 µl ad 250 ml dH ₂ O	
X-Gal	400 mg X-Gal ad 10 ml DMSO	

Tabelle 2-12: Lösungen für die Minipräparation ohne Kit.

Lösung	Zusammensetzung
GTE-Puffer (Lösung 1)	Glucose (50 mM) 0,9 g Tris/HCl (1 M) 2,5 ml, pH 8,0 EDTA (10 mM) 2 ml (aus 0,5 M EDTA) ad 100 ml dH ₂ O; autoklavieren
NaOH/SDS (Lösung 2)	SDS (20 %) 0,5 ml NaOH (2 M) 2,0 ml ad 10 ml H ₂ O
KOAc/HOAc (Lösung 3) (Kaliumacetat/Essigsäure)	KOAc (5 M) 60 ml HOAc (100 %) 11,5 ml ad 100 ml H ₂ O

Die für die Klonierung verwendeten Primer und Vektorkarten sind im Anhang (Kapitel 10) hinterlegt.

2.1.6 Histologie

Tabelle 2-13: Verwendete Antikörper und Zusatz-Komponenten für die Histologie.

Primäre Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Mouse Collagen Type I	Rabbit	1 : 70	Meridian Life Science, Memphis, USA
IgG Rabbit	Rabbit	1 : 100	Cell Signaling Biolabs, Danvers, USA
pro SP-C polyclonal	Rabbit	1 : 100	EMD Millipore Corporation, Billerica, USA
α-smooth muscle actin-Cy3-gekoppelt	Mouse	1 : 400	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
GFP- Fluorescein Isothiocyanat (FITC) gekoppelt	Goat	1 : 300	Acris, Herford, Deutschland
Sekundäre Antikörper			
Alexa Fluor [®] 488	Goat anti Rabbit IgG	1 : 500	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Alexa Fluor [®] 555	Goat anti Rabbit IgG	1 : 500	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Kernfärbung			
Topro 3		1 : 1000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Puffer und Seren	Zusammensetzung	Herkunft	Hersteller
Histopuffer	3 % BSA 0,2 % Triton X ad PBS		
Goat Serum		Goat	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich

2.1.7 Proteinbiochemie

Tabelle 2-14: Reagenzien für die Proteinisolierung und den Bradfordtest.

Reagenz zur Proteinisolierung	Hersteller
EDTA Solution (0,5 M)	Thermo-Scientific Waltham, USA
Halt™ Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo-Scientific Waltham, USA
Pierce® RIPA-Buffer	Thermo-Scientific Waltham, USA
Protein-Konzentrationsbestimmung	Hersteller
Bio-Rad DC™ Protein Assay Reagent A	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Bio-Rad DC™ Protein Assay Reagent S	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Bio-Rad DC™ Protein Assay Reagent B	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Tabelle 2-15: Puffer und Proteinstandards für Acrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.

Gelelektrophorese	
4x Elektrophoresepuffer	12 g Tris 57,6 g Glycin 30 ml SDS (15%) ad 1 l H ₂ O
Sammelgel (1x)	125 mM Tris/HCl pH 6,8 625 µl 6% Acrylamid (30 %) 500 µl 0,10 % SDS (15%) 16,6 µl 0,05 % APS (10%) 12,5 µl 0,10 % TEMED 2,5 µl H ₂ O 1,34 ml
Trenngel (1x)	375 mM Tris/Cl pH 8,9 1,5 ml 10% Acrylamid (30 %) 2,0 ml 0,10 % SDS (15%) 40 µl 0,05 % APS (10%) 30 µl 0,10 % TEMED 6 µl H ₂ O 2,4 ml
Western Blot	
Blocking Solution (5 %)	5 g Milchpulver ad 100 ml PBS/Tween
Blotting Puffer (1x)	6 g Tris/HCl 28,8 g Glycin 20 ml SDS (10 %) 2,4 g Kaliumdihydrogenphosphat 2,09 Kaliumchlorid
PBS (10x)	14,4 g di-Natriumhydrogenphosphat 80 g Natriumchlorid ad 1 l H ₂ O
PBS (1x)	100 ml PBS (10x) ad 1 l H ₂ O
PBS/Tween (PBT)	PBS (1x) + 1ml Tween 80
Proteinstandards	
MagicMark™ XP Standard	Thermo-Scientific Waltham, USA
Novex® Sharp Standard	Thermo-Scientific Waltham, USA

Tabelle 2-16: Antikörper für Western Blot.

Primäre Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Flp polyclonal antibody	Rabbit	1 : 500	Diagenode, Seraing, Belgien
β-Aktin	Mouse	1 : 3000	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sekundäre Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Horseradish Peroxidase (HRP)	Goat anti Rabbit	1 : 1000	Thermo Scientific, Waltham, USA
Horseradish Peroxidase (HRP)	Goat anti Mouse	1 : 1000	Thermo Scientific, Waltham, USA
Entwicklerlösung		Hersteller	
SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate			Thermo Scientific, Waltham, USA
- Stable Peroxide Buffer + Luminol/Enhancer Solution (1:1)			
Stripping Buffer		Hersteller	
Restore™ Western Blot Stripping Buffer		Thermo Scientific, Waltham, USA	

2.1.8 Mauslinien

Tabelle 2-17: Verwendete Mauslinien.

Bezeichnung	Herkunft
C57BL/6J Wildtyp	Charles River, Erkrath, Deutschland
CD-1	Charles River, Erkrath, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die von K. B. Mullis 1987 entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der *in vitro*-Amplifikation bestimmter Nukleinsäuresequenzen und wurde im Thermocycler [79] durchgeführt.

Tabelle 2-18: Ansatz und Amplifizierungsprotokoll für eine Standard-PCR (50 μ l).

Volumina pro 50 μ l		Amplifizierung	
		Zeit	Temperatur
1 μ l	dNTPs		
1 μ l	Sense-Primer		
1 μ l	Antisense-Primer	2 – 10 min	95 °C
1 μ l	Template-DNA	30 s - 1 min	95 °C
5 μ l	Polymerase Puffer	30 – 40 s	50 – 65 °C
0,7 μ l	Taq-Polymerase	abh. von Template	72 °C
40,3 μ l	dH ₂ O	10 min	72 °C

} 25 – 35x

Auf eine einleitende thermische Denaturierung der zu amplifizierenden DNA (2 – 10 min bei 95 °C) folgten 25 - 35 Amplifizierungszyklen. Jeder Amplifizierungsschritt bestand aus einer Denaturierung (30 s - 1 min bei 95 °C), einem *Annealings*schritt (abhängig von der Spezifität der Primer, 50 – 65 °C, 30 – 40 s) und der Extension (72 °C, Dauer abhängig von der Länge der zu amplifizierenden DNA und der Amplifizierungsgeschwindigkeit der eingesetzten Polymerase). Ein finaler Extensionsschritt von 10 min. beendete die PCR (Tabelle 2-18). Zur Entfernung eines methylierten DNA Templates (Plasmid) im Ansatz wurde optional ein *DpnI* Verdau für 1 h bei 37 °C durchgeführt. Das Protokoll ist im Sinn einer standardisierten Anleitung zu betrachten und wurde je nach verwendetem PCR-Reaktionssystem den empfohlenen Herstellerangaben angepasst.

2.2.1.2 Plasmid-DNA Präparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Für eine Minipräparation ohne Kit wurden 2 – 5 ml Bakteriensuspension zentrifugiert (1 min, 13000 rpm) und mit 100 μ l Lysepuffer (GTE, Lösung 1) resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 200 μ l NaOH/SDS (Lösung 2) mit einem kurzen Vortex-Schritt und die Zugabe von 150 μ l KOAc (Lösung 3). Nach mehrfachem Invertieren konnten die Zelltrümmer und die präzipitierten Proteine durch Zentrifugation (10-20 min, 13000 rpm) entfernt werden. Nach Überführung des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß wurde die DNA mit 300 μ l Isopropanol für 20 min bei -20°C präzipitiert und das Pellet durch Zentrifugation (10 – 20 min,

13000 rpm, 4 °C) gewonnen. Nach dem Waschschrift mit 500 µl eiskaltem 70 % Ethanol, Zentrifugation (1 min, 13000 rpm, 4 °C) und anschließender Trocknung (55 °C) wurde das Pellet in 50 µl dH₂O aufgenommen. Die Probenlagerung erfolgte bei -20 °C. Als Kit für die Minipräparation wurde entsprechend der Herstellerangaben das Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit verwendet. Die Bakterienzellen wurden durch die Zugabe entsprechender Puffer lysiert und die Zellbestandteile unter alkalischen Bedingungen denaturiert. Durch die anschließende Renaturierung der Plasmid-DNA konnte die DNA von weiteren Zellbestandteilen durch Zentrifugation getrennt werden. Die Plasmid-DNA konnte mit 30 – 50 µl dH₂O von der Anionen-Austauscher Säule eluiert werden. Für eine Plasmid-Präparation mit höherer DNA-Ausbeute wurde das NucleoBond Xtra Maxi Kit nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.1.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Eine Aufreinigung von Nukleinsäuren nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau diente der Entfernung von Salzen, Oligonukleotiden, Enzymen und Pufferkomponenten. Die Aufreinigung erfolgte mit dem PCR Purification Kit entsprechend der Herstellerangaben.

2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Nukleinsäurekonzentration in DNA- oder RNA-Lösungen zu bestimmen erfolgte die photometrische Messung der Extinktionen bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ und $\lambda = 280 \text{ nm}$ mit dem NanoDrop Spektrophotometer. Als Maß für die Reinheit der DNA bzw. RNA diente der Quotient der beiden Messwerte ($OD_{260}/OD_{280} > 1,8$). Die Nukleinsäurekonzentration in µg/µl wurde automatisch angezeigt.

2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird für die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe verwendet. Für die analytische Auftrennung einer PCR oder eines Restriktionsverdau wurden die Proben mit 1/6 Volumen 6x Probenpuffer beschwert und in einer horizontalen Flachgel-Apparatur aufgetrennt. Je nach Fragmentgröße wurden 0,8 – 2 %-ige Agarosegele in 1x TAE-Puffer eingesetzt die mit 1 µl 1 % Ethidiumbromid auf 50 ml Agarosegel versetzt wurden. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen doppelsträngiger DNA und fluoresziert unter UV-Licht. Die Auftrennung erfolgte bei 100 – 150 V für 30 – 60 min. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde ein 1 kb oder 100 bp DNA-Marker verwendet.

Bei einer präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die DNA-Bande der gewünschten Größe mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mittels des Agarose Gel Extraction Kits nach Angaben des Herstellers gewonnen. Die Durchführung der Dialyse mit Dialysemembranen (Millipore) diente dem Zweck der weiteren

Entfernung von Salzen aus der DNA-Extraktion, wobei die eluierte DNA für ca. 20 – 50 min auf der Membran dialysiert wurde.

2.2.1.6 Präparation von DNA für die Elektroporation in ES-Zellen

Für die Elektroporation in ES-Zellen wurde die Plasmid-DNA linearisiert. Der dafür verwendete Ansatz für den Restriktionsverdau enthielt 100 µg DNA in 100 µl H₂O. Es wurden 5 µl Restriktionsenzym eingesetzt. Der Verdau erfolgte nach Herstellerangaben des Enzyms für ca. 4 – 5 h, wobei nach 3 h ein Aliquot des Verdau durch eine Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert wurde. Die vollständige Linearisierung zeigte sich durch eine distinkte Bande auf dem Gel.

2.2.1.7 Phenol-Chloroform-Fällung

Zu dem Restriktionsverdau (Kapitel 2.2.1.6) wurden in gleichem Volumen (hier 100 µl) Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben und durch Vortexen gemischt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei maximalen rpm (14000 rpm) für 2 min. Nach der Zugabe der gleichen Menge Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) (100 µl) und anschließendem Vortexen wurde wiederum bei maximalen rpm (14000 rpm) für 2 min zentrifugiert. Es ergab sich eine Phasentrennung, wobei die obere Phase abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt wurde.

2.2.1.8 Ethanol-Natriumacetat-Aufreinigung

Für die Aufreinigung der abgenommenen Phase (Kapitel 2.2.1.7) wurden 250 µl Ethanol (100 %) und 10 µl Natrium-Acetat (3 M) im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die obere Phase aus der Phenol-Chloroform-Fällung wurde zugegeben, wobei eine Berührung des Ethanol-Natriumacetatgemischs durch die Pipette vermieden wurde. Es erfolgte die DNA Fällung für mindestens 1 h (bis über Nacht (ÜN)) bei -20 °C. Eine erneute Zentrifugation erfolgte bei maximaler Geschwindigkeit für 30 min, 4 °C. Das Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol (RT) gewaschen und bei maximaler Geschwindigkeit für 5 min, RT zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in 50 µl sterilem PBS aufgenommen.

2.2.2 Molekularbiologische Klonierungsmethoden

2.2.2.1 Restriktionsverdau der DNA

Für einen Restriktionsverdau wurden Restriktionsendonukleasen und Pufferkomponenten verwendet. Im Verdau wurden 0,2 – 10 µg DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen versehen und nach den jeweiligen Herstellerangaben 1 – 3 h inkubiert. Das Reaktionsvolumen differierte zwischen 10 µl für analytische und 100 µl für präparative Ansätze.

2.2.2.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um bei Ligationen die Religation verdauter DNA mit sich selbst oder anderen DNA-Fragmenten zu verringern, wurden die 5'-Phosphatgruppen geschnittener Plasmid-DNA durch die Zugabe alkalischer Phosphatase (1 – 1,5 µl) für 1 – 3 h bei 37 °C dephosphoryliert. Die anschließende Aufreinigung des Ansatzes diente der Entfernung der Phosphatase, um eine spätere Dephosphorylierung der Insert-DNA zu verhindern.

2.2.2.3 Ligation

Bei der Ligation wurden 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA mit Hilfe einer T4-Ligase ligiert. Zu diesem Zweck wurden die geschnittenen, aufgereinigten Vektoren und DNA-Inserts im Verhältnis 1:3 – 1:6 in einem Gesamtvolumen von 10 - 20 µl angesetzt. Die Ligation wurde nach Herstellerangaben mit 0,8 µl T4-Ligase und dem entsprechenden Puffer 1 – 3 h bei Raumtemperatur (RT) oder 16 °C ÜN durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Transformation in chemisch kompetente *E. coli* Zellen (XL1-Blue).

2.2.2.4 Klonierung in pGEM[®]-T-Vektor

Die pGEM[®]-T-Vektoren (Promega) sind linearisierte Vektoren, die am 3'-Ende Thymidinüberhänge besitzen und damit eine direkte Ligation frisch amplifizierter PCR-Produkte ermöglichen, die ihrerseits komplementär Adeninüberhänge aufweisen. Ein 10 µl Ligationsansatz bestand aus 0,5 µl pGEM[®]-T-Vektor, 5 µl 2x Ligase Puffer, 1 µl T4-Ligase und der nach Herstellerangaben empfohlenen DNA-Konzentration der PCR ad 10 µl dH₂O. Die Ligation erfolgte bei 4°C ÜN. Der Ligationsansatz wurde in chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue transformiert und mittels Blau-Weiß-Selektion identifiziert. Hierfür wurde der Transformationsansatz auf LB-Resistenz-Platten mit X-Gal (25 µl) und IPTG (7 µl) ad 100 µl H₂O ausgestrichen und ÜN bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.5 Klonierung synthetischer DNA-Produkte

Die Planung des zu klonierenden synthetischen DNA-Produktes erfolgte unter dem Aspekt, dass es als Primer, also Einzelstrang-DNA, bestellt werden konnte. Dabei wurden sowohl der *Sense*- als auch der *Antisense*-Primer entsprechend designt, wobei die Restriktionsschnittstellen, die verwendet werden sollten, beim anschließenden *Annealing*-Prozess als Überhang stehen blieben. Für die Reaktion wurden 10 µl TE-Puffer und je 5 µl *Sense*- und *Antisense*-Primer (unverdünnter Stock) eingesetzt und das *Annealing*-Programm (Tabelle 2-19) sowie anschließend das Phosphorylierungsprogramm (Tabelle 2-20) durchgeführt. Dieser Reaktionsansatz wurde bei 37 °C, 30 min inkubiert und bei 65 °C, 15 min inaktiviert. Für die Ligation wurden 50 µg Vektor und 1 µl der Reaktion als Insert eingesetzt, wobei diese 1:10 verdünnt wurde.

Tabelle 2-19: *Annealing*-Ansatz und -Programm zur Klonierung synthetischer DNA.

Ansatz pro 10 µl		Programm		
Volumina		Temperatur	Zeit	Zyklus
5 µl	Sense-Primer	95 °C	2 min	1x
5 µl	Antisense-Primer	95 °C	20 s	99x, pro Zyklus -0,1 °C
10 µl	TE-Puffer	15 °C	∞	

Tabelle 2-20: Phosphorylierungsprogramm zur Klonierung synthetischer DNA.

Volumina	
4 µl	synthetische Doppelstrang-DNA
1 µl	T4 Polynucleotide Kinase (PNK)
1 µl	10 mM ATP
2 µl	10x PNK-Puffer A (für <i>Forward-Reaction</i>)
12 µl	dH ₂ O

2.2.2.6 Plasmidtransformation in chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen

Zur Kultivierung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde von einer ÜN Kultur eine 1:100 Verdünnung mit LB-Medium hergestellt und diese bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 120 rpm und 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend für 10 min, 4000 rpm, 4 °C zentrifugiert und das Bakterienpellet in 50 ml kalter 80 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min erfolgte eine Zentrifugation für 10 min, 4000 rpm, 4 °C, das Pellet wurde erneut in 6 ml kalter 80 mM CaCl₂ + 20 % Glycerol resuspendiert. Nach dem Aliquotieren wurden die Bakterien bei -80 °C gelagert. Die chemisch kompetenten Zellen waren so in der Lage, Fremd-DNA aufzunehmen.

Für die Plasmidtransformation wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut, der Ligationsansatz hinzugegeben und durchmischt. Nach einer 15 - 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 75 s bei 42 °C und eine kurze Inkubation auf Eis für 1 min. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium wurden die Bakterien für 1 – 2 h bei 37 °C und 900 rpm geschüttelt,

danach bei 6000 rpm für 2 min zentrifugiert und das erhaltene Pellet in 100 µl Überstand wieder resuspendiert. Die Kultur wurde auf LB-Resistenz-Platten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C ÜN.

2.2.2.7 Plasmid-Transformation in *E. coli* SCS110

Für die Transformation wurden 10 µl KCM-Puffer (5x) mit 5 µl Plasmid-DNA (1:100 verdünnte Mini-Präparation) und 35 µl H₂O angesetzt und auf Eis gestellt. Die *E. coli* SCS110 wurden auf Eis aufgetaut, 50 µl der Bakterien zu dem DNA-Ansatz gegeben und durchmischt. Es erfolgte eine 20 min Inkubation auf Eis und eine drauf folgende 10 min Inkubation bei Raumtemperatur. Dem Ansatz wurden 500 µl SOC-Medium zugegeben und die Bakterien 1 h, 37 °C, 900 rpm geschüttelt. Es folgte eine Zentrifugation von 2 min bei 6000 rpm und RT und eine Ausplattierung auf LB-Agar Platten der entsprechenden auf dem Plasmid kodierten Antibiotika-Resistenz. Die Platten wurden bei 37 °C ÜN inkubiert.

2.2.2.8 (Einzel-)Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde zur Überprüfung des Ligations-Erfolges durchgeführt. Hierfür wurden einzelne *E. coli*-Kolonien von den Resistenz-Platten in kleine Volumina (15 µl) LB-Medium mit Antibiotikum überführt und für 1 h bei 37 °C, 900 rpm im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde eine Standard-PCR (vgl. Kapitel 2.2.1.1) mit angepasstem Volumen (15 µl) durchgeführt, wobei die gewählten Primer - wenn möglich - innerhalb des ligierten Inserts lagen. Bei der Aufnahme des Plasmids mit Insert konnten die positiven Kolonien an Hand des PCR-Produktes identifiziert werden. Als Negativkontrolle diente das Plasmid ohne Insert, als Positivkontrolle das Plasmid, aus dem das Insert stammte. Als Template wurden bis zu 3 µl Bakteriensuspension eingesetzt. Für die Reaktionsansätze wurden vorgefertigte Mastermixe wie MangoMix™ oder ImmoMix™ verwendet. Der einleitende *Melting*-Schritt wurde bei 95 °C, 10 min entsprechend lang gewählt, um die Bakterien aufzubrechen. Es erfolgte die Kultivierung der restlichen Bakteriensuspension der positiven Klone in größerem Volumen LB-Medium mit Antibiotikum ÜN.

2.2.2.9 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte auf Agar-Platten mit den jeweiligen Antibiotika entsprechender Konzentrationen. Die Platten wurden unter aeroben Bedingungen bei 37 °C 18 – 24 h kultiviert und konnten danach für 4 – 6 Wochen bei 4 °C gelagert werden. Zur Anzucht der *E. coli* Stämme wurden von Einzelkolonien der Agar-Platten oder aus Glycerinstocks Übernachtskulturen in LB-Medium (mit Antibiotikazusätzen) angeimpft und bei 37 °C und 120 rpm ÜN geschüttelt.

2.2.2.10 Bakterienglycerinstocks

Für eine langfristige und kontaminationsfreie Lagerung der *E. coli*-Stämme und generierten Klone wurden 750 µl einer ÜN-Flüssigkultur mit 250 µl 100%-igem Glycerin (autoklaviert) gemischt und bei -80 °C eingefroren.

2.2.2.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte als letzter Schritt der Klonierung mit dem Ziel der Überprüfung der klonierten Sequenz im Detail. Hierfür wurde die Plasmid-DNA nach den Angaben der Anbieter für eine Sequenzierung (StarSEQ, Mainz oder Eurofins MWG, Ebersberg) in einer entsprechenden Verdünnung zusammen mit Primern verschickt. Bei längeren Sequenzen empfahl sich, für je 600 – 700 bp fortlaufende Primer zu verwenden. Die Ergebnisse der Sequenzierung waren 1 bis 2 Tage später abrufbar und konnten mit bestimmten Programmen (*ChromasLite* zur Darstellung der Sequenzen, *ClustalW2* für Sequenzvergleiche) mit der gewünschten Sequenz verglichen werden.

2.2.3 Zellkultur

Die Arbeit in der Zellkultur dient der Isolierung, Bereithaltung und Manipulation von primären Zellen und Zelllinien.

2.2.3.1 Die Kultivierung eukaryotischer Zellen

Um eine Kontamination der eukaryotischen Zellen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen (Werkbank mit vertikalem *Laminar-Flow*) durchgeführt, wobei ausschließlich autoklavierte oder sterile Materialien und Substanzen zum Einsatz kamen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen mit Filter-Schraubverschluss bei 37 °C, 5 % CO₂-Begasung und einer Wasserdampfatosphäre. Die eingesetzten Medien für die Zellkultur wurden vor der Benutzung auf 37 °C im Wasserbad erwärmt.

2.2.3.2 Trypsinisierung / Passagierung von Zellen

Die Passagierung der Zellen erfolgte durch die Trypsinisierung, sobald die Zellen annähernd konfluent gewachsen waren. Die Zellen wurden zunächst mehrfach mit PBS gewaschen, um das Kulturmedium zu entfernen. Nach der Überschichtung der Zellen mit Trypsin-EDTA (2,5 %-ig) wurden diese für 5 – 15 min bei 37 °C inkubiert. Die so gelösten Zellen wurden in ein Falcon überführt, in dem zur Beendigung der Trypsinisierungsreaktion 1 ml Kulturmedium vorgelegt war. Eine Zentrifugation der Zellen erfolgte bei RT für 10 min, 1500 rpm. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Medium oder Puffer resuspendiert.

2.2.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl konnte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt werden. Diese bestand aus einem Objektträger mit definierter vertiefter Fläche (0,1 mm), die durch ein Deckglas abgedeckt wurde, so dass sich ein definiertes Volumen ergab. Zwischen Objektträger und Deckglas wurden 10 µl trypsinisierte Zellen gegeben. Unter dem Lichtmikroskop konnte mit Hilfe der in die Zählkammer eingeätzten Quadrate (4 Großquadrate/je 16 Einzelquadrate) die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension ermittelt werden. Die Berechnung erfolgte mit der Formel

$$N \times V \times 10^4$$

wobei N als die Anzahl der Zellen pro Großquadrat, V als der Verdünnungsfaktor und 10^4 als Kammerkonstante (durch das Design - spezifisches Volumen - der Kammer vorgegeben) definiert waren.

2.2.3.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Für die dauerhafte Lagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff (-196 °C) wurden die Zellen trypsinisiert, bei 1000 rpm, 10 min, RT zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden in 1 ml einer Konservierungslösung (1:10 DMSO:FCS) aufgenommen und in Kryo-Röhrchen überführt. Diese wurden für 1 h bei -20 °C gekühlt und ÜN in -80 °C überführt. Abschließend erfolgte die Lagerung der Röhrchen in flüssigem Stickstoff.

Für die erneute Kultivierung der Zellen wurden diese zügig auf 37 °C (Schwenken im Wasserbad) erwärmt und dann in eine Kulturflasche mit entsprechendem Medium (vorgewärmt) überführt. Zur Entfernung des zytotoxischen DMSO wurde das Medium nach 24 h ausgetauscht.

2.2.3.5 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion ist eine Möglichkeit, Fremd-DNA in eukaryotische Zellen einzubringen. Je nach Zelltyp wurde eine darauf abgestimmte Transfektionsmethode verwendet. Allen Methoden ist gemeinsam, dass die DNA nur vorübergehend (in der Regel bis zu 48 h) in den Zellen aktiv ist und danach degradiert wird. Transfektionen wurden hier verwendet, um klonierte Konstrukte *in vitro* auf ihre Funktion zu testen.

Die Verwendung des Lipofektamin™ 2000 erfolgte nach Herstellerangaben. Die Ratio von DNA:Lipofektamin betrug zwischen 3:1 bis 1:8 je nach Zelltyp. Es wurden während der Inkubationszeit 50:50 Opti-MEM®:Kulturmedium oder 100 % Opti-MEM® verwendet. Nach 4 bis 6 h erfolgte ein Medium-Wechsel. Die Zellen wurden für bis zu 48 h im Inkubator bewahrt. Anschließend erfolgte die Auswertung.

Das AMAXA-System wurde zur Transfektion von Fibroblasten verwendet. Hierbei wurde das Basic Nucleofector® Kit Prim. Fibroblast nach Herstellerangaben verwendet.

Des Weiteren wurde PolyJet™ DNA Transfektion Reagent nach Herstellerangaben verwendet.

Die Transfektion in HEK-Zellen (HEK 293T) erfolgte mittels TurboFect nach Herstellerangaben. Hierbei wurden pro Ansatz (*6-well plate*) insgesamt 3 µl DNA (insgesamt) in 300 µl DMEM in ein Reaktionsgefäß vorgelegt, 6 µl TurboFect hinzugegeben und der Ansatz kurz gemischt. Nach einer 20 minütigen Inkubation wurde der Ansatz auf die Zellen getropft und die Zellen für bis zu 48 h im Inkubator aufbewahrt.

Die Gesamtmenge der eingesetzten DNA ergab sich aus den empfohlenen Angaben der Hersteller der Transfektionsreagenzien bezogen auf die eingesetzte *Well*-Größe in der Zellkultur.

2.2.3.6 Behandlung der transfizierten Zellen mit Doxycyclin

Für die Experimente zur Feststellung der Doxycyclinsensitivität des LungGlow 2 Systems wurde zunächst eine Stocklösung des Doxycyclin von 10 ng/µl, gelöst in H₂O, hergestellt und dunkel bei -20 °C eingelagert. Die für die Experimente verwendeten HEK-Zellen lagen, kultiviert in *6-well plates*, in exakt 3 ml Medium vor. Während der Inkubation der Transfektionsreagenzien wurden von den 3 ml Medium 300 µl entfernt und das Doxycyclin (0,3 µl für 1 ng/ml Endkonzentration; 3 µl für 10 ng/ml Endkonzentration) in die noch nicht transfizierten Zellen vorgelegt. Durch die Zugabe des Transfektionsansatzes von 300 µl ergaben sich wiederum die 3 ml Medium, die zum Erhalt der Endkonzentration des Doxycyclin notwendig waren. Auf Grund der Halbwertszeit von Doxycyclin von 24 h wurden am nächsten Tag 0,15 µl für 1 ng/ml Endkonzentration und 1,5 µl für 10 ng/ml Endkonzentration nachgelegt. Die Auswertung des Ergebnisses fand nach 48 h statt.

2.2.3.7 Isolierung von Zellen für die Durchfluss-Cytometrie

Für die Analyse mittels Durchfluss-Cytometrie wurden die Zellen (aus *6-well plates*) 1 – 2 x mit PBS gewaschen. Die Ablösung der Zellen erfolgte durch Trypsinisierung (Kapitel 2.2.3.2). Die Zellen wurden in einem 15 ml Falcon gesammelt und als Waschschrift mit 10 ml PBS aufgefüllt um den Verlust von Zellen zu minimieren. Es erfolgte eine Zentrifugation von 1000 rpm, 10 min, danach wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Übertragung der Zellen in FACS-Röhrchen erfolgte durch ein 40 µm Sieb zur Zellvereinzlung. Die Zugabe von 5 µl 7-AAD markierte tote und sterbende Zellen, die so bei der anschließenden Durchfluss-Cytometrie ausgeschlossen werden konnten.

Die Auswertung der ermittelten Daten wurden anschließend mit der frei zugänglichen Software „Flowing Software“ Version 2.5.0 von Perttu Terho (Turku Centre for Biotechnology, University of Turku, Finland; www.flowingsoftware.com) vorgenommen.

2.2.4 Mausearbeit

Die Generierung der transgenen Mäuse sowohl bei der Pronuklear-Mikroinjektion sowie der spezifischen *Knock-ins* erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Thomas Braun. Hierfür wurde vom Institut eine eigene Teilarbeitsgruppe eingerichtet, die zentral alle direkt mit der Generierung verbundenen Aufgaben durchführt.

2.2.4.1 Genotypisierung

2.2.4.1.1 Optimierung der Primer

Die Optimierung der Primerpaare für die Genotypisierung war unverzichtbar, da hierdurch eine maßgebliche Fehlerquelle für eine Genotypisierungs-PCR vermieden wurde. Für die Optimierung wurden entsprechend des Konstruktes *Forward*- und *Reverse* Primer ausgewählt, die (im Fall von *random integration*) im Konstrukt lagen. Als gute Bedingungen für eine PCR galten eine begrenzte Fragmentgröße (ca. zwischen 200 und max. 1000 bp) sowie ähnliche Schmelztemperaturen (T_m) der Primer. Für die Simulation einer genomischen DNA mit dem mikroinjizierten Produkt wurden jeweils 0,2 ng / 2 ng / 20 ng genomische Wildtyp-DNA mit 1 pg / 0,1 pg / 0,01 pg / 0,001 pg des Plasmids gemischt, aus dem das mikroinjizierte Konstrukt stammte. Verschiedene Verdünnungen in der genomischen DNA zeigten die Sensitivität der Primer. Es wurde eine Standard-PCR (10 – 15 μ l Ansatz) mit einem vorab bestimmten Mastermix (z. B. MangoMix™ oder ImmoMix™) bei festgelegter Annealing-Temperatur der PCR ($T_m - 5$ °C) durchgeführt. Die anschließende Agarose-Gelelektrophorese gab Auskunft über die Binde-Spezifität sowie Detektions-Sensitivität der einzelnen Primerpaare. Ausgewählt wurde das Primerpaar, das bei höchster Sensitivität eine distinkte Bande im Gel zeigte. Die Binde-Spezifität konnte, wenn notwendig, durch die Anpassung der *Annealing*-Temperatur erhöht werden, wobei die PCR so lange optimiert wurde, bis keine unspezifischen Banden mehr zu erkennen waren. Die so eingestellte PCR wurde für jede Genotypisierung, die auf das entsprechende Konstrukt abzielte, verwendet. Die Einhaltung des Protokolls, speziell der *Annealing*-Temperatur, des Mastermix und der verwendeten PCR-Maschine war hierzu erforderlich.

2.2.4.1.2 DNA-Isolierung aus Mäuseschwänzen und Genotypisierungs-PCR

Ein Stück der Mäuseschwänze (*Tails*), die von den jungen Mäusen innerhalb der ersten 10 Tage nach der Geburt stammten, wurden ÜN mit dem Lyse-Puffer für die Genotypisierung unter Schütteln (ca. 500 rpm, 55 °C) verdaut. Dem Lyse-Puffer wurde

Proteinase K (10 µl des 20 mg/ml Stock) frisch zugefügt, um eine Proteinkontamination bei der anschließenden DNA-Isolierung zu minimieren. Am folgenden Tag wurde das Lysat für 10 min, 13000 rpm, RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein anderes Eppendorfgefäß überführt und 500 µl Isopropanol zugefügt. Nach mehrfachem Invertieren erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm, 10 min, 4 °C. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70 % EtOH (750 µl) gewaschen und bei 13000 rpm, 5 min, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet für 10 – 20 min getrocknet. Dieses wurde im Anschluss in 50 µl RNAs/DNAse –freiem Wasser aufgenommen, unter Schütteln (1 h bis ÜN) bei 55 °C resuspendiert, die DNA-Konzentration gemessen und die PCRs für die Genotypisierung durchgeführt. Hierzu wurden die vorher optimierten Primer und das optimierte PCR-Protokoll (Kapitel 2.2.4.1.1) verwendet und die PCRs mit jeweils mit 100, 500 und 1000 ng DNA durchgeführt. Als Positivkontrolle galt das Plasmid, dessen DNA für die Erstellung der transgenen Mauslinie verwendet wurde, als Negativkontrolle das verwendete Wasser. Die dreimalige PCR mit den unterschiedlichen DNA-Konzentrationen wurde für *Founder*, also die ersten Nachkommen nach der Mikroinjektion, durchgeführt. Für alle weiteren Generationen, die aus der Zucht der positiven *Founder* entstammten, wurde als Standard 1 µl DNA aus den *Tails* pro PCR eingesetzt.

2.2.4.2 Lungenentnahme aus der Maus

Die Maus wurde nach den Angaben in den entsprechenden Tierversuchsanträgen getötet. Danach wurde der Bauchraum der Maus geöffnet und das Diaphragma zur Lunge hin entfernt. Die Rippen wurden nahe des Brustbeins durchtrennt und auseinandergebogen, so dass der Zugang zu Lunge und Herz möglich war. Die Perfusion der Lunge mit PBS (ca. 10 – 20 ml) erfolgte mittels einer Spritze in die rechte Herzkammer. Für die Präparation der Lunge für Kryoblöcke wurde nach der Perfusion die Trachea der Maus freigelegt und locker ein Faden um sie geschlungen. Durch einen Schnitt zwischen die Knorpelspannen erfolgte die Eröffnung der Trachea, in die eine Kanüle eingeführt und diese mit dem Faden in der Trachea befestigt wurde. In einem weiteren Schritt wurde ca. 1 ml PBS:Tissue-Tek® (1:1) in die Lunge gespritzt, die Kanüle entfernt und die Trachea mit dem Faden verschlossen. Die Lunge konnte jetzt entfernt werden, indem die Ligamente durchtrennt wurden. Sie wurde in Tissue-Tek® eingebettet und in flüssigem Stickstoff langsam eingefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C.

2.2.4.3 Isolierung von primären alveolaren Typ II Zellen

Für die Isolierung von primären alveolaren Typ II Zellen wurden zunächst Kulturschalen in der Zellkultur mit Fibronectin beschichtet, dabei wurde 1ml Fibronectin + PBS auf je ein *well* (6-*well*) verteilt. Es folgte ein Inkubationsschritt für mindestens 2 h bei RT.

Die Mäuse wurden entsprechend des Protokolls getötet. Nach der Perfusion der Lunge mit PBS und der Eröffnung der Trachea wurde eine sterile Kanüle in die Trachea eingeführt und mit einem Faden fixiert. Pro Tier wurden jetzt 1,5 ml Dispase (vorgewärmt auf 37 °C) und 0,5 ml *Low melting* Agarose zügig hintereinander in die Lunge gespritzt. Die Spritze mit Kanüle verblieb 5 min in der Trachea, damit die Agarose aushärten konnte. Dann wurde die Lunge mit Herz herauspräpariert. Dafür wurde die Trachea am Faden angehoben, vor dem Faden Richtung Kopf abgetrennt, die Trachea mit der Pinzette gegriffen und die Lunge vorsichtig von den Rippen gelöst. Dabei konnte die Lunge am Herzen hochgezogen werden. Lungen wurden in 1x PBS in eine Petrischale gelegt. Die entfernte Lunge wurde freipräpariert, das Herz, überschüssiges Fett und die Trachea entfernt. Es folgte die Überführung der Lunge in ein 15 ml Falcon mit 3 ml Dispase und eine Inkubierung für mindestens 40 min auf dem Rollschüttler. Währenddessen wurde die DNase vorbereitet, indem 5 mg in 5 ml Medium (DMEM/HEPES) gelöst wurden, wovon 2,5 ml zu 22,5 ml DMEM/HEPES gegeben wurden (0,01 % DNase). Es wurden pro Lunge 7 ml davon in eine Petrischale (60 mm) vorgelegt. Nach der Übertragung der Lunge vom Falcon in die Petrischale wurde sie mit Skalpell und Pinzetten gründlich zerkleinert und bei RT 10 min auf einem Schüttler geschwenkt. Das Restgewebe in der Dispase, das sich noch im Falcon befand wurde zusammen mit der Lunge zunächst durch ein 100 µm-, dann durch ein 40 µm Sieb filtriert und zentrifugiert (1200 rpm, 8 min, 4 °C), der Überstand entfernt und das Pellet in Medium für ATII-Zellen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit biotinyliertem CD32- und biotinyliertem CD45-Antikörper für mindestens 30 min im 37 °C Wasserbad inkubiert. Währenddessen erfolgte die Vorbereitung der Streptavidin-Beads (Promega), wobei 1 mg Beads auf 70 µg Gesamt-Antikörper (AK)-Menge 2x in sterilem PBS gewaschen wurde. Zwischen den Waschschritten wurden die Beads für je 10 min im Magnetseparator vom PBS separiert und nach Entfernung des alten PBS in neuem PBS resuspendiert. Die letzte Wiederaufnahme der Beads erfolgte in 2 – 4 ml PBS. Die inkubierten Zellen wurden zentrifugiert (1200 rpm, 8 min, 4 °C), der Überstand entfernt, in 7 ml ATII-Zellmedium resuspendiert und die Beads zu den Zellen transferiert. Die Zelllösung wurde 30 min bei RT auf dem Rolltisch geschüttelt, dann für 15 min in den Magnetseparator gegeben. Der Abnahme des Überstandes folgte die Überführung in ein Falcon und ein Zentrifugationsschritt (1200 rpm, 8 min, 4 °C). Dieser Überstand wiederum wurde verworfen und das Pellet in 1 ml ATII-Zellmedium (pro Lunge) resuspendiert. Das Fibronectin von den inkubierten *wells* wurde entfernt, ca. 1 ml ATII-Zellmedium vorgelegt und die isolierten Zellen hinzugegeben. Am nächsten Tag erfolgte ein Waschschriff, indem das Medium abgesaugt wurde, 2x mit PBS gewaschen und neues Medium hinzugegeben wurde. Der ATII-Zell-Phänotyp blieb für etwa 72 h erhalten.

2.2.4.4 Isolierung von primären Lungenfibroblasten aus der Maus

Die freipräparierte Mauslunge wurde über das Herz mit 20 ml PBS perfundiert und dann entnommen. Das Herz sowie die Trachea und das Fettgewebe wurden entfernt und die Lunge in eine Petrischale mit Dispase II Lösung (2 mg/ml) übertragen. Die Lunge wurde in sehr kleine Stücke geschnitten, in der Dispase Lösung für 1 h bei RT unter beständigem Schütteln inkubiert, die Lösung zusammen mit den Lungenstücken in einem Falconröhrchen gesammelt und bei RT für 10 min bei 200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Lungenstückchen mit 2 ml Fibroblastenmedium aufgenommen und in eine 3 cm Zellkulturschale gelegt. Ein Mediumwechsel erfolgte am nächsten Tag. Nach 3 – 6 Tagen wurden adhärenente Fibroblasten sichtbar und die Lungenstücke konnten entfernt werden.

2.2.4.5 *in vitro* Behandlung der primären Lungenfibroblasten mit Ganciclovir

Die isolierten Lungenfibroblasten (Wildtyp und HSV-TK transgen) wurden in 3 cm-Kulturschalen mit 2 ml Medium kultiviert und mit 0, 0,02, 0,5, 2,5, 10 und 100 μ M GCV (Endkonzentration im Medium) für 5 Tage behandelt. Dazu wurden Stocklösungen von 25 mM (6,38 mg GCV in 1 ml H₂O), 1 mM (0,2552 mg GCV in 1 ml H₂O) und μ M GCV (Verdünnung 1:500 von 1 mM Stocklösung) hergestellt und wie folgt eingesetzt:

Tabelle 2-21: Eingesetzte Ganciclovir-Konzentrationen für die *in vitro* Überprüfung der aus HSV-TK transgenen Mäusen isolierten Lungenfibroblasten.

Stock GCV	Endkonzentration GCV im Medium (μ M)	Volumen GCV (μ l)	Volumen Medium (ml)
25 mM	100	8	2
	10	0,8	2
1 mM	5	10	2
	2	4	2
	0,5	1	2
	0,2	0,4	2
2 μ M	0,02	20	2

Die Quantifizierung der lebenden und toten Zellen erfolgte mittels einer Vitalfärbung mit Trypanblau.

2.2.5 Histologische Methoden

2.2.5.1 Erstellung von Kryoschnitten

Für die Erstellung von Kryoschnitten wurden die in -80 °C eingefrorenen Kryoblöcke langsam auf -20 °C erwärmt. Im Kryostat Leica CM 3050 S wurden die Blöcke mit flüssigem Tissue-Tek® am Schneidetisch befestigt und bei -20 °C im Gerät ausgehärtet. Das Schneidetischchen mit dem Kryoblock wurde in das Gerät eingespannt und das umliegende Tissue-Tek® mit Hilfe einer Mikrotomklinge entfernt, bis das Gewebe frei lag. Anschließend wurde die Schnittdicke eingestellt, einzelne Schnitte der entsprechenden Dicke vorgenommen, durch einen Pinsel fixiert und auf einen Objektträger übertragen. Das überstehende Tissue-Tek® konnte vorsichtig mit einem Tuch und Ethanol rund um das Gewebe entfernt werden. Die Objektträger wurden über Nacht bei RT getrocknet und eingefroren (-20 °C) bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.5.2 Färbung von Kryoschnitten

Das hier vorgestellte Protokoll ist ein Standardprotokoll, das je nach Erfahrungswerten oder Herstellerangaben bezüglich der Antikörperinkubationen, Probenvorbereitung abgeändert werden musste.

Im Vorfeld der Färbung wurden die Objektträger mit Bleistift beschriftet und die Gewebe mit eiskaltem Methanol:Aceton (1:1) für 10 min fixiert. Mit einem Pap Pen wurde das Gewebe umrandet und anschließend mit Serum (Serum des Wirtsorganismus des 2. AK) für 1 h RT blockiert. Der 1. AK, verdünnt nach Herstellerangaben mit Histopuffer, wurde 1½ h bis ÜN bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe mit PBS gewaschen und der 2. AK inkubiert (RT, maximal 1 h). Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurde im Fall von Doppelfärbungen eine 2. Färbung mit 1. und 2. AK nach oben genanntem Protokoll durchgeführt. Vor der Kernfärbung wurde mit PBS gründlich gewaschen. Die Kernfärbung erfolgte mit Topro3 (1:1000 verdünnt, 15 – 20 min, RT). Nach der Kernfärbung erfolgte ein letzter, sehr gründlicher Waschschrift mit PBS. Anschließend wurde der Objektträger sorgfältig mit einem Tuch von PBS gereinigt. Das Einbetten des Gewebes erfolgte mit Mowiol, wobei ein Tropfen davon auf das Gewebe gegeben wurde. Das Gewebe wurde vorsichtig ohne zu drücken und luftblasenfrei mit einem Deckglas bedeckt. Eine Aushärtung des Mowioles erfolgte bei 4 °C ÜN im Dunkeln, um die Färbung zu erhalten. Die Färbung blieb ca. 2 Wochen stabil. Die Färbung mit einem Fluorescein Isothiocyanat (FITC) konjugierten GFP Antikörpers stellte eine Besonderheit dar, da in diesem Fall der 1. AK (gegen GFP) mit einem fluoreszierenden Protein FITC (495 nm Absorptionswellenlänge, 528 nm Emissionswellenlänge) konjugiert war, womit eine zusätzliche Färbung mit einem 2. AK

entfiel. So konnte eine schwache GFP Expression durch eine einfache Färbung verstärkt werden.

2.2.6 Proteinbiochemie

2.2.6.1 Proteinisolierung - Zellen

Für die Proteinisolierung wurden transfizierte HEK-Zellen zunächst mit PBS gewaschen und mit der Lösung für Proteinisolierung, 68,6 µl RIPA-Puffer + 0,7 µl Protease Inhibitor + 0,7 µl EDTA pro *well* (einer *6-well plate*), bedeckt. Die Zellablösung erfolgte mittels eines Zellschabers und die nun viskose Substanz wurde in ein in Eis vorgekühltes Reaktionsgefäß übertragen. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 30 min bei gelegentlichem Vortexen, im weiteren Verlauf ein Zentrifugationsschritt (max. Geschwindigkeit, mind. 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde wiederum in ein neues, vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

2.2.6.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Für die Protein-Konzentrationsbestimmung nach Lowry wurde der Bio-Rad DC™ Protein Assay nach Herstellerangaben verwendet. Die nach Kapitel 2.2.6.1 isolierten Proteine wurden auf Eis aufgetaut und 1:20 mit H₂O verdünnt. Pro Messung wurden 5 µl verdünntes Protein verwendet, die Messung erfolgte pro Probe als Duplikat. Als Standard wurden je 5 µl 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,1 mg/ml BSA ebenfalls als Duplikat eingesetzt. Bei jeder Messung wurde dieser Standard mitgeführt. Die 5 µl wurden in einer 96-*well* Platte der Zellkultur vorgelegt und 25 µl Bio-Rad DC™ Protein Assay Reagenz A* (entspricht 1 ml Protein Assay Reagenz A + 20 µl Protein Assay Reagenz S) hinzugegeben. Durch 200 µl des Protein Assay Reagenz B wurde die kolorimetrische Reaktion gestartet. Nach einer Inkubationsphase (im Dunkeln) von 15 min unter leichtem Schütteln erfolgte eine automatische Messung bei 750 nm (im Infinite M200Pro). Die Proteinkonzentration (mg/ml) wurde auf der Basis des definierten Standards angegeben. Die Feststellung des Mittelwertes der Duplikatsmessungen wurde manuell erstellt und eine Verdünnung der Proteinproben auf 3 mg/ml vorgenommen. Je Probe wurden 30 µl angesetzt (entspricht 3x 30 µg/10µl Auftrag auf das Acrylamidgel), mit Ladepuffer versehen und bei 95 °C für 10 min denaturiert. Die Lagerung der denaturierten Proteinproben erfolgte bei -20 °C.

2.2.6.3 Protein-Gelelektrophorese und Western Blot

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach dem Protokoll von [80] durchgeführt. Von den denaturierten Proteinproben wurden je 10 µl (30 µg) auf das Polyacrylamidgel aufgetragen, das aus einem 6 %igen Sammelgel und einem 10 %igen Trenngel bestand. Die Auftrennung erfolgte bei 80 Volt (V) im Sammelgel für ca. 30 min und

bei 120 V für ca. 1½ h im Trenngel. Es wurden zwei Proteinstandards mitgeführt, ein vorgefärbter und damit sichtbarer Marker (Novex® Sharp Standard) sowie ein weiterer, im Western Blot entwickelbarer Standard (MagicMark™). Im Anschluss daran erfolgte die Übertragung der Proteine im Western Blot für 1 h bei 100 V vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran. Die so immobilisierten Proteine wurden kurz in PBS+Tween gewaschen und dann bei RT für 1 h in 5 % Milchpulver (*Blocking Solution*) unter beständigem Schütteln blockiert. Die Inkubation des 1. AK - in *Blocking Solution* angesetzt - erfolgte zusammen mit der Western Blot Membran in einem 50 ml Falcon ÜN bei 4 °C auf dem Rollschüttler. Nach Waschschritten (3x 10 min mit PBS+Tween) wurde der entsprechende 2., Meerrettich-Peroxidase konjugierte AK, angesetzt in *Blocking Solution*, für 1 h bei RT auf dem Rollschüttler inkubiert. Es folgten wiederum drei Waschschrritte (3x 10 min mit PBS+Tween). Danach wurde der Western Blot mit 1 ml SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Entwicklerlösung im Image Quant LAS 4000 entwickelt. Zur Analyse des zur Kontrolle herangezogenen β -Aktin als *housekeeping* Protein wurden die AK durch den Restore™ Western Blot Stripping Buffer wieder entfernt und eine weitere Proteindetektion wie oben beschrieben durchgeführt. Die verwendeten AK und Lösungen entsprechen denen in Tabelle 2-15 und Tabelle 2-16 aufgelisteten.

2.2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Durchfluss-Cytometrie erfolgte mittels einer Varianzanalyse, empfohlen für drei oder mehr Gruppen (*one-way ANOVA*). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen wurde für einen p-Wert $\leq 0,05$ definiert. Für die Auswertung wurde GraphPad Prism Version 5 verwendet.

2.2.8 Erklärung zu den Tierversuchs-Genehmigungen

Die hier durchgeführte Generierung genetisch veränderter Mäuse sowie die tierexperimentellen Arbeiten sind beim Regierungspräsidium in Darmstadt registriert und genehmigt.

Tabelle 2-22: Nachweis und Aktenzeichen der genehmigten Tierversuche.

Projekt	Titel der Genehmigung	Genehmigungsnummer
LungGlow 1	„LungGlow“	B 2/298
Col1 ^{HSV-TK-GFP}	HSV-TK-GFP	B 2/314
LungGlow 2	„LungGlow 2“	B 2/323

3 Ergebnisse

3.1 LungGlow 1 – Die Visualisierung dreier Zelltypen in der Lunge

3.1.1 Die Generierung des LungGlow 1 Plasmids

Das LungGlow 1 Konstrukt basierte auf dem Plasmid pGL3 [81], einem molekularbiologisch manipulierbaren Vektor mit Ampicillinresistenz, einer Ansammlung verschiedener Sequenzen für Restriktionsenzyme als *Multiple cloning site* (MCS) und des dahinter liegenden und für die eukaryotische Expression vorgesehenen Luciferase-Gens, gekoppelt mit dem Poly(A) des *Simian Virus* (SV40-PA). Ergänzt wurde das Plasmid durch den in die MCS eingebrachten murinen 4,8 Kilobasen (kb) großen SP-C Promoter [76].

Für die Klonierung des geplanten Konstruktes (Einzelkonstrukte siehe Kapitel 10), bestehend aus insgesamt fünf Einzelsegmenten (zwei Promotoren, drei Reporter Gene siehe Kapitel 1.4.1.2), wurde eine weitere MCS (LG1-Linker) designt, deren Restriktionsschnittstellen im Plasmid und den Einzelsegmenten (*Inserts*) nicht vorkamen. Diese wurde über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *XbaI* in pGL3 kloniert, wobei das Luciferase-Gen entfernt wurde. Des Weiteren erfolgte eine Amplifizierung der *Inserts* aus verschiedenen *Templates* mittels PCRs und eine Klonierung in pGEM[®]-T-Vektoren, um die Sequenzen auf Mutationen überprüfen zu können. Ferner wurde das Reporter Gen *mCherry* in einen Vektor mit einem SV40-PA eingebracht, da es ursprünglich aus einem für prokaryotische Systeme konstruierten Vektor stammte.

In den pGL3-*mSP-C* Vektor wurden zunächst die einzelnen Konstruktteile kloniert, d. h. je ein Promoter und das entsprechende Reporter Gen. Die Klonierungen erfolgten über *XhoI* und *AatII* im Fall des *mCherry-SV40PA*-Reporter Gens (957 Basenpaare (bp)), über *BstBI* und *SacII* für den *SM22*-Promoter (481 bp) und *SacII* und *AatII* für das *GFP-SV40PA*-Reporter Gen (947 bp), über *AscI* und *Pfl23II* für den Promoter der $\alpha 2$ -Untereinheit von *Kollagen I* (*Col1*) (412 bp) und *Pfl23II* und *XbaI* für das *YFP*-Reporter Gen (732 bp). Die Entscheidung über die Fragmentlänge der Promotoren entsprach den Empfehlungen der publizierten Promoterstudien [76-78]. Der für das Gesamtkonstrukt geplante Mittelteil, bestehend aus dem *SM22*-Promoter und *GFP* erhielt eine zu *mSP-C-mCherry* und *Col1-YFP* entgegengesetzte Orientierung, um eine eventuell fälschliche Aktivierung des *GFP* durch die anderen Promotoren zu vermeiden. Darüber hinaus wurde das *YFP*-Reporter Gen ohne Poly(A)-Anhang kloniert und der vektoreigene SV40-PA für die eukaryotische Expression verwendet. Der weitere Aufbau des LungGlow 1 Konstrukts erfolgte auf der Basis des pGL3-*Col1-YFP*, da für das verwendete *XbaI*-Restriktionsenzym multiple Schnittstellen in den anderen Konstruktteilen vorlagen. Zunächst wurde *mCherry* mit *XhoI* und *AatII* kloniert, in

dem darauf folgenden Schritt ein zusätzlich für diese Klonierung generiertes *SM22-GFP* mit den Restriktionsschnittstellen *AgeI* und *AscI*, so dass das „pGL3-final“ genannte endgültige LungGlow 1 Konstrukt, nach abschließender Sequenzierung, für die *in vitro* und *in vivo* Studien vorlag (Abbildung 3-1, Abbildung 3-2).

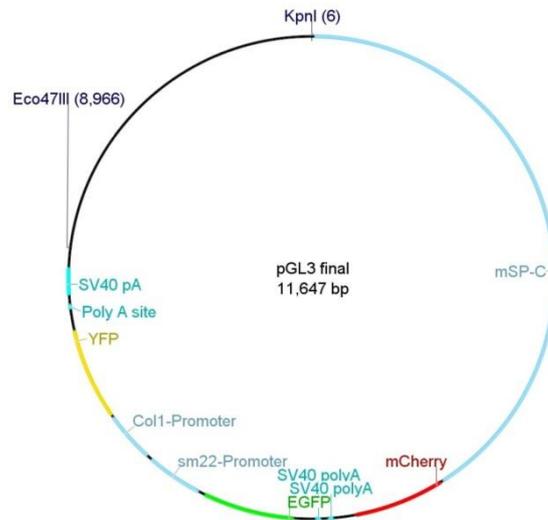


Abbildung 3-1: Das LungGlow 1 Plasmid „pGL3-final“.

Ein Vektor mit drei verschiedenen Promotoren, endogen für die Expression des murinen SP-C, des murinen SM22 und der murinen $\alpha 2$ -Untereinheit von Kollagen I, hier exogen gekoppelt mit den Reportergenen *mCherry*, *GFP* und *YFP* für die Expression der roten, grünen und gelben Fluoreszenz unter den spezifischen Promotoren.

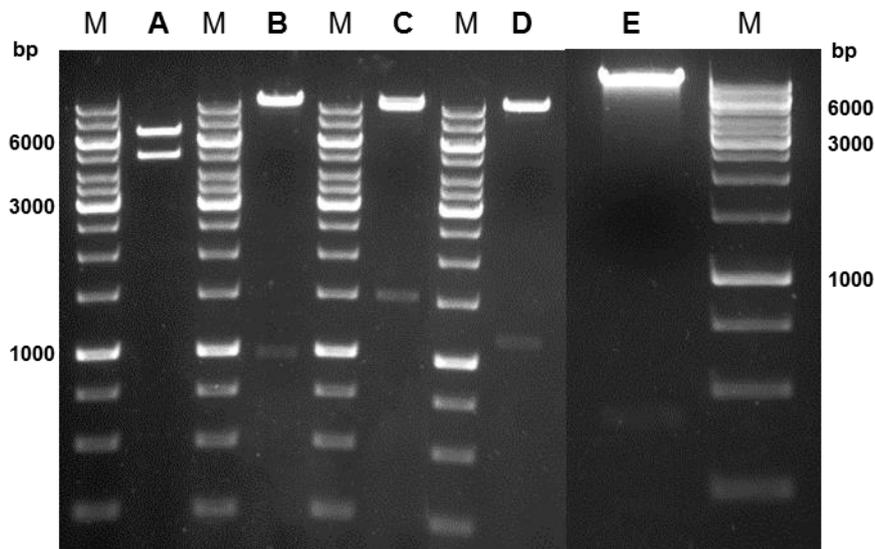


Abbildung 3-2: Testverdau zur Überprüfung des LungGlow 1 Plasmids.

A) *SP-C* Promoter (4,8 kb), Verdau mit *KpnI/XhoI*. **B)** *mCherry* (957 bp), Verdau mit *XhoI/AatII*. **C)** *SM22* Promoter/*GFP* (1428 bp), Verdau mit *AatII/AscI*. **D)** *YFP* inkl. SV40 PA (1363 bp), Verdau mit *Pfi23II/Eco47III*. **E)** *Col1*-Promoter (412 bp), Verdau mit *AscI/Pfi23II*. Als Größenstandard (M) wurde der 1 kb DNA-Marker (Thermo Scientific) verwendet.

3.1.2 *in vitro* Funktionalitätstests des LungGlow 1 Plasmids und seiner Einzelemente

Zur *in vitro* Kontrolle der Funktionalität des LungGlow 1 Projektes wurden zunächst die einzelnen funktionellen Einheiten von Promoter und korrespondierendem Reporter gen überprüft. Dafür wurden die Plasmide verwendet, die jeweils nur einen Promoter und ein Reporter gen trugen, d. h. *SP-C-mCherry*, *SM22-GFP* und *Col1-YFP*. Der *SP-C* Promoter als Bestandteil des pGL3 Vektors lag in jedem der getesteten Einzelplasmide vor, jedoch war auf Grund der publizierten Spezifitätsanalyse [76] keine Aktivität in den verwendeten Zellkulturen zu erwarten.

3.1.2.1 *SP-C-mCherry*

Für die *in vitro* Überprüfung des *SP-C-mCherry* wurde das Plasmid in die Epithelzelllinie MLE12 sowie isolierte primäre ATII-Zellen transfiziert und die Fluoreszenz des mCherry überprüft. Die rote Fluoreszenz lag bei beiden Transfektionen vor, wobei die Expression nicht in allen Zellen erkennbar war (Abbildung 3-3). In der Zellkultur für die primären ATII-Zellen zeigten sich die ATII-Zellen als kleine, rundliche Zellen, umgeben von anderen Zelltypen, die mit der verwendeten Aufreinigungsmethode minimiert, nicht vollständig beseitigt werden konnten.

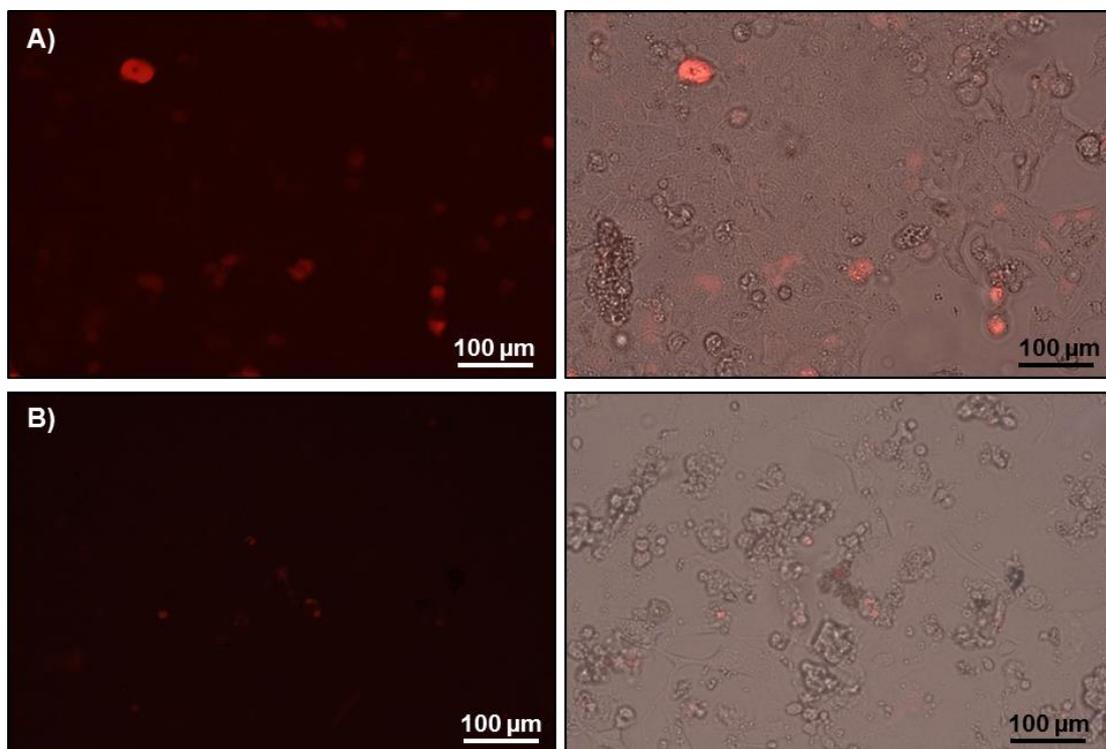


Abbildung 3-3: *In vitro* Funktionalitätstest des Einzelkonstrukts pGL3-*SP-C-mCherry*.

Ergebnis der transienten Transfektion nach 48 h. **A)** Transfektion in die MLE12 Zelllinie. **B)** Transfektion in frisch isolierte primäre murine ATII-Zellen. Dokumentiert sind die Fluoreszenz (linke Abbildungen) sowie die Überlagerung mit dem Durchlichtbild (rechte Abbildungen).

3.1.2.2 SM22-GFP

Das Plasmid pGL3-SP-C-SM22-GFP wurde zur Überprüfung in primäre SMC der Ratte transfiziert. Trotz der geringen Transfektionseffizienz konnte eine GFP-Fluoreszenz in der Primärzellkultur dokumentiert werden (Abbildung 3-4).

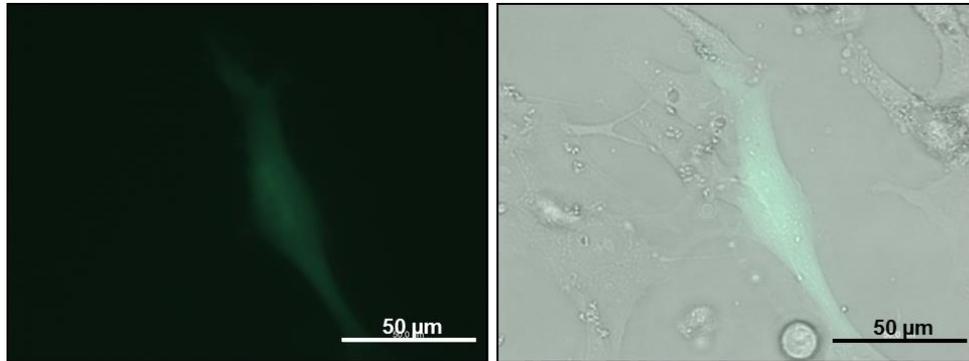


Abbildung 3-4: *In vitro* Funktionalitätstest des Einzelkonstrukts pGL3-SP-C-SM22-GFP.

Ergebnis der transienten Transfektion in primäre SMC der Ratte nach 48 h. Die linke Abbildung zeigt die Fluoreszenz, die rechte Abbildung die Überlappung von Fluoreszenz- und Durchlichtbild.

3.1.2.3 Col1-YFP

Das Einzelkonstrukt pGL3-SP-C-Col1-YFP wurde in die murine Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3 transient transfiziert. Auch hier war die Transfektionseffizienz gering, jedoch gelang der Nachweis der Expression von YFP (Abbildung 3-5).

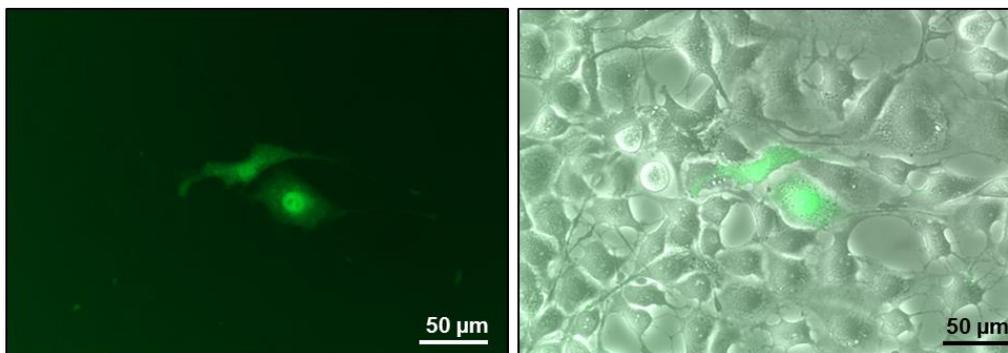


Abbildung 3-5: *In vitro* Funktionalitätstest des Einzelkonstrukts pGL3-SP-C-Col1-YFP.

Ergebnis der transienten Transfektion in die Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3 nach 48 h. Die linke Abbildung zeigt die Fluoreszenz, die rechte Abbildung die Überlappung von Fluoreszenz- und Durchlichtbild.

Aus Gründen der Effizienz wurde auf eine transiente Transfektion des Einzelkonstrukts in primäre Lungenfibroblasten der Maus verzichtet, jedoch konnte der Nachweis der Fluoreszenz des YFP durch die Transfektion des Doppelkonstrukts pGL3-SP-C-mCherry-Col1-YFP erbracht werden (Abbildung 3-6).

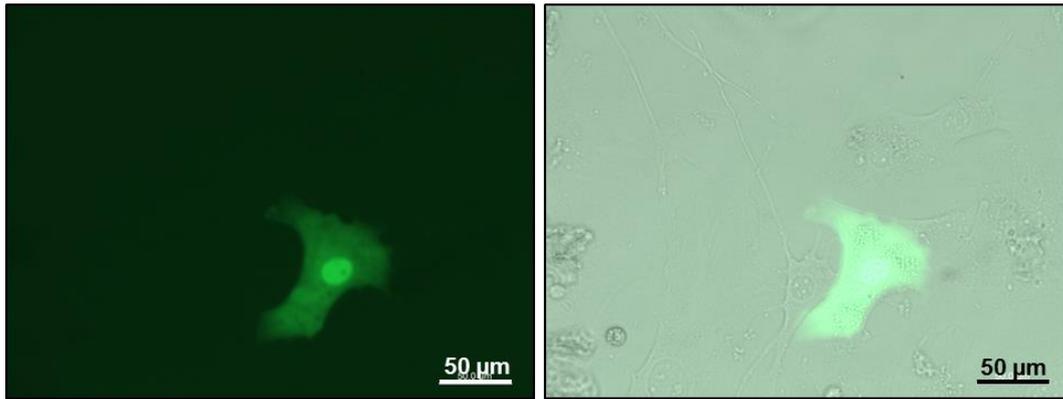


Abbildung 3-6: *In vitro* Funktionalitätstest des Konstruktteils *Col1-YFP* aus *pGL3-SP-C-mCherry-Col1-YFP*.

Ergebnis der transienten Transfektion in primäre Lungenfibroblasten der Maus nach 48 h. Die linke Abbildung zeigt die Fluoreszenz, die rechte Abbildung die Überlappung von Fluoreszenz- und Durchlichtbild.

3.1.2.4 *in vitro* Überprüfung des LungGlow 1 Plasmids pGL3-final

Die Überprüfung des vollständigen LungGlow 1 Plasmids erfolgte *in vitro* durch transiente Transfektionen in die Zelllinien MLE12 und NIH/3T3 sowie die primären SMC der Ratte. Während der *in vitro* Überprüfung wurden für die transfizierten SMC und Fibroblasten eine Reihe von Färbungen vorgenommen, wobei im Fall der SMC die Antikörper gegen α -SMA und GFP-FITC und für die Fibroblasten Antikörper gegen Kollagen I und GFP-FITC (siehe Kapitel 2.1.6) verwendet wurden. Durch die Färbungen konnte eine Detektion von GFP oder YFP durch die transfizierten Zellen schon frühzeitig festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Durch weitere Optimierungen der transienten Transfektionen wurde jedoch die Fluoreszenz der exprimierten Reportergene in den lebenden Zellen direkt durch Fluoreszenzmikroskopie detektiert, und damit die Funktionalität des Gesamtkonstrukts bzw. seiner Einzelkomponenten im Verbund nachgewiesen (Abbildung 3-7). Nach dieser *in vitro* Bestätigung wurde das Konstrukt in hoher Konzentration über die Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *Eco47III* linearisiert und gleichzeitig von dem Vektor-Rückgrat pGL3 isoliert. Das Gesamtkonstrukt mit einer Länge von 8960 bp wurde zur Herstellung der transgenen Mäuse mittels Pronuklear-Injektion an die darauf spezialisierten Fazilitäten des Max-Planck-Instituts für Herz- und Lungenforschung in der Abteilung von Prof. Braun weitergeleitet.

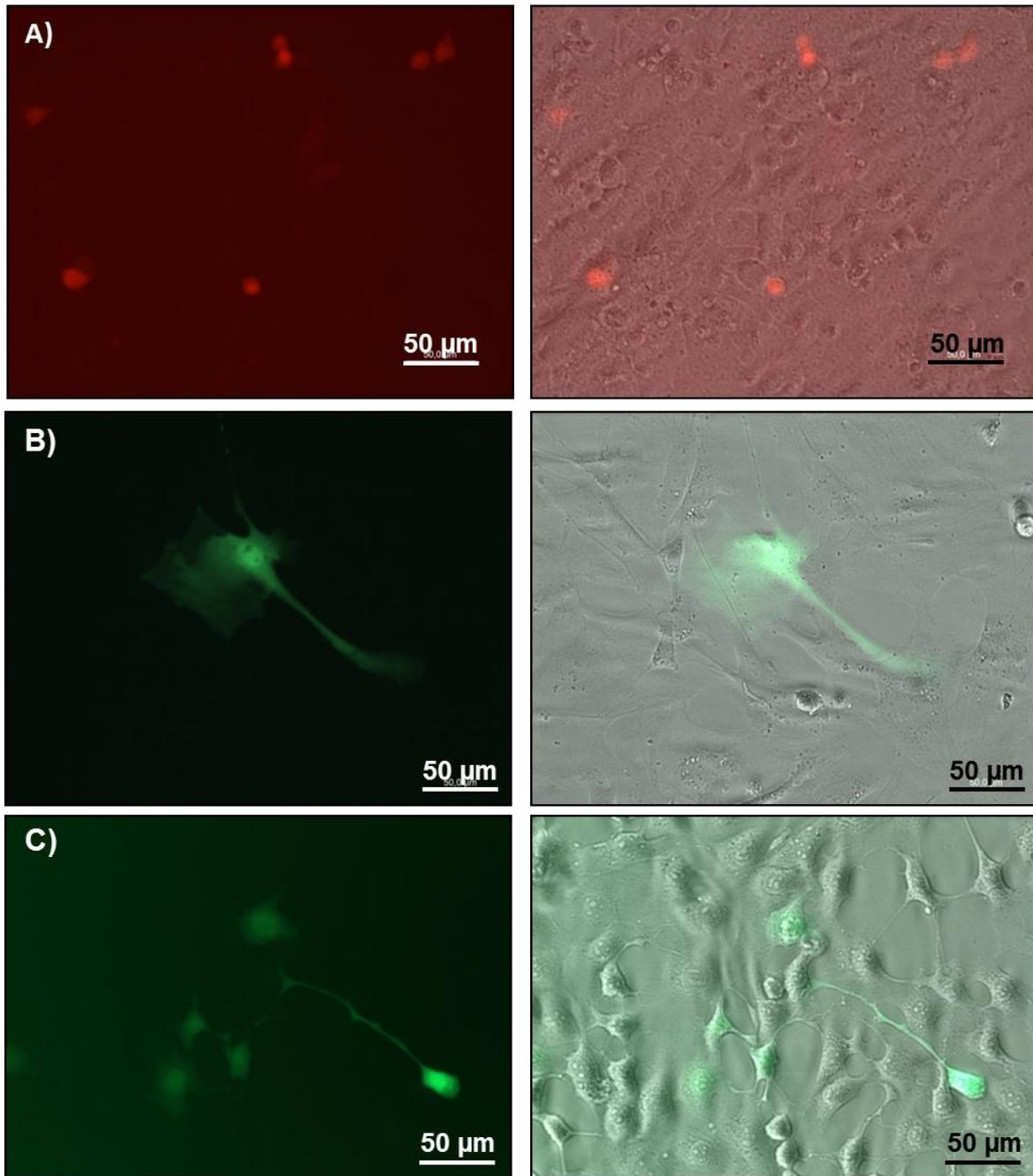


Abbildung 3-7: *In vitro* Funktionalitätstest des finalen LungGlow 1 Plasmids mit seinen Komponenten *SP-C-mCherry*, *SM22-GFP* und *Col1-YFP*.

A) Ergebnis der Transfektion in die MLE12 Epithelzelllinie. **B)** Ergebnis der Transfektion in primäre SMC der Ratte. **C)** Ergebnis der Transfektion in die Fibroblastenzelllinie NIH/3T3 der Maus. Dokumentiert sind die Fluoreszenz (linke Abbildungen) sowie die Überlagerung mit dem Durchlichtbild (rechte Abbildungen).

3.1.3 Analyse der transgenen LungGlow 1 Mäuse

Die als *Founder* bezeichneten direkten Nachkommen der Mäuse, die mikroinjiziert wurden, konnten mittels optimierter Primer durch eine Genotypisierungs-PCR auf *mCherry* sowie *Col1-YFP* identifiziert werden. Insgesamt wurden durch mehrere Injektionen drei *Founder* mit entsprechendem Genotyp gewonnen. Diese wurden mit dem C57BL/6J Wildtyp verpaart und die F1 Generationen untersucht. Die Analyse der F1 Generation auf eine Vererbung des Phänotyps erfolgte insofern, als dass nach der Lungenentnahme und entsprechender Cryokonservierung 0,5 μm Lungenschnitte angefertigt wurden, die zunächst ohne weitere histologische Behandlung im Fluoreszenzmikroskop gesichtet wurden. Durch die deutliche Eigenfluoreszenz der Lungenschnitte ergab sich eine Notwendigkeit für weitere Antikörperfärbungen. Die Wahl fiel auf GFP-FITC, um, bei exprimiertem Transgen, GFP und YFP als ursprünglich exogene Proteine mit dem Konfokalmikroskop in der Mauslunge detektieren zu können. Die histologische Färbung ergab für keinen der Nachkommen der F1 Generation eine GFP-Fluoreszenz (Negativergebnis nicht als Abbildung dokumentiert). Die letztlich ebenfalls histologisch untersuchten *Founder* ergaben in einem Fall eine mögliche Expression von GFP und/oder YFP, die jedoch nicht flächendeckend im Gewebe sondern nur vereinzelt und schwach ausgeprägt war (Abbildung 3-8).

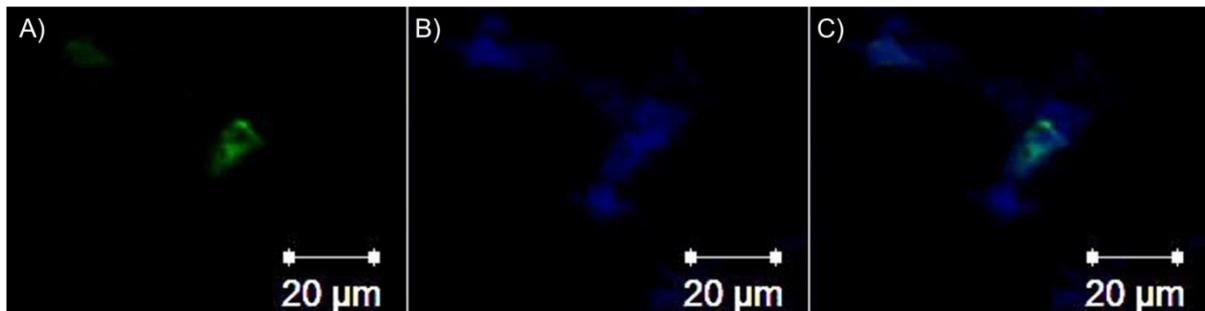


Abbildung 3-8: Cryoschnitt-Färbung des Lungengewebes eines potentiell positiven Founders.

Abbildung aus der Konfokalmikroskopie. Detektierung des exprimierten GFP und/oder YFP unter dem Promotor *SM22* und/oder dem Promoter der $\alpha 2$ -Untereinheit des *Kollagen I* mittels GFP-FITC (grün). Topro3 als Kernfärbung (blau). **A)** GFP-FITC; **B)** Topro3-Kernfärbung; **C)** Überlagerung der Scanergebnisse.

3.2 HSV-TK – Generierung einer Mauslinie zur Deletion von Kollagen I-exprimierenden Zellen

Das vollständig klonierte und publizierte Plasmid wurde zur Generierung einer Mauslinie aus dem Mausstamm CD-1 verwendet, in der gezielt Kollagen I- exprimierende Zellen deletiert werden sollten. Es bestand aus dem *Enhancer* für Kollagen I, gefolgt von dem entsprechenden Minimalpromoter und den Genen für die Thymidin-Kinase (*HSV-TK*) von *Herpes simplex* und dem grün fluoreszierenden Protein *GFP* (Abbildung 3-9). Durch diese Konstruktion war es einerseits möglich, Kollagen I exprimierende Zellen fluoreszent zu markieren und andererseits durch die gezielte Zugabe des gegen Herpesviren eingesetzten Medikaments Ganciclovir zu eliminieren. Der Vektor wurde nach einer vollständigen Sequenzierung des benötigten Konstruktteils über die Restriktionsschnittstellen *AfeI* und *SexAI* von seinem Rückgrat getrennt und als aufgereinigte linearisierte DNA (10150 bp) zur Generierung transgener Mäuse mittels Pronuklear-Injektion in die dafür vorgesehene Einrichtung in der Abteilung von Prof. Braun am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung gegeben. Die durch mehrere Mikroinjektionen erhaltenen *Founder* wurden durch eine optimierte Genotypisierungs-PCR auf *HSV-TK* identifiziert und mit CD-1 Wildtyp weiterverpaart.

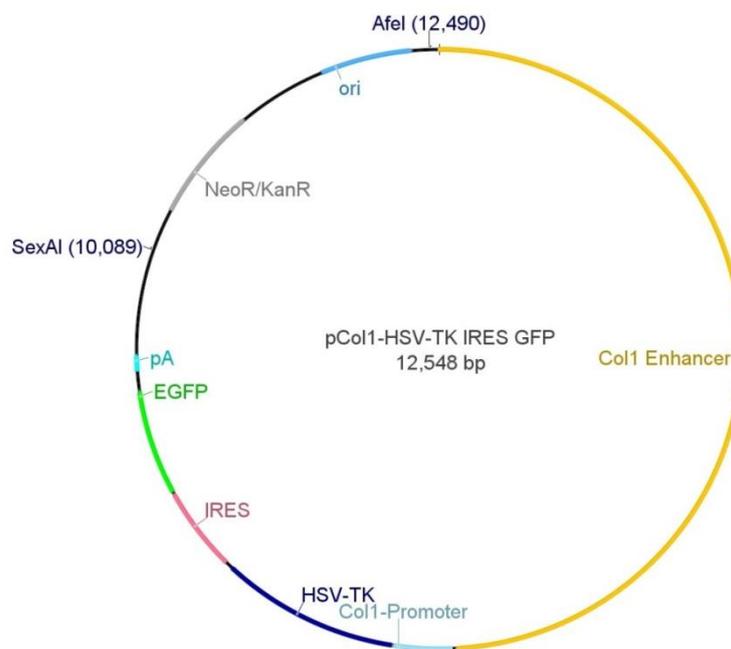


Abbildung 3-9: HSV-TK Plasmid zur Deletion Kollagen I-exprimierender Zellen.

Das Plasmid enthält den *Enhancer* und den Promoter der $\alpha 2$ -Untereinheit des *Kollagen I* (*Col1*), die Thymidin-Kinase (*HSV-TK*) des *Herpes simplex* und ein mit einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) gekoppeltes Gen für das optimierte grün fluoreszierende Protein (*enhanced GFP*; *EGFP*) (publiziert in [75]).

3.2.1 *in vitro* Funktionstest der HSV-TK basierten Deletion

Die ersten Nachkommen der F1-Generation wurden auf die Funktionalität des Deletionssystems mit HSV-TK untersucht. Die Behandlung der isolierten Lungenfibroblasten mit Ganciclovir verschiedener Konzentrationen ergab eine fast vollständige Abtötung der Kollagen I-exprimierenden Zellen, die aus den HSV-TK transgenen Mäusen ($\text{Col1a2}^{\text{HSV-TK-GFP}}$) isoliert wurden, ab einer GCV-Konzentration ab 0,2 μM . Die Wildtyp-Lungenfibroblasten wurden auf Grund der Cytotoxizität des GCV erst ab einer sehr hohen Konzentration von 100 μM GCV zu 50% abgetötet (Abbildung 3-10).

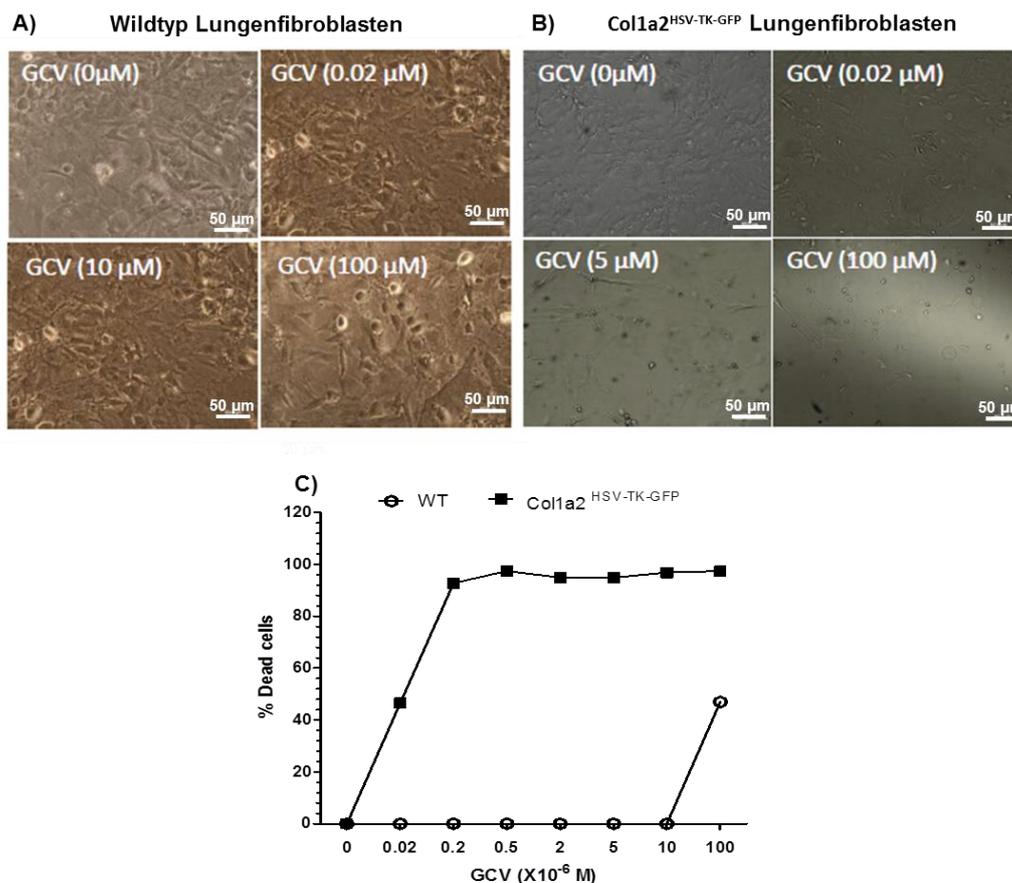


Abbildung 3-10: *In vitro* Funktionstest von GCV auf Kollagen I-exprimierende Lungenfibroblasten transgener $\text{Col1a2}^{\text{HSV-TK-GFP}}$ Mäuse im Vergleich zum Wildtyp.

A) Abbildung der isolierten Lungenfibroblasten aus CD-1 Wildtyp Mäusen nach der Behandlung mit 0, 0,02, 10 und 100 μM GCV nach 5 Tagen. **B)** Abbildung der isolierten Lungenfibroblasten aus transgenen $\text{Col1a2}^{\text{HSV-TK-GFP}}$ Mäusen nach der Behandlung mit 0, 0,02, 10 und 100 μM GCV nach 5 Tagen. **C)** Quantifizierung der durch unterschiedliche GCV-Konzentrationen (0, 0,02, 0,2, 0,5, 2, 5, 10, 100 μM) abgetöteten Lungenfibroblasten aus Wildtyp und $\text{Col1a2}^{\text{HSV-TK-GFP}}$ transgenen Mäusen im Vergleich, festgestellt durch die Vitalfärbung mit Trypanblau.

Auf Grund des Nachweises, dass das Transgen offensichtlich in das Mausgenom integriert und in die F1 Generation weitervererbt wurde und dort in Kollagen I-exprimierenden Zellen seine Funktion erfüllt, wurden die transgenen Zuchtlinien weitergeführt und die nachfolgenden Mausgenerationen für die Untersuchung der Rolle der Fibrozyten in pulmonaler Hypertonie verwendet.

3.3 LungGlow 2 – Transgene zur Visualisierung dynamischer Trans-Differenzierungsprozesse

3.3.1 Die Generierung eines Zweifarben-Reportergenplasmids

Das Zweifarben-Reportergenkonstrukt (LG2 final) basierte auf dem eukaryotischen Expressionsvektor pCX-cMyc [82] (Anhang Kapitel 10), der das humane *cMyc*-Gen über den ubiquitären CAG-Promoter exprimierte. In dieses Plasmid wurde eine MCS (LG2-Linker) über die doppelt vorhandene Restriktionsschnittstelle *EcoRI* eingebracht und das *cMyc*-Gen dabei herausgeschnitten. Anschließend erfolgten die Klonierungsschritte zur Fertigstellung des Konstruktes in einer genau geplanten Reihenfolge, da einzelne Konstruktteile Restriktionsschnittstellen enthielten, die an anderer Stelle zur Klonierung verwendet werden mussten. Zunächst kam es zu einem Schnittstellenaustausch von *NruI* zu *SmaI* (*blunt-end* Schnittstelle), kloniert über *XhoI* und *AgeI* (*Bsp119I*). Über diese neu eingefügte Schnittstelle und *AgeI* wurde das Reportergen *mCherry* eingefügt, das über eine Vorklonierung mit einem β -Globin-Intron (hBG-Intron) und einem Poly(A)-Anhang versehen war. Eine weitere Restriktionsschnittstellen-Ergänzung wurde durchgeführt, hierbei über *AgeI* und *AscI* die Schnittstellen *NsiI*, *EcoRV*, *KpnI*, *MluI* und *Clal* eingebracht. Das Reportergen *GFP* mit einem SV40-Poly(A) wurde über die neu eingefügten Schnittstellen *NsiI* und *EcoRV* kloniert. Die Sequenz und auch der weitere, zum Reportergen gehörende Konstruktteil (ubiquitärer Promoter und *FRT*-Expressionskassette) erhielt eine entgegengesetzte Orientierung, um eine fälschliche Aktivierung der Fluoreszenz, getrieben durch die ubiquitären Promotoren, zu vermeiden. Es erfolgte eine Amplifizierung eines 250 bp großen DNA-Fragmentes aus dem 3'-Bereich des *Rosa26*-Lokus. Dieser war ein Teil eines Plasmids (pRosa26_MCS; Kapitel 10), der lange homologe 3'- und 5'-Bereiche des *Rosa26*-Lokus besaß und zur homologen Rekombination in den ES-Zellen der Maus verwendet wurde. Um das gesamte LungGlow 2 Konstrukt durch homologe Rekombination in diesen Vektor (pRosa26_MCS) überführen zu können (zur weiteren homologen Rekombination in ES-Zellen), wurde das 3'-DNA-Fragment dann über Restriktionsschnittstellen *AscI* und *CpoI* in den LungGlow 2 Vektor kloniert. Das zur homologen Rekombination benötigte 5'-Fragment war der im LungGlow 2 Vektor vorhandene CAG-Promoter. Anschließend wurde der zweite ubiquitäre Promoter, der Promoter für die Phosphoglyceratkinase 1 der Maus (*PGK*) über *Clal* und *AscI* eingefügt. Die Orientierung des Promoters war der des *GFP* gleichgerichtet. Als Expressionskassette wurde über die Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *MluI* eine Neomycinresistenz (*Neo*), die zur Selektion der ES-Zellen benötigt wurde, eingefügt. Dieses Resistenzgen wurde hierbei von zwei, in gleiche Richtung angeordneten *FRT*-sites flankiert. Die Komplettierung des LungGlow 2 Plasmids (Abbildung 3-11) erfolgte durch die Klonierung des Gens der humanen alkalinen Phosphatase (*PLAP*) mit hBG-Poly(A), die, flankiert von

loxP-sites, als weitere Expressionskassette verwendet wurde. Diese Klonierung über *PmeI* und *XhoI* erfolgte am Ende, da in der Sequenz der PLAP fast alle hier verwendeten Restriktionsschnittstellen vorlagen. Die abschließende Analyse des gesamten LungGlow 2 Plasmids erfolgte durch eine Sequenzierung.

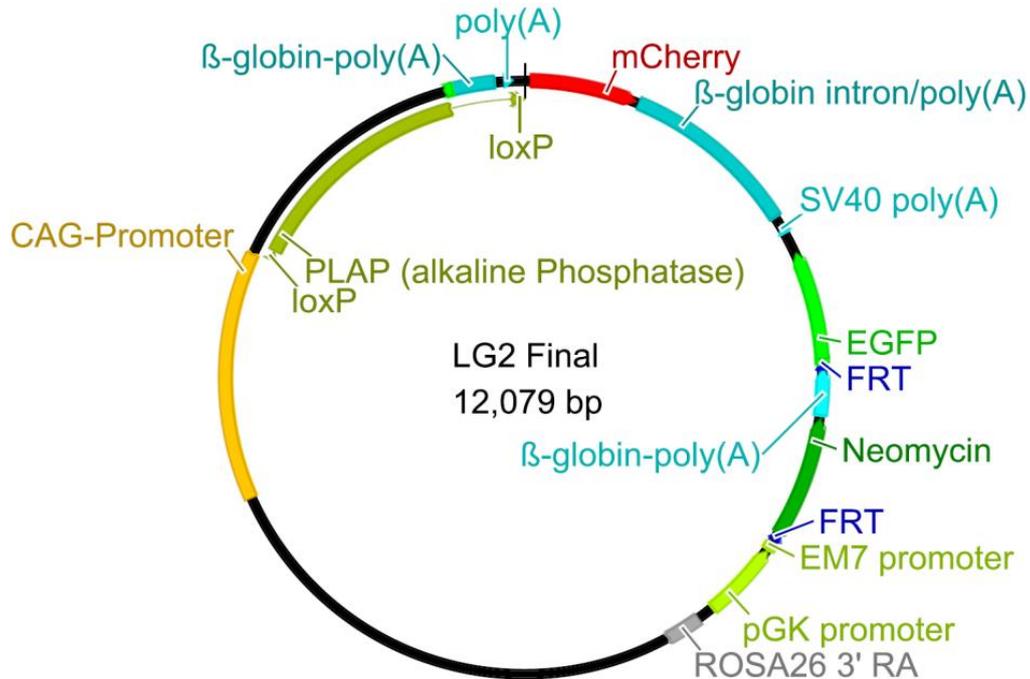


Abbildung 3-11: Das LungGlow 2 Konstrukt im pCX-Plasmid.

Der eine Konstruktteil enthält den ubiquitären CAG-Promoter als 5'-Fragment zur homologen Rekombination in einen Rosa26-Vektor, eine *loxP*-site flankierte humane alkaline Phosphatase (PLAP) als Expressionskassette, darauf folgend das Reportergen für die rote Fluoreszenz *mCherry*. Der andere Konstruktteil mit entgegengesetzter Orientierung beginnt mit einem 3'-DNA-Fragment für die homologe Rekombination in einen Rosa26-Vektor, gefolgt von dem ubiquitären Promoter für die Phosphoglyceratkinase (PGK), der *FRT*-site flankierten Expressionskassette, die eine Neomycinresistenz (*Neomycin*) darstellt, sowie dem Gen *GFP* als Reportergen für die grüne Fluoreszenz.

3.3.2 *in vitro* Funktionsüberprüfung der sequenzspezifischen Rekombination im LungGlow 2 Plasmid

Für die Überprüfung der Funktionalität der Rekombinaseschnittstellen *FRT* und *loxP* wurde der Vektor in HEK-Zellen transfiziert. Die Einzeltransfektionen des Plasmids dienten der Kontrolle, ob auch ohne den Einfluss der Rekombinasen Cre oder FLP eine Fluoreszenz von dem Plasmid exprimiert wurde. Um die Effektivität der Rekombinasen an dem Plasmid zu testen, wurden verschiedene Ansätze gewählt. Das Plasmid wurde in spezielle, Cre oder FLP exprimierende Bakterien transformiert, die rekombinierte Plasmid-DNA anschließend in HEK-Zellen transfiziert und auf die Fluoreszenz untersucht. Darüber hinaus wurden Doppeltransfektionen des LungGlow 2 Plasmids mit einem Plasmid durchgeführt, das die FLPe Rekombinase unter dem ubiquitären Cytomegalovirus-Promoter (*cmv*) exprimierte (Kapitel 10, Abbildung 10-4). Die durch dieses Plasmid exprimierte FLPe war diejenige, die im weiteren Verlauf für die Klonierung des *Tet-Operator/FLPe*-Konstrukts (s. Kapitel 3.3.3) verwendet wurde. Durch die Anordnung der *loxP*- und *FRT*-Sequenzen im LungGlow 2 Plasmid sollte bei der Behandlung mit Cre die Expressionskassette *PLAP* entfernt und eine mCherry-Expression gestartet werden. Bei der Behandlung mit der FLP Rekombinase sollte die Entfernung der Neomycinresistenz zu einer Expression des GFP führen. Der Schwerpunkt dieser Untersuchungen lag auf der Kontrolle des FLP/*FRT*-Systems, da dieses unter experimentellen Gesichtspunkten weit weniger geläufig war als das Cre/*loxP*-System. Die Kontrolle der Fluoreszenzen im Mikroskop ergab für die DNA, die aus den FLP exprimierenden Bakterien gewonnen wurde eine erkennbare grüne Fluoreszenz, was für die GFP Expression sprach. Eine grüne Fluoreszenz wiesen auch die HEK-Zellen auf, die einer Doppeltransfektion des LungGlow 2 Plasmids und eines *cmv/FLPe* Plasmids ausgesetzt waren (Abbildung 3-12). Eine deutliche mCherry-Expression zeigte sich bei der Transfektion mit der DNA, die aus den Cre exprimierenden Bakterien gewonnen wurde, was sich in einer roten Fluoreszenz wiederfand. Diese wurde quantifiziert und ergab bei der Analyse mittels Durchfluss-Cytometrie einen Anteil rot fluoreszierender Zellen von 68 % (bei 50000 Zellen), und 0 % grüne Fluoreszenz (Daten nicht gezeigt). Das Experiment wurde auf Grund der Eindeutigkeit des Ergebnisses einmalig durchgeführt. Die jeweiligen Einzeltransfektionskontrollen zeigten vereinzelt eine grüne oder rote Fluoreszenz, was ca. 10 – 20 HEK-Zellen auf einer konfluent bewachsenen 6-*well* Platte betraf (Daten nicht gezeigt).

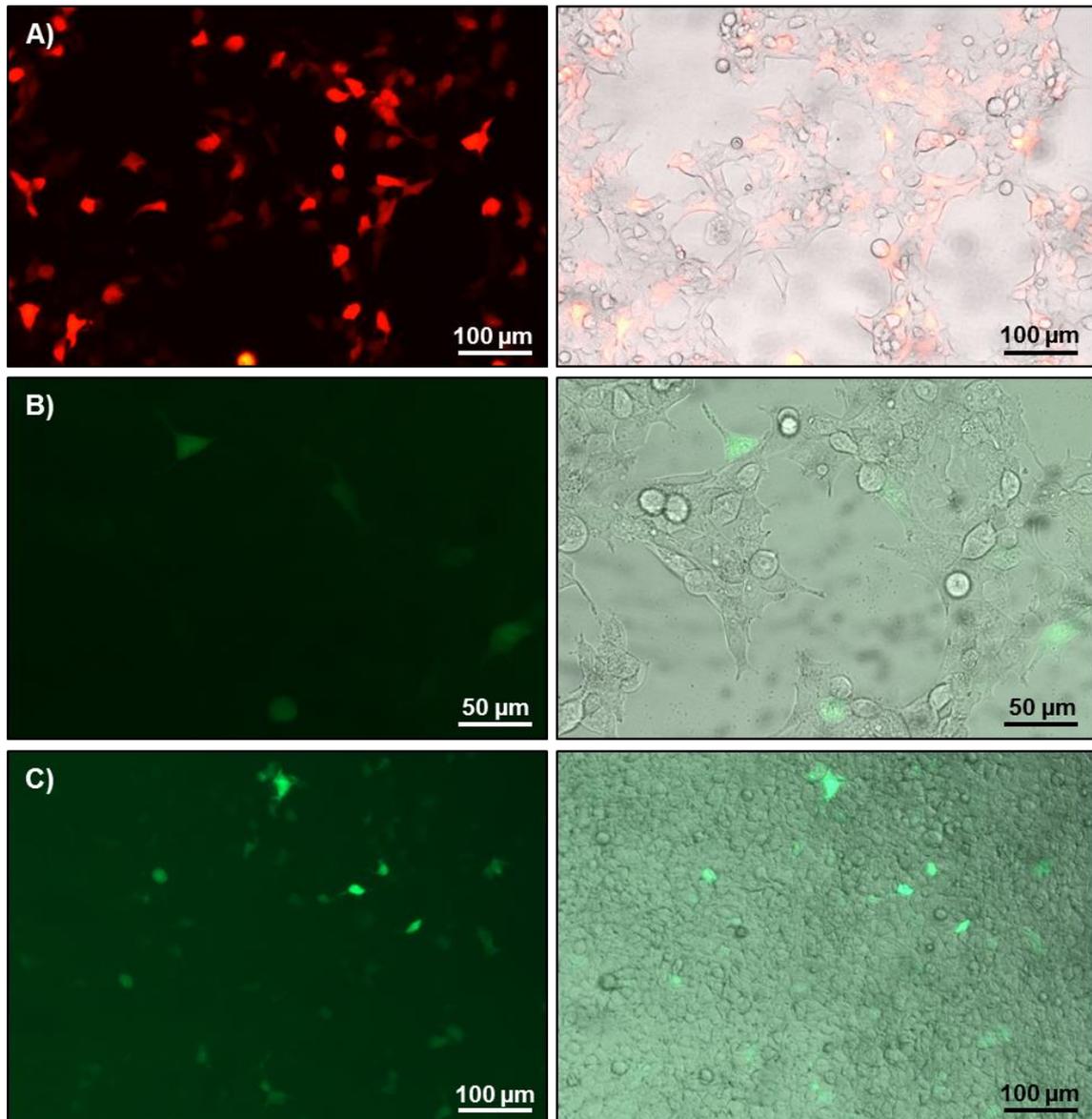


Abbildung 3-12: *In vitro* Funktionsüberprüfung der *FRT*- und *loxP*-Schnittstellen im LungGlow 2 Plasmid.

A) Die Transfektion der LungGlow 2 Plasmid-DNA, isoliert aus Cre Rekombinase exprimierenden *E. coli* Bakterien zeigt eine durch die rote Fluoreszenz visualisierte mCherry-Expression. **B)** Die Transfektion der LungGlow 2 Plasmid-DNA, isoliert aus FLP Rekombinase exprimierenden *E. coli* Bakterien zeigt eine durch grüne Fluoreszenz nachweisbare GFP-Expression. **C)** Doppeltransfektion der LungGlow 2 Plasmid-DNA mit einem Plasmid für die Expression der FLPe Rekombinase unter einem starken ubiquitären *cmv*-Promoter führt zu einer durch die grüne Fluoreszenz nachweisbaren GFP-Expression. Dokumentiert sind die Fluoreszenz (linke Abbildungen) sowie die Überlagerung mit dem Durchlichtbild (rechte Abbildungen).

3.3.3 Die Klonierung eines Tet-Operator/FLPe-Konstrukts zur Generierung einer Tetracyclin-abhängig induzierbaren Rekombinase

In einem ersten Schritt wurde der Vektor PSKB1, ein Plasmid für die Rekonstitution des *HPRT*-Lokus, über *EcoRI* mit den Restriktionsschnittstellen *Pfl23II* und *Eco47III* versehen. Die Klonierung des *Tet-Operator/Flippase*-Konstruktes (*TetO/FLPe*) erfolgte zunächst im pGL3 Vektor mit der für LungGlow 1 eingebrachten MCS (Kapitel 10, Abbildung 10-1), da er somit einen Teil der notwendigen Restriktionsschnittstellen sowie eine geringe Größe besaß, was die Klonierung vereinfachte. Zur Ergänzung der MCS wurde über *Pfl23II* und *Eco47III* ein synthetischer Linker mit den Restriktionsschnittstellen *SmaI* und *XbaI* eingeführt. Aus einem weiteren Vektor (Kapitel 10, Abbildung 10-3) erfolgte eine Amplifizierung des *TRE-Tight*, eines optimierten *Tet-Operators*. Dieser bestand aus einer siebenfachen Wiederholung einer 36 bp großen Sequenz, von der jede die 19 bp lange Sequenz des *Tet-Operators* enthielt [83]. Dem *TRE-Tight* vorgeschaltet lag ein synthetischer Poly(A), wodurch jegliche Fremdexpression des Konstruktes im jeweiligen DNA-Lokus vermieden wurde. Das PCR-Konstrukt wurde nach vorheriger Klonierung in einen pGEM[®]-T-Vektor und Sequenzierung über *Pfl23II* und *SmaI* in den LungGlow 1 Vektor kloniert. Das Gen für die Rekombinase FLPe wurde aus der genomischen DNA einer FLPe exprimierenden Maus über eine PCR gewonnen, im pGEM[®]-T-Vektor sequenziert und über eine Zwischenklonierung mit einem β -Globin-Intron Poly(A) versehen. Die Klonierung in den LungGlow 1 Vektor erfolgte über *Eco47III/SmaI* und *XbaI*. Das vollständige Konstrukt (2980 bp) wurde über die Restriktionsschnittstellen *Pfl23II* und *Eco47III* in den Vektor PSKB1 kloniert (Abbildung 3-13).

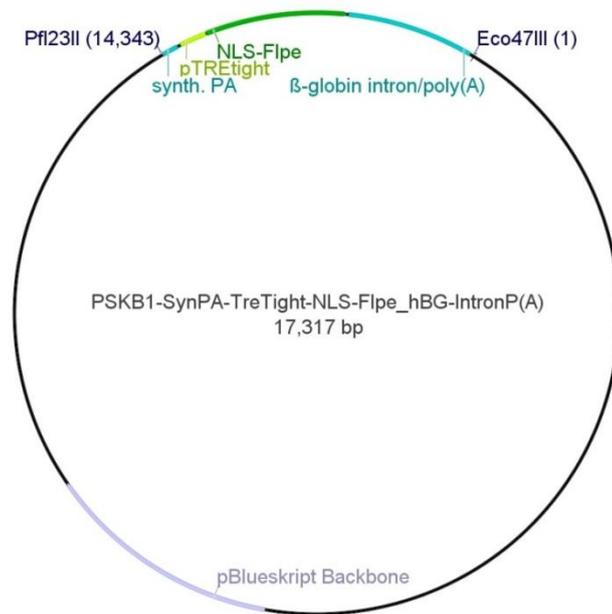


Abbildung 3-13: Das vollständige Tet-Operator/FLPe-Konstrukt im Vektor PSKB1.

Das Plasmid enthält neben den vom Vektor PSKB1 gegebenen Sequenzabschnitten zur Rekonstitution des *HPRT*-Lokus einen durch den Klonierungsvorgang eingebrachten synthetischen Poly(A) Anhang, der optimierte *Tet-Operator*, genannt *TRE-tight*, die Sequenz für die Rekombinase *FLPe*, verbunden mit einem β -Globin Intron und einem Poly(A) sowie einem *nuclear localizing signal (NLS)* zum einfachen Transfer des Proteins in den Zellkern.

3.3.4 *in vitro* Funktionsüberprüfung des Gesamtkonzepts von LungGlow 2

Eine Überprüfung der Funktion des gesamten Systems von LungGlow 2 war erst nach der Fertigstellung beider notwendigen Plasmide, d. h. des LungGlow 2 Plasmids mit den *loxP*- und *FRT*-Sequenzen sowie des *Tet-Operator/FLPe*-Konstrukts, möglich. Die Schwerpunkte dieser Experimentreihe lag darin (1) zu testen, ob es möglich ist, die Expression der *FLPe* Rekombinase, vermittelt durch einen Transaktivator, zu aktivieren. Gleichzeitig sollte (2) festgestellt werden, ob das geplante Tet-System *in vitro* funktionieren würde, d. h. ob der *Tet-Operator* auf eine im Experiment angebotene Transaktivator/Doxycyclin Deaktivierung (Transaktivator *tTA*, d. h. *Tet-Off* System) anspricht. (3) wurde geprüft, ob als Folgereaktion bei verringerter Doxycyclingabe eine Expression der nachgeschalteten *FLPe* stattfindet, die wiederum über das LungGlow 2 Konstrukt eine GFP Expression auslösen würde (Abbildung 3-14).

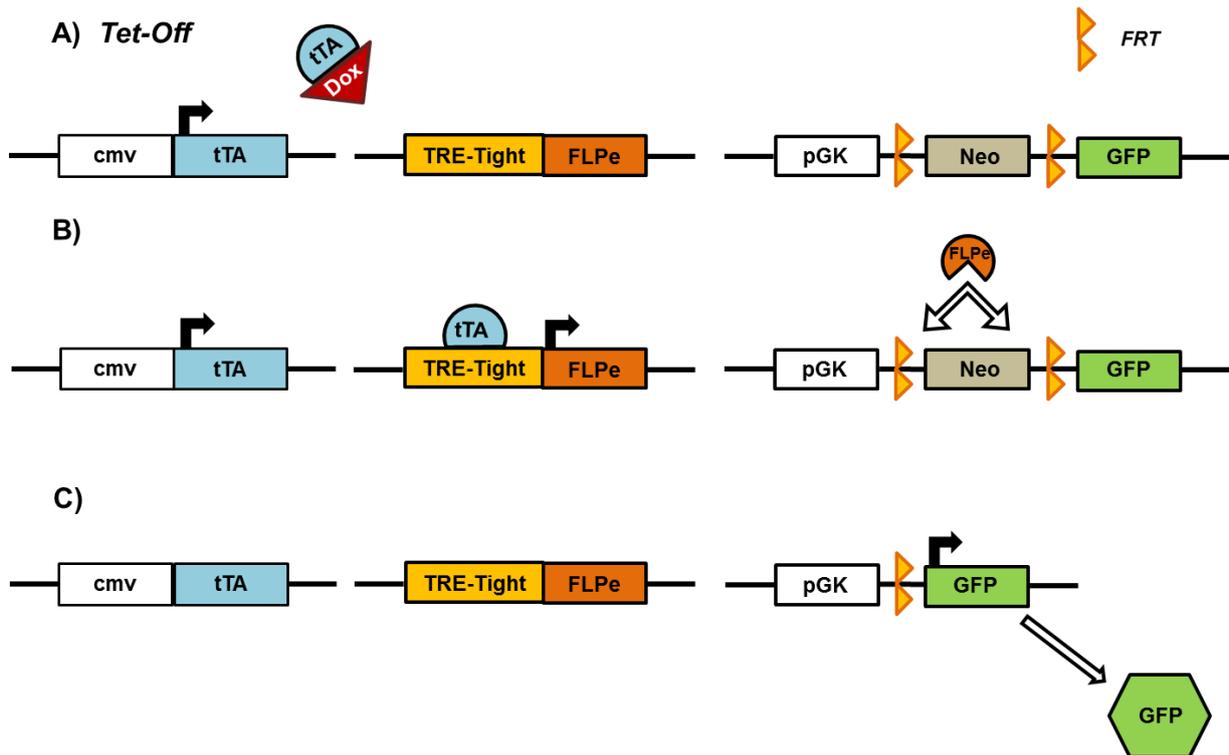


Abbildung 3-14: Schematische Darstellung der *in vitro* Überprüfung des Gesamtkonzepts von LungGlow 2.

Überprüfung der Plasmide im Verbund durch HEK-Zelltransfektionen. **A)** Dreifach-Transfektion eines Transaktivators des *Tet-Off* Systems (*tTA*), getrieben von einem starken ubiquitären *cmv*-Promoter, des *Tet-Operator/FLPe*-Konstrukts (*TRE-Tight-FLPe*) und des LungGlow 2 Plasmids, hier nur dargestellt durch den für das Experiment relevanten Konstruktteil des ubiquitären *pGK*-Promoters, der von *FRT* Sequenzen flankierten Expressionskassette der Neomycinresistenz (*Neo*) und des grün fluoreszierenden Proteins (*GFP*). Die Gabe des Tetracyclin-Analogons Doxycyclin (Dox) blockiert den Transaktivator, es findet in dreifach-transfizierten Zellen keine Expression der weiteren Plasmidbestandteile statt. **B)** Ohne Zugabe des Doxycyclin aktiviert der Transaktivator den TetOperator *TRE-Tight*, wodurch die *FLPe* Rekombinase exprimiert wird. Diese erkennt die *FRT* Sequenzen des LungGlow 2 Plasmids und rekombiniert diese, so dass die Expressionskassette *Neo* herausgeschnitten wird. **C)** Durch die Deletion der Expressionskassette kann der ubiquitär aktive *pGK*-Promoter das Gen für die grüne Fluoreszenz *GFP* exprimieren und die dreifach-transfizierte Zelle fluoresziert grün.

Die *tTA*-vermittelte Aktivierung der Expression der *FLPe* wurde durch eine Dreifach-Transfektion von HEK-Zellen mit drei Plasmiden untersucht. Als Plasmide dienten (1) für die Expression einer Transaktivator-domäne unter dem ubiquitären *cmv*-Promoter ein *cmv-tTA*, (2) das *Tet-Operator/FLPe*-Konstrukt (*TetO-FLPe*) und (3) das LungGlow 2 Plasmid. Der Nachweis der *FLPe* Expression erfolgte durch Western Blot mit spezifischer Antikörperfärbung gegen das *FLPe* Protein. Als Negativkontrollen dienten ein transfizierter Leervektor und das einzeln transfizierte Zweifarben-Reporterplasmid LungGlow 2. Die Positivkontrolle wurde mit Hilfe einer Transfektion einer *FLPe* unter dem *cmv*-Promoter, zusammen mit dem Plasmid LungGlow 2, vorgenommen. Auf dem Western Blot ist die Anwesenheit des *FLPe* Proteins *in vitro* an Hand der detektierten Proteinbande bei ca 49,6 kDA erkennbar.

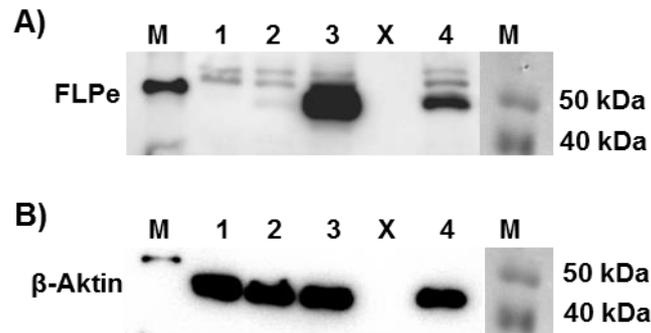


Abbildung 3-15: *In vitro* Expression des FLPe-Proteins.

Überprüfung der Anwesenheit des FLPe Proteins durch spezifische Antikörperdetektion im Western Blot. Auftragung des Gesamtproteins, isoliert aus transient transfizierten HEK-Zellen. **A)** Detektion des FLPe Proteins bei 49,6 kDa durch polyklonalen Antikörper. (1) Negativkontrolle: transfizierter Leervektor; (2) Negativkontrolle: einzeln transfiziertes LungGlow 2 Plasmid; (3) Dreifach-Transfektion mit den Plasmiden für *cmv-tTA*, *TetO-FLPe*, LungGlow 2 Plasmid; (4) Positivkontrolle: *cmv*-Promoter/*FLPe* + LungGlow 2 Plasmid. **B)** Detektion des *housekeeping* Proteins β -Aktin bei ca. 42 kDa zur Überprüfung der aufgetragenen Proteing Gesamtmenge. Aufgetragene Marker (M): MagicMark™ XP Standard (links), Novex® Sharp Standard (rechts). (X) Bande ohne Auftragung.

Da jedoch die reine Anwesenheit des Proteins keine Aussage über seine Aktivität zulässt, wurden zur Funktionalitäts-Überprüfung HEK-Zellen wiederum mit den drei Plasmiden transfiziert (1) *cmv-tTA*, (2) *TetO-FLPe*, (3) LungGlow 2 Plasmid. Die Reaktion bei 0 ng/ μ l, 1 ng/ μ l und 10 ng/ μ l Doxycyclin im Medium wurde mittels Fluoreszenz-Mikroskopie und Durchfluss-Cytometrie untersucht. Bei der ersten Sichtung im Fluoreszenz-Mikroskop zeigte sich, dass dreifach-transfizierte HEK-Zellen ohne Doxycyclin eine schwache, aber sichtbare GFP-Fluoreszenz aufwiesen. Diese Fluoreszenz schien in Quantität und Intensität mit gesteigerter Doxycyclinkonzentration im Medium abzunehmen, verschwand aber bei den gewählten Konzentrationen nie ganz (Abbildung 3-16). Die als Kontrollen einzeln transfizierten Plasmide zeigten jeweils keine sichtbare Fluoreszenz (Daten nicht gezeigt).

Eine Quantifizierung der GFP fluoreszierenden Zellen erfolgte mittels Durchfluss-Cytometrie. Hierfür wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Als Positivkontrolle diente eine Transfektion mit einem *GFP* Reporterplasmid unter dem *cmv*-Promoter. Die Transfektionseffektivität, gemessen am Prozentsatz grün detektierter lebender Zellen der Positivkontrolle, lag bei 84 %, 97 % und 100 %. Als Negativkontrollen wurden (1) ein transfizierter Leervektor ohne genetische Information und (2) untransfizierte HEK-Zellen, behandelt mit den unterschiedlichen Doxycyclin-Konzentrationen gewählt. Letzteres diente der Überprüfung, ob das Doxycyclin selbst fluoreszent war oder die (Auto)Fluoreszenz der Zellen beeinflussen konnte. Alle Negativkontrollen ergaben eine detektierte GFP Fluoreszenz von unter 1 % (Daten nicht gezeigt). Die Eigenfluoreszenz des einzeln transfizierten LungGlow 2 Reporterplasmids wurde ebenfalls überprüft. Der Anteil der in der Durchfluss-Cytometrie detektierten grün fluoreszierenden Zellen lag bei 7 %, 10 % und

26 %, ohne die Gabe von Doxycyclin. Die Dreifach-Transfektion zum Test der Sensitivität des LungGlow 2-*Tet Off*-Systems in Bezug auf einzelne Doxycyclinkonzentrationen ergab im Durchschnitt aller drei Versuche einen Anteil GFP detektierter Zellen von 42 % bei 0 ng/ml Doxycyclin, 16 % bei 1 ng/ml Doxycyclin und 14 % bei 1 ng/ml Doxycyclin (Abbildung 3-17). Bei Betrachtung der Einzelexperimente entsprach der Prozentsatz der GFP fluoreszenten Zellen unter Doxycyclingabe (unabhängig von der Konzentration) etwa dem Wert, der als Eigenfluoreszenz des einzeln transfizierten LungGlow 2 Reportergenplasmids ermittelt wurde.

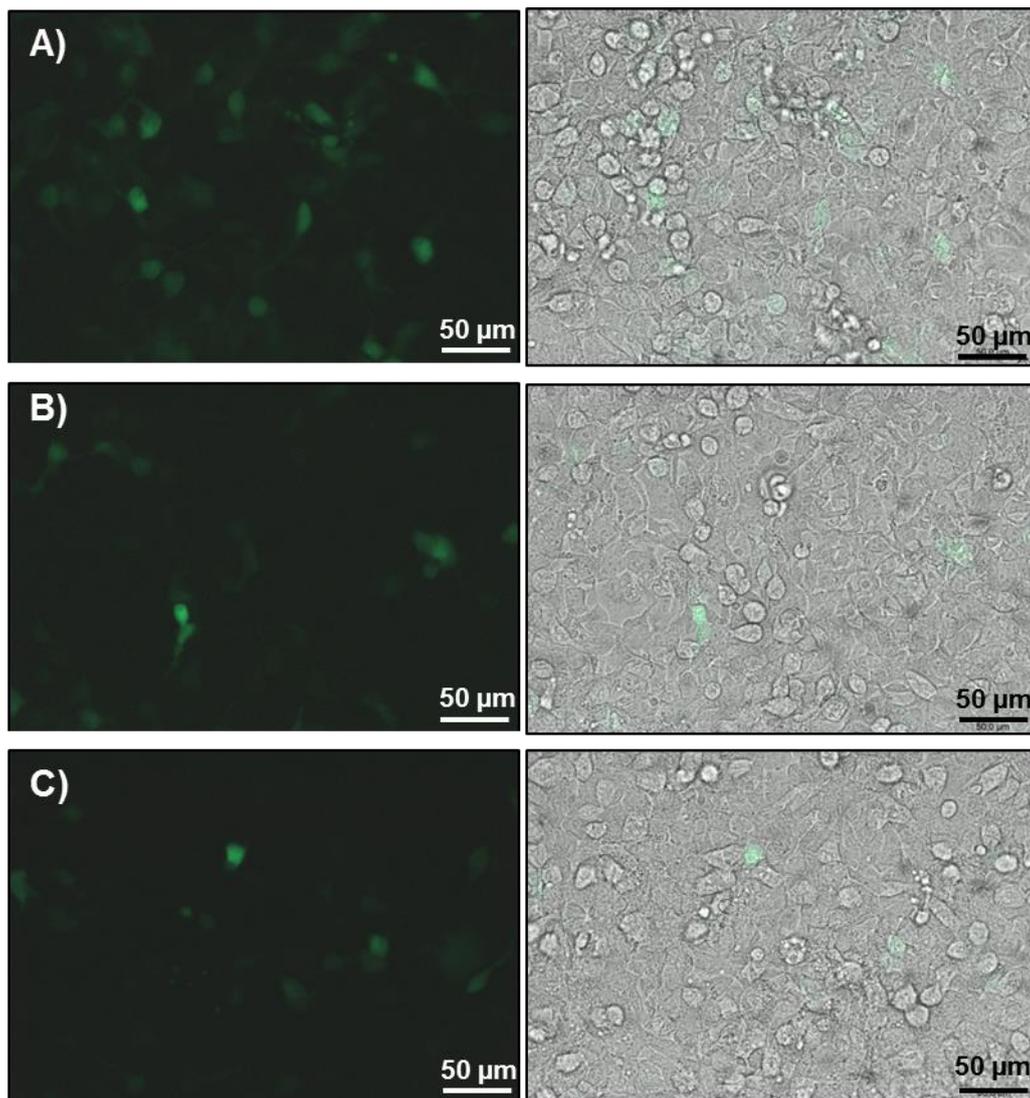


Abbildung 3-16: Ausprägung der GFP-Fluoreszenz nach der Transfektion mit drei Plasmiden (Konstrukträger von (1) *cmv*-Promoter/*tTA* (2) *Tet-Operator*/*FLPe* und (3) LungGlow 2 Plasmid) bei unterschiedlichen Doxycyclinkonzentrationen.

A) GFP Expression bei 0 ng/µl Doxycyclin. **B)** GFP Expression bei 0,001 ng/µl Doxycyclin. **C)** GFP Expression bei 0,01 ng/µl Doxycyclin. Dokumentiert sind die Fluoreszenz (linke Abbildungen) sowie die Überlagerung mit dem Durchlichtbild (rechte Abbildungen).

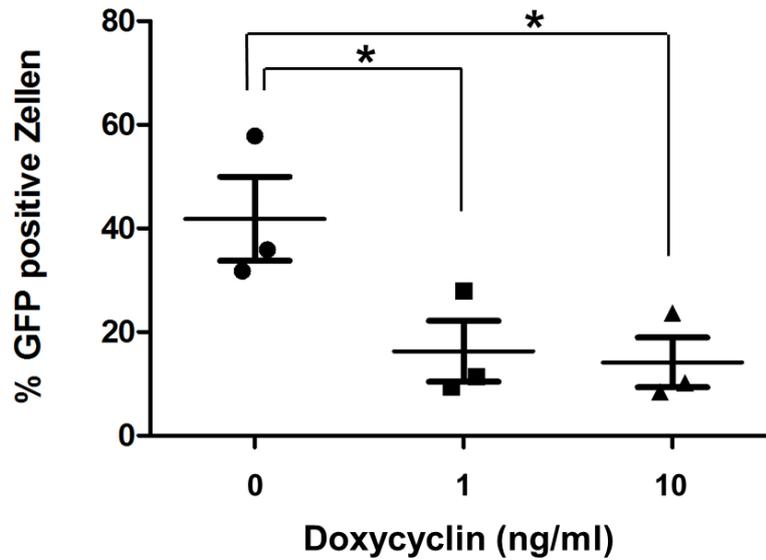


Abbildung 3-17: *In vitro* Test der Funktion und Sensitivität des LungGlow 2 Systems bezüglich unterschiedlicher Doxycyclinkonzentrationen.

Ergebnis der Dreifach-Transfektionen bei einer Konzentration von 0, 1 und 10 ng/ml Endkonzentration Doxycyclin im Medium, ermittelt durch die Detektion grüner Fluoreszenz mittels Durchfluss-Cytometrie. Bei 0 ng/ml Doxycyclin ergab sich ein Anteil grün detektierter Zellen von 32, 36 und 58 %. Bei 1 ng/ml lag der Anteil bei 9, 11 und 28 % und bei 10 ng/ml bei 9, 10 und 24 %. Die statistische Auswertung mittels *one-way*-ANOVA ergab einen signifikanten Unterschied im prozentualen Anteil grün detektierter Zellen, ausschließlich abhängig von der Abwesenheit bzw. Anwesenheit von Doxycyclin im Medium bei den gewählten Doxycyclinkonzentrationen. Zwischen den verschiedenen Doxycyclinkonzentrationen (1 und 10 ng/ml) konnte kein signifikanter Unterschied im Anteil grün detektierter Zellen festgestellt werden, ermittelt mit einem Ausschluss von 5 % ($p < 0,05$). Die Gruppen, die signifikant unterschiedlich sind wurden durch (*) markiert.

4 Diskussion

Das *Lineage Tracing*, hier im engeren Sinne als genetisches *Tracing* angewendet, bietet auf Grund der in der Vergangenheit entwickelten Techniken eine Vielzahl von Möglichkeiten, Zellschicksale in Bezug auf unterschiedliche wissenschaftliche Fragestellungen untersuchen zu können. Die dafür benötigten Tools in Form von genetisch veränderten Organismen müssen der jeweiligen Fragestellung angepasst sein und bedürfen in der Generierung einer sorgfältigen Planung und Überprüfung der Ergebnisse.

4.1 Das Design von LungGlow 1

Das LungGlow 1 Konstrukt war für eine dauerhafte, stabile und parallele Reporterexpression designt, abhängig von der Aktivität des jeweiligen zellspezifischen Promoters in den einzelnen Zelltypen, wodurch eine zellspezifische Quantifizierung, stereologische Untersuchungen, Sortierungen und Vereinzelungen von Zelltypen sowie weitere molekularbiologische und proteinbiochemische Untersuchungen in unterschiedlichen Stadien experimentell induzierter Lungenerkrankungen (IPF, COPD und PAH) ermöglicht werden sollten.

Lungen-*Surfactant*, bestehend aus verschiedenen Proteinen (SP-A bis SP-D), wird in den Alveolen von distinkten cuboidalen Typ II-Epithelzellen gebildet und sekretiert, wobei das *SP-C* das einzige Gen ist, das ausschließlich in den Typ II-Zellen exprimiert wird. Der 4,8 kb große murine *SP-C* Promoter wurde als zellspezifischer Promoter zur Markierung der Typ II-Epithelzellen ausgewählt. Er ist charakterisiert und weist in *in vivo* Expressionsexperimenten mit transgenen Mäusen eine durch entsprechende Reporterexpression erwiesene gewebe- und zellspezifische Aktivität auf. Die Expression entspricht der des endogenen *SP-C* Gens während der Lungenentwicklung [76]. Kollagen I wird durch einen Heterotrimer gebildet, der aus zwei $\alpha 1$ - und einer $\alpha 2$ -Untereinheit besteht. Typ I Kollagen ist als ein Hauptdifferenzierungsmarker für Fibroblasten anerkannt. Daher wurde der publizierte Minimalpromoter der $\alpha 2$ -Untereinheit des Kollagen I als spezifischer Promoter für Fibroblasten verwendet [78]. SM22 α ist auch als Transgelin bekannt und wird überwiegend als ein auf die Zelllinie der glatten Muskelzellen beschränktes Protein bezeichnet, das in der Maus durch ein einziges Gen kodiert wird. Es wird als früher Marker in der Differenzierung von glatten Muskelzellen beschrieben [84], ist im adulten Organismus ubiquitär in den glatten Muskelzellen vertreten [77] und zeigt unabhängig vom jeweiligen Phänotyp der glatten Muskelzellen („ruhend/kontraktil“ oder „proliferierend/synthetisch“) *in vitro* eine stabile Expression [85]. Verschiedene Aktivitätsstudien mit einem definierten Minimalpromoter als Transgen zeigen, dass dieser im adulten transgenen Organismus (im Gegensatz zum endogenen Promoter) nur in den glatten Muskelzellen der Arterien, jedoch nicht in venösen

oder viszerale glatte Muskelzellen aktiv ist [77, 86]. Neuere Studien weisen darauf hin, dass die Transgelinexpression unter der Hypoxie-induzierten experimentellen pulmonalen Hypertonie in arteriellen glatten Muskelzellen heraufreguliert wird und eine Rolle in der Migrations- und Proliferationsfähigkeit der glatten Muskelzellen spielt [87]. Darüber hinaus scheint die Expression unter dem Bleomycin-induzierten Krankheitsbild der experimentellen Lungenfibrose sowie der IPF nicht auf glatte Muskelzellen beschränkt zu sein, sondern sich auch auf Typ II-Epithelzellen zu erstrecken [88] sowie in Trans-Differenzierungsprozessen von Fibroblasten zu Myofibroblasten induziert zu sein [89]. Diese Aspekte sind für Untersuchungen der Verhältnisse der durch LungGlow 1 angesprochenen Zelltypen zueinander bei Fragestellungen bezüglich unterschiedlicher Lungenerkrankungen interessant. Daher wurde der von Moessler *et al.* 1996 beschriebene Minimalpromoter [77] des *Transgelin/SM22* als zunächst zellspezifischer Promoter für die Markierung glatter Muskelzellen, jedoch mit dem Potential zur Markierung von Trans-Differenzierungsprozessen verwendet.

Die gewählten Fluorochrome mCherry, GFP und YFP wurden nach publizierten methodischen Kriterien ausgewählt [90] (1) einer geringen Toxizität im *in vivo* Modell, für mCherry und GFP nachgewiesen durch einschlägige Publikationen [91, 92] und (2) einer ausreichenden Photostabilität, die für die gewählten Fluorochrome publiziert ist [90]. Ein weiteres wichtiges Kriterium, ebenfalls bei Shaner *et al.* 2005 [90] gelistet, ist, dass bei Experimenten mit multiplen Fluorochromen eine möglichst geringe Interaktion zwischen den Exzitations- und Emissions-Kanälen vorliegen soll. Diese Feststellung ist in Bezug auf GFP und YFP durchaus kritisch zu sehen (Exzitation;Emission GFP 488;507 nm, YFP 514;527 nm, mCherry 587;610 nm), war jedoch in der Planungsphase des Projektes nicht zu vermeiden, da die technischen Voraussetzungen für eine Detektion eines Fluorochroms der Cyano-Klasse (z. B. CFP) im Durchfluss-Cytometer und Konfokalmikroskop nicht gegeben waren. Durch die technischen Voraussetzungen eben dieses Mikroskops sich ließen die GFP- und YFP Signale auftrennen.

Durch das Konstruktdesign sollten durch die Planung gegenläufiger Teilsequenzen (jeweils Promoter/Reportergeren) „Fremdaktivierungen“ durch Promotoren der anderen Konstruktteile schon im Vorfeld ausgeschlossen werden.

4.2 Das LungGlow 1 Projekt

Die Klonierung des Gesamtkonstrukts von LungGlow 1 war erfolgreich und konnte in seiner Gesamtlänge lückenlos sequenziert werden. Es ergaben sich keinerlei Mutationen in den einzelnen Konstruktteilen. *In vitro* wurden zunächst die einzelnen Konstruktteile auf ihre Funktionalität getestet. Hierfür wurde je ein Promoter/Reportergeren-Konstrukt transient transfiziert und die durch die Expression der Reportergerene unter dem Einfluss des

spezifischen Promoters entstandene Fluoreszenz überprüft und dokumentiert. Die Ausbildung der Fluoreszenzen und die Spezifität der verwendeten Zelltypen, hier isolierte Primärzellen der Typ II-Epithelzellen (additiv dazu die embryonale Epithelzelllinie MLE12) und primäre glatte Muskelzellen der Ratte sowie die lange etablierte murine Fibroblastenzelllinie NIH/3T3 sowie primäre murine Lungenfibroblasten lassen den Schluss zu, dass (1) die als zellspezifisch publizierten Promotoren in den entsprechenden Zellen *in vitro* aktiv sind und (2) die Fluorochrome *in vitro* in entsprechender Weise soweit exprimiert werden, dass die Fluoreszenzen in den lebenden Zellen im normalen Fluoreszenzmikroskop erkennbar und dokumentierbar sind. Dies gilt analog auch für das aus den funktionalen Einzelkonstrukten zusammengesetzte LungGlow 1 Gesamtkonstrukt, das in ähnlicher Form *in vitro* mit Erfolg getestet wurde. Auf Grund des eindeutigen Ergebnisses der MLE12 Transfektion wurde hier jedoch auf eine Transfektion primärer Typ II-Epithelzellen verzichtet.

Die Erstellung transgener LungGlow 1 Mäuse war nicht erfolgreich. Die Überprüfung des Lungengewebes der generierten *Founder* sowie der F1 Generation erbrachte in keinem Fall eine eindeutige, flächendeckende und zellspezifische Fluoreszenz. Für die stabile Integration des linearisierten LungGlow 1 Konstrukts in das Mausgenom wurde die Methode der zufallsbasierten Integration von DNA durch Pronuklear-Mikroinjektion (sogenannte *random integration*) gewählt. Die Effektivität hängt, trotz einer methodischen Standardisierung, weiterhin von verschiedenen, unabhängigen Faktoren ab. Ein limitierender Faktor während des Integrationsvorgangs kann die Struktur der DNA sein, da Sekundärstrukturen und sogenannte *supercoiled* Strukturen (Beschreibung einer sehr starken Verdrillung des DNA-Moleküls) die Integrationsfähigkeit der DNA reduzieren [93]. Das LungGlow 1 Plasmid weist eine sehr dominante Sekundärstruktur zwischen den beiden „Kopf zu Kopf“ liegenden SV40-Poly(A) des *mCherry* und *GFP* auf, die jedoch auf diesen kleinen DNA-Abschnitt beschränkt bleibt und von langen linearen „Armen“, nämlich dem *SP-C*-Promoter, *mCherry* und dem Konstruktteil *GFP*, *Kollagen I*-Promoter, *YFP* flankiert ist. Auch wenn die Integrationseffektivität reduziert gewesen sein sollte, konnten in den Genotypisierungsanalysen der transgenen *Founder* und der F1 Generation durch zwei unabhängige PCRs die Anwesenheit des *mCherry* Gens und des Konstruktteils *Kollagen I*-Promoter, *YFP* und damit eine erfolgreiche Integration der DNA nachgewiesen werden. Die Gründe für den nicht ausgeprägten Phänotyp der transgenen Mäuse sind daher eher in der mangelhaften Ausprägung der Expression der Reportergene zu vermuten. Diese kann wiederum der *random integration*-Methode geschuldet sein. Es wurde gezeigt, dass durch diese Methode in den meisten Fällen mehr als eine Kopie des Transgens in eine Stelle des Mausgenoms integriert wird [94, 95]. Diese Aneinanderreihungen der DNA, die sogenannten *tandem repeats*, unterliegen einer höheren Wahrscheinlichkeit, im Genom der Maus deaktiviert zu werden (*silencing*) [96, 97]. Bezüglich der Vererbbarkeit der integrierten

Transgene wurde beobachtet, dass sich auch hier die Expressionsmuster verändern können, was aus der Veränderung von DNA-Methylierungen resultiert [98]. Diese Veränderungen über die Generationen spielen im konkreten Fall eine untergeordnete Rolle, da schon in den *Foundern* keine eindeutige Expression erkennbar war. Jedoch kann der epigenetische Effekt nicht vollständig ignoriert werden, da die Expression von zufallsintegrierten Transgenen von der sie umgebenden DNA abhängt. Epigenetische Modifikationen wie Methylierungen oder Histon-Acetylierungen der lokalen genomischen Umgebung können einen Einfluss auf die Expressionseffektivität der Transgene ausüben. Weitere, bei *random integration* nicht beeinflussbare chromosomale Positionseffekte können aus der Anwesenheit starker transkriptionaler Repressoren in der umgebenden DNA resultieren [99]. Für den murinen *SP-C* Promoter wurden *in vitro* Aktivitätsunterschiede durch eine Inkorporation in Chromatinstrukturen nachgewiesen [76]. Auf Grund der Diskrepanz der Expressionsmuster des endogenen *SM22* zu den publizierten Transgenen unter dem *SM22*-Minimalpromoter wurde die Vermutung aufgestellt, dass dieser DNA-Elemente enthält, die nur eine Aktivität im arteriellen, aber nicht im viszeralen oder venösen System zulassen, was auf weitere extrinsische transkriptionale Faktoren schließen lässt [77]. Dies wiederum würde einen eindeutigen Positionseffekt darstellen.

Diese Auswirkungen sind mit den im Vorfeld durchgeführten *in vitro* Kontrollen des Plasmids nicht abzuschätzen, da durch die durchgeführten transienten Transfektionen keine stabile Integration der DNA ins Zellgenom vorgenommen wird, die eventuelle Positionseffekte simulieren würde [99]. Die Durchführung stabiler Transfektionen erscheint als Alternative wenig sinnvoll, da jede Integration ins Genom zufallsbasiert und damit nicht abschätzbar bleibt. Dies hat in der *in vivo* Situation zur Folge, dass jeder generierte *Founder* eine eigene Mauslinie mit individuellem transgenen DNA-Verteilungsmuster darstellt, eine korrekte Ausprägung des Phänotyps möglich (für die Einzelpromotoren nachgewiesen in [76-78]), jedoch nicht vorhersagbar ist.

Fluoreszente Reportergene werden für die Visualisierung dynamischer Zellprozesse und Promoteraktivitäten eingesetzt, da keine Gewebefixierung für ihren Nachweis notwendig ist [99]. Es werden für ihren Einsatz starke, teilweise ubiquitär aktive Promotoren empfohlen, da die Sensitivität bei einer Fluoreszenzdetektion geringer ist als z.B. einer β -Galaktosidase Färbung [57], wie sie bei der Promoterstudie zu *SM22* angewendet wurde [77]. Daher ist zu überdenken, ob die Aktivität der in LungGlow 1 eingesetzten Promotoren, die endogen auf Grund der Funktionen der zugeordneten Gene einer zellulären Aktivitätskontrolle unterliegen, genügt, um eine Fluoreszenzexpression der Reportergene in ausreichendem Maße zu gewährleisten.

4.3 Gezielte Zell-Dezimierung durch HSV-TK

Für die Generierung eines Tiermodells mit dem Ziel einer gezielten Zelldeletion wurde die *in vivo* etablierte Methode der Expression der HSV-TK verwendet. Dieses System wurde durch eine Pronuklear-Injektion in die Maus eingebracht und erfolgreich von den erhaltenen *Foundern* in die F1 Generation weitervererbt. Der Erfolg der Methode ist von zwei experimentellen Parametern abhängig, (1) der restriktiven Expression der HSV-TK, beeinflussbar durch die Wahl des spezifischen Promoters und (2) der gezielten Gabe des Nukleosid-Analogs GCV, die eine Induktion und zeitliche Kontrolle der Zelldeletion ermöglicht [73]. Für die gezielte Eliminierung zirkulierender Fibrozyten wurde das charakterisierte und publizierte Plasmid Col1a2^{HSV-TK-GFP} (Col1-HSV-TK/GFP) verwendet, das generiert wurde, um Kollagen I exprimierende Fibroblasten nach der Induktion fibroproliferativer Erkrankungen entfernen zu können, was zur Charakterisierung der Fibroblasten in diesen Erkrankungen beitragen sollte [75]. Die Verwendung dieses Konstruktes zur Entfernung zirkulierender Fibrozyten wird dadurch ermöglicht, dass dieser Zelltyp das Charakteristikum der Kollagen I Expression mit den Fibroblasten teilt, diese Eigenschaft sogar als „Goldstandard“ zur Identifizierung des Fibrozyten-Zelltyps verwendet wird [39, 43, 46, 54]. Der *in vitro* Funktionalitätstest des Systems HSV-TK wurde jedoch indirekt, nämlich über die *in vitro* Deletion isolierter Lungenfibroblasten aus der transgenen F1 mittels unterschiedlicher GCV Konzentrationen durchgeführt und befindet sich damit experimentell in einer Linie mit der publizierten Erstcharakterisierung transgener Träger dieses Konstruktes [75]. Das System ist in den Mäusen funktional, da bei der Gabe selbst geringer Mengen GCV (0,2 µM) die isolierten transgenen Fibroblasten *in vitro* zu fast 100 % deletiert wurden, die Fibroblasten des Wildtyps erst bei 100 µM zu 50 %, was auf einen cytotoxischen Effekt dieser hohen GCV Konzentration schließen lässt.

Die gezielte Deletion der zirkulierenden Fibrozyten bei Ausschluss der Vernichtung lokaler Fibroblastenpopulationen wurde durch die weitere experimentelle Planung ermöglicht. Hierbei wurde das Knochenmark transgener Col1a2^{HSV-TK-GFP} Mäuse isoliert und in Wildtypmäuse transplantiert, deren Knochenmark zuvor durch Bestrahlung zerstört wurde. Dadurch wurde gewährleistet, dass alle aus dem Knochenmark stammenden Kollagen I exprimierenden Zellen transgen waren, also die HSV-TK trugen und, nach experimentellem Plan zeitlich kontrolliert, abgetötet werden konnten [Dr. Vandana S. Nikam, nicht publizierte Daten]. Die Fibrozyten werden als eine zirkulierende, aus dem Knochenmark stammende, Kollagen I exprimierende, intermediäre Zellpopulation charakterisiert [40, 41] wodurch eine Deletion der knochenmarksgenerierten transgenen Zellen durch HSV-TK/GCV, basierend auf dem Charakteristikum der Kollagen I Expression, spezifisch die Fibrozyten betrifft. Fibrozyten werden mit Lungenerkrankungen wie experimentellen Fibrosemodellen sowie experimenteller pulmonaler Hypertonie in Verbindung gebracht [47-49, 52] und in Patienten

mit fibrotischen interstitiellen Lungenerkrankungen und PH beschrieben [50, 54]. Durch die gezielte Deletion der HSV-TK positiven Zellen durch GCV im experimentellen Mausmodell der pulmonalen Hypertonie (Hypoxie-Induktion) konnte ein positiver Einfluss auf den Krankheitsverlauf nachgewiesen werden, der sich durch eine Reduzierung der Rechtsherz-Hypertrophie sowie die Reduzierung der Wanddicke pulmonaler Arteriolen auf Normalniveau ergab [Dr. Vandana S. Nikam, nicht publizierte Daten]. Durch das für diesen Zweck neu generierte transgene Modell Col1a2^{HSV-TK-GFP} zur genetischen Manipulation von Zellpopulationen konnten die Ergebnisse anderer, nicht genetischer Deletionsmodelle bezüglich der PH bestätigt werden [52].

4.4 Das Design von LungGlow 2

Das LungGlow 2 Projekt war darauf ausgelegt, ein vielseitig anwendbares System zu generieren, durch das Differenzierungs- und Trans-Differenzierungsprozesse mittels einer Fluoreszenzveränderung visualisiert werden sollten.

Für die Erstellung der einen transgenen Mauslinie wurde ein Zweifarben-Reportergenkonstrukt designet, das aus technischer Sicht eine Weiterentwicklung des LungGlow 1 Projektes darstellte. Für das Funktionieren des Gesamtprojektes, das als essentiellen Bestandteil die Rekombinationsreaktion mit Cre und/oder FLP beinhaltet, war es notwendig, Kriterien zu erarbeiten [100], die (1) die Chromatinstruktur des Locus zur DNA-Integration, (2) darauf folgend ebenfalls den Stand der DNA-Methylierung des umgebenden Genoms sowie (3) die transkriptionale Aktivität des Zweifarben-Reporters berücksichtigten.

In Folge dessen wurde die potentielle Problematik durch die Methode der zufallsbasierten Integration von DNA vollständig vermieden, da das Konstrukt für den spezifischen *knock-in* in den DNA-Lokus *Rosa26* geplant war. In diesen Lokus integrierte Reportergene zeichnen sich durch eine stabile und ubiquitäre Expression aus [65]. Die Aktivierung von in den Lokus eingebrachten und durch Cre-Mediation induzierbaren Reportergenen ist bestätigt [64]. Der mögliche Einfluss des endogenen *Rosa26*-Promoters wird durch die Verwendung eines modifizierten *Rosa26* Locus mit einer Insertion des ubiquitären, starken CAG-Promoters ausgeschaltet [58, 66, 82]. Als zweiter ubiquitärer Promoter wurde im Konstrukt der *PGK*-Promoter verwendet. Dieser ermöglicht im Promotervergleich *in vitro* eine über die Zeit konstante visualisierbare GFP-Expression, sowohl in undifferenzierten Zellen als auch in der Differenzierungsphase sowie in verschiedenen humanen und murinen Zelltypen [101, 102], die im Vergleich zur Expression unter dem CAG-Promoter jedoch geringer ausfällt. Die Verwendung eines zweiten CAG-Promoters im Konstrukt war jedoch ausgeschlossen um (1) Sekundärstrukturen im Konstrukt auf Grund der identischen Sequenz zu vermeiden und (2) Fehlrekombinationen während der Phase der homologen Rekombination in den ES-Zellen zu

verhindern, da der *CAG*-Promoter als homologe Sequenz für die Rekombination in den modifizierten *Rosa26* Locus verwendet werden sollte.

Weitere Sekundärstrukturen, wie sie in LungGlow 1 bei der „Kopf zu Kopf“ Anordnung der Reportergene *GFP* und *mCherry* beobachtet wurden, konnten durch den Austausch eines der SV40-Poly(A) durch einen sequenziell unterschiedlichen Poly(A) gelöst werden. Die Abwesenheit der Sekundärstrukturen wurde durch eine anschließende Sequenzierung speziell dieses Konstruktteils bestätigt. Für die von *loxP* oder *FRT* Sequenzen flankierten Expressionskassetten zur Verhinderung der Reporterexpression wurden zwei verschiedene Gene gewählt. Das Gen für die Neomycinresistenz wird während der Phase der ES-Zellkultur als positiver Selektionsmarker verwendet, um die ES-Zellen zu identifizieren, die das Konstrukt homolog rekombiniert und damit in die DNA integriert haben [103]. Das zweite Gen ist die humane alkaline Phosphatase (PLAP), ein etabliertes Reporter gen [99], das *in vivo* dazu verwendet werden kann, das Gewebe zu identifizieren, in dem keine Rekombinationsreaktion mit Cre oder FLP stattgefunden hat.

4.5 Das LungGlow 2 Projekt

Die Klonierung des Zweifarben-Reporter genkonstrukts von LungGlow 2 verlief erfolgreich und konnte durch die Sequenzierung des gesamten Konstrukts bestätigt werden, das keine Mutationen aufweist. Eine erste Überprüfung der Funktionalität des Konstrukts mittels Transformation in die entsprechenden Rekombinase exprimierenden Bakterien ergab, dass die klonierten Sequenzen (*loxP* und *FRT*) von den Enzymen angesprochen und die sequenzspezifische Rekombinationsreaktion durchgeführt wurde. Dadurch ergab sich die entsprechende Expression eines Fluoreszenz-Reporter gens. Das Ergebnis der Cre-basierten Rekombination war hierbei eindeutig und entsprach den Erwartungen eines langjährig *in vitro* und *in vivo* etablierten Systems [100].

Besondere Aufmerksamkeit verdiente das FLP-System. Hier war die Anzahl der GFP exprimierenden Zellen, die auf der Rekombination durch FLP basierten, geringer, was auf die Verwendung der nativen FLP zurückzuführen sein kann. Deren Rekombinationsaktivität ist im Vergleich zu der in Experimenten weit häufiger verwendeten FLPe (*enhanced*) niedriger [104]. Die Doppeltransfektion des Zweifarben-Reporters mit einer durch den *cmv*-Promoter exprimierten FLPe, deren Sequenz auch in LungGlow 2 weiterverwendet wurde, bestätigte die Funktionalität des Systems aus selbst generiertem Reporter genplasmid und der eingesetzten FLPe. Diese Rekombinase stellt somit eine funktionierende Ergänzung zum Cre/*loxP* System dar [105]. Eine quantitative Analyse der Effektivität war zu diesem Zeitpunkt nicht notwendig, da sich die FLPe noch nicht im endgültigen Plasmid befand, in dem sie eine Aktivität – abhängig vom Transaktivator – aufweisen sollte.

Eine Kreuzreaktion von *Cre/loxP* und *FLP/FRT*, die zur Expression der jeweils anderen Fluoreszenz geführt hätte, wurde nicht festgestellt. Die Systeme interagieren offensichtlich nicht miteinander. Damit können sie als unabhängige konditionale genetische Manipulationsmöglichkeiten in einer Mauslinie verwendet werden [61, 106].

Die Klonierung der FLPe, fusioniert mit einem Tet-Operator, war erfolgreich, was durch eine vollständige Sequenzierung bestätigt wurde. Um potentielle Probleme in der späteren Kreuzungsphase der transgenen Mauslinien zu vermeiden, wurde für den spezifischen *knock-in* dieses Konstrukts mit dem *HPRT*-Lokus ein anderer, auf Grund der ubiquitären Expression seines Gens *HPRT* permanent aktiver DNA-Lokus gewählt. Die Methode zur plasmidbasierten Rekonstitution des endogenen *HPRT* Gens durch homologe Rekombination in *HPRT* defizienten ES-Zellen ist etabliert und wird mit der Integration von Transgenen verbunden, die durch die Rekonstitutionsreaktion ebenfalls in den Lokus eingebracht werden [107, 108]. Die Expression der untersuchten *knock-ins* entspricht dabei weitestgehend der endogenen Aktivität. Im Gegensatz zu den Mauslinien, die mit der vergleichend durchgeführten Methode *random integration* generiert wurden, sind zwischen den aus verschiedenen murinen ES-Zellen entstandenen *knock-in* Mauslinien keine Expressionsunterschiede der einzelnen Transgene zu erkennen [107].

Der zentrale Aspekt dieses Teils der LungGlow 2 Projektes (TetO-FLPe), nämlich die Generierung eines Konstrukts zur temporalen Kontrolle der FLPe Rekombinaseaktivität *in vivo* durch das Tetracyclinsystem wurde für die FLPe noch nicht unternommen, ist jedoch für die Cre Rekombinase beschrieben. Durch sie ist bekannt, dass das System einer stabilen Reporter-gen-Expression in dreifach transgenen Mäusen mit (1) *cmv*-Promoter/*tTA*, (2) *TetO-Cre* und (3) *cmv*-Promoter/*β-Galaktosidase* unter der Mediation von *TetO-Cre* funktioniert und eine Repression der Expression durch Tetracyclin stattfindet. Eine strenge Kontrolle der Wirkung des Tetracyclin für eine erfolgreiche Repression ist jedoch unabdingbar [69, 109].

Zur *in vitro* Überprüfung der Funktionalität des TetO-FLPe Systems wurden Dreifach-Transfektionen mit entsprechenden Plasmiden durchgeführt, die ähnlich den oben aufgeführten funktionierten, nämlich (1) *cmv*-Promoter/*tTA*, (2) *TetO-FLPe* und (3) Zweifarben-Reporter-genplasmid *LungGlow 2*. Im Western Blot konnte die FLPe Expression, also die Herstellung des Proteins, aktiviert durch den Transaktivator, festgestellt werden. Dadurch wurde bewiesen, dass die Kommunikation zwischen dem Transaktivator und dem Tet-Operator *in vitro* einwandfrei funktioniert. Die Funktionalität der FLPe bezüglich des Zweifarben-Reporters *LungGlow 2* wurde anschließend durch die Analyse der GFP-Expression in den transfizierten Zellen überprüft und bestätigt, da sich eine GFP Fluoreszenz in 30 % – 60 % der Zellen ergab. Höhere Werte sind selbst bei einer guten Transfektionseffektivität nicht zu erwarten, da die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen

Transfektion jedes der drei Plasmide unabhängig voneinander zu werten ist und die Chance einer erfolgreichen Dreifach-Transfektion somit geringer ausfällt als die einer Einzelplasmid-Transfektion. *In vitro* konnte somit die erfolgreiche Interaktion der transfizierten Konstrukte nachgewiesen werden. Die Prüfung der temporalen Kontrolle, also der Funktionalität des Mechanismus des *Tet-Off* Systems, erfolgte durch die Gabe des Tetracyclin-Derivats Doxycyclin in unterschiedlichen Konzentrationen, durch die die Expression der FLPe und damit des GFP verhindert werden sollte. Der quantitative Nachweis der GFP Fluoreszenz im Durchfluss-Cytometer ergab eine starke, statistische signifikante Reduktion der Fluoreszenz schon bei der niedrigsten gewählten Doxycyclinkonzentration (1 ng/ml), was die Funktion und bekannte hohe Effektivität des *Tet-Off* Systems in Zusammenhang mit Doxycyclin *in vitro* bestätigt [www.tetsystems.com/science-technology/principles-components/]. Die dennoch festgestellte GFP Fluoreszenz lag auf oder leicht unter dem Level der gemessenen Fluoreszenz der mitgeführten Kontrolle, einer Einzeltransfektion des Zweifarben-Reporterplasmids LungGlow 2, mit der die Eigenfluoreszenz dieses Plasmids festgestellt wurde. Das Gesamtergebnis lässt bis hierhin die Interpretation zu, dass das überprüfte System tTA/TetO-FLPe/LungGlow 2 *in vitro* funktioniert und die temporäre Beeinflussung durch Doxycyclin möglich ist. Eine Deaktivierung der FLPe Expression und darauf folgend die Reduktion der GFP Expression bis auf den Eigenfluoreszenzstatus des LungGlow 2 Plasmids findet statt.

Die Ergebnisse zeigen, dass zukünftig primär die beobachtete GFP Fluoreszenz in Abwesenheit von FLPe untersucht werden sollte. Diese liegt, je nach Transfektionserfolg, *in vitro* zwischen 7 und 26 %. Selbst in etablierten unterschiedlich induzierbaren Systemen *in vivo* wie Dreifach-Transgenen mit tTA/TetO-Cre/Reporter [69] sowie CreERTM/Reporter-Transgenen [110] sind nicht induzierte oder trotz Repressor stattfindene Rekombinationen zu beobachten. Dennoch ist die Herkunft der beobachteten Fluoreszenz zu überprüfen, zumal sie bei der Einzeltransfektion des LungGlow 2 Plasmids im Durchfluss-Cytometer, jedoch nicht im Mikroskop detektiert wurde, was auf eine geringe Expressionsstärke schließen lässt. Ziel sollte sein, festzustellen, ob die Fluoreszenz auf der Anwesenheit von GFP beruht, also eine nichtinduzierte Aktivierung, eine sogenannte *leakiness* des Konstrukts vorliegt. Diese gälte es dann zu unterbinden, womöglich durch eine Modifizierung der Expressionskassette (Neomycinresistenz) und des dazugehörigen Poly(A). Darüber hinaus kann das Gesamtsystem noch auf eine Restaktivität der FLPe untersucht werden. Eine endgültige Aussage über die Funktionalität des LungGlow 2 Projektes ist jedoch erst durch die Erstellung und Analyse der transgenen Mäuse zu treffen.

4.6 Ausblick

Mit der Generierung der transgenen Mauslinien für ein funktionierendes LungGlow 2 Projekt kann ein umfangreicher Tool zur direkten Visualisierung von spezifischen Trans-Differenzierungsprozessen in definierten Geweben oder Zelltypen geschaffen werden. Diese sind, abhängig von der wissenschaftlichen Fragestellung, durch die Wahl der transgenen Promoter-Mauslinien eingrenzbar. Der Vorteil des LungGlow 2 gegenüber bisherigen Vielfarben-Reportern („*Brainbow*“ [62], „*Confetti*“ [71]) ist eine durch die Wahl des treibenden Promoters zielgerichtete, auf Gewebe oder Zelltypen beschränkte definierte Fluoreszenz, die diese von allen anderen Geweben/Zellen unterscheidet. Zufallsbasierte Rekombinationen oder „stochastische“ Vielfarbenreporter sind nicht Ziel dieses Projektes. Durch die gezielte Fluoreszenzmarkierung ist es möglich, mit Zellpopulationen von Interesse weitere Untersuchungen quantitativer, molekularbiologischer oder proteinbiochemischer Art durchzuführen. Einblicke in die Rolle und das Zusammenspiel der Zelltypen unter bestimmten entwicklungsbiologischen oder pathologischen Bedingungen werden ermöglicht. Im Zusammenhang mit LungGlow 1 wäre die Anwendung von LungGlow 2 mit z. B. *SP-C/Cre* und einem Mesenchymal-Promoter/*tTA* eine Möglichkeit, gezielt den Zusammenhang der *Remodeling*-Prozesse zwischen Epithelium und Mesenchym zu analysieren, wie sie in unterschiedlicher Art bei den verschiedenen, schwerwiegenden Lungenerkrankungen wie der COPD beobachtet werden. Eine reine Konzentration auf die von pathologischen Veränderungen betroffenen Subtypen eines Zelltypes, z. B. der Fibroblasten, wäre ebenfalls denkbar. Dort könnten eine *Kollagen I* Promoter gekoppelte Cre und ein α -SMA-Promoter/*tTA* in Kombination mit LungGlow 2 Informationen über die Fibroblastenverteilung in Unterscheidung von Myofibroblasten und glatten Muskelzellen liefern, Aspekte, die für die Untersuchung fibrotischer Veränderungen in IPF und PAH von Bedeutung sind. Fragestellungen, die durch das LungGlow 1 Projekt bisher nicht beantwortet werden konnten, würden so wieder aufgegriffen.

Darüber hinaus stellt das LungGlow 2 Projekt eine wichtige Ergänzung zu der Untersuchung der Rolle der Fibrozyten durch das HSV-TK Projekt dar. Es konnte bisher in verschiedenen Untersuchungen festgestellt werden, dass der in den unterschiedlichen Publikationen als Fibrozyten definierter Zelltyp sowohl in die Entwicklung fibrotischer Erkrankungen als auch der PH involviert ist. Er wird als zirkulierende Vorläuferpopulation und eine Quelle der (Myo)Fibroblasten angesehen. Eine seit der Erstbeschreibung 1994 immer wieder diskutierte Problematik ist jedoch die Definition dieses Zelltypes, die sich auf Grund seiner Seltenheit, der Überlappung der Charakteristika mit anderen Zelltypen, insbesondere Monocyten, Macrophagen und Fibroblasten ergibt, sowie durch die *in vitro* beobachtete Veränderung des Expressionsprofils. Neben der Zell-Morphologie werden Kombinationen verschiedener Marker (z. B. Kollagen I, CD34, CD45, α -SMA) zur Identifizierung herangezogen, die jedoch

an sich keine Ausschließlichkeitsmerkmale darstellen und darüber hinaus teilweise intrazellulär exprimiert sind. Dadurch sind funktionale Untersuchungen nach der Detektion durch Färbung ausgeschlossen. Die vielfältigen, teilweise als unzureichend diskutierten Abgrenzungen zu anderen Zelltypen führen im wissenschaftlichen Meinungs-austausch auch zu der Frage, ob dieser Zelltyp als solcher überhaupt existiert. Dieser Problematik könnte durch LungGlow 2 zumindest begegnet werden, indem die LungGlow 2 Rekombinationsreaktionen unter die Promotoren anerkannter Marker der Fibrozyten, z.B. CD34 und α -SMA, gestellt werden. Diese werden in Zusammenhang gebracht, sind bisher jedoch kaum in Kombination detektierbar, da sie als „früher“ Marker zirkulierender Fibrozyten (CD34) und „später“ Marker „ausdifferenzierter/reifer“ Fibrozyten/(Myo)Fibroblasten-ähnlicher Zellen (α -SMA) beschrieben werden. Ein gezielter Fluoreszenzumschlag im potentiellen „Reifungsprozess“, wie er durch LungGlow 2 ermöglicht würde, könnte hier im Zuge eines *Lineage Tracing* Aufschluss über den Verbleib der Zellpopulation liefern.

5 Zusammenfassung

Die Erforschung der molekularen Mechanismen und zellulären Zusammenhänge von entwicklungsbiologischen und pathologischen Prozessen sind in den letzten Jahrzehnten immer weiter in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen gerückt. Gerade in schwerwiegenden, weit verbreiteten und mit einer schlechten Prognose verbundenen Krankheitsbildern hat die Forschung zum Ziel, nicht nur die Symptomatik der Erkrankungen zu mildern, sondern über das Wissen der pathologischen Veränderungen eventuell reversible Mechanismen zu finden und zu aktivieren. Bei der Problematik schwerer Lungenerkrankungen wie der COPD, fibrotischer Krankheitsbilder und der PH sind es die Komplexität der Erkrankungen, die individuelle Ausprägung verschiedener Symptomatik, unbekannte Ursachen und teilweise überlappende Teilaspekte (Fibrose), die Definitionen oder klinische Klassifizierungen der Krankheitsbilder erschweren. Die Erforschung der molekularen Grundlagen der Erkrankungen verdeutlicht diese Problematik einmal mehr, da verschiedenste Zellinteraktionen, (Trans)-Differenzierungen, Proliferation und Apoptose, meist weiträumig unter dem Begriff *Remodeling* zusammengefasst, in unterschiedlichen Zelltypen auf engstem Raum stattfinden und beschrieben werden, jedoch die Ursachen sowie die zu Grunde liegenden Mechanismen kaum klar definiert werden können.

Ein erster Ansatz, dieser Problematik zu begegnen kann daher sein, einzelne, voneinander abgrenzbare pathologische Prinzipien des *Remodeling* (z. B. bestimmte Veränderungen des zellulären Programms) für die Markierung, Identifizierung, Vereinzelung und molekularen Charakterisierung von Zelltypen zu nutzen, die in die Erkrankungsprozesse involviert sind. Hierbei sind die in den letzten Jahrzehnten gemachten Fortschritte im *Lineage Tracing*, inklusive der genetischen Manipulation und Herstellung transgener Organismen von Nutzen, die das Wissen um molekulare/zelluläre Veränderungen mit Reporter-Gen-Techniken verknüpfen und *Remodeling*-Prozesse sichtbar machen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Projekte sollten durch die Weiterentwicklung bestehender transgener Techniken einen Beitrag zu der oben genannten Problematik leisten. Hierbei verfolgten die drei Projekte unterschiedliche Zielsetzungen.

LungGlow 1 war ein Projekt, das vor allem die Interaktion von Epithelium und Mesenchym und den quantitativen Nachweis der pathologischen Veränderungen parallel in den betroffenen Zelltypen aufzeigen sollte. Das letztendliche Ziel hierbei lag auf der Untersuchung der Erscheinungsformen der COPD, bei der die zu detektierenden Zelltypen in besonderem Maße von *Remodeling*-Prozessen betroffen waren. Das Scheitern dieses Projektes ist in diesem Fall wahrscheinlich auf die Unwägbarkeiten der gewählten Methode

zurückzuführen, ein bedauerlicher Aspekt, von dem in letzter Konsequenz jedoch das LungGlow 2 Projekt profitieren konnte.

HSV-TK, das Projekt zur gezielten Deletion von Fibrozyten, wurde in dieser Arbeit nur anfänglich bezüglich der *in vitro* Funktionalität begleitet. Die weiterführenden, in dieser Arbeit nicht mehr thematisierten experimentellen Ausführungen hinsichtlich der Rolle des untersuchten Zelltyps in der experimentellen pulmonalen Hypertonie zeigten jedoch, dass durch die gezielte Entfernung die Symptome und zelluläre Veränderungen dieser Erkrankung vermindert werden. Diese Aspekte machen die Fibrozyten zu einem Kandidaten für weitere Untersuchungen, auch in Bezug auf eventuelle Interaktionen mit anderen Zelltypen oder Differenzierungs-Prozesse im Zielgewebe der Lunge.

Das LungGlow 2 Projekt stellte eine Weiterentwicklung zu LungGlow 1 und eine Parallelentwicklung zum HSV-TK Projekt dar und ist dennoch als eigenständig in Aufbau und Zielsetzung zu betrachten. Das statische Modell, das das LungGlow 1 Projekt noch darstellte, wurde weiterentwickelt zu Gunsten eines dynamischen, durch Induzierbarkeit kontrolliert einsetzbaren und nur durch die Wahl entsprechend zu verpaarender Mauslinien begrenzten Systems zur direkten Fluoreszenzmarkierung definierter Zelltypen und eventuell von ihnen ausgehender (Trans)Differenzierungs- und *Remodeling*-Prozesse. Mit der *in vivo* Übertragung des bisher *in vitro* erfolgreich getesteten Systems können im Zuge zukünftiger Arbeiten unterschiedliche wissenschaftliche Fragestellungen untersucht werden, die durch die bisherigen Modelle des HSV-TK bezüglich der PH und insbesondere des LungGlow 1 Projektes nicht beantwortet werden konnten.

6 Summary

Over the past decades, research into the molecular mechanisms of developmental and pathological processes has intensified. In particular in the case of severe disease accompanied by poor prognosis, the aims of this research is not only to alleviate symptoms, but also – through improved knowledge about the pathomechanisms at play – to manage or cure the disease by activating mechanisms that reverse the disease process. The problems encountered with the management and treatment of severe lung diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD), fibrotic diseases and pulmonary arterial hypertension (PAH), include disease complexity, inter-patient variation in terms of symptoms, severity, and aetiology and overlapping pathology (such as fibrosis). Central to lung disease pathophysiology is tissue remodelling, which encompasses cell differentiation, apoptosis, proliferation, and intercellular communication. However, the signals that guide these processes during tissue remodelling are currently not delineated.

Further research into the pathomechanisms of lung disease must focus on identifying single, definable pathways of tissue remodelling. This will be facilitated by marking, identifying and characterizing cell types relevant to the disease process. Lineage tracing, which has been developed as a methodology over the past decades, and which includes the genetic manipulation and generation of transgenic animals, can be used to combine the knowledge of molecular and cellular changes with reporter gene techniques to visualize these remodelling processes. In this thesis three projects have been introduced, using transgenic approaches, to address these issues.

The first of these projects, named “LungGlow 1” was designed for the visualization of interactions between the epithelium and mesenchyme, for the quantitative analysis of pathological changes in parallel, in the affected cell types. Substantial technical problems were encountered during the development of this project, most notably, that the lack of inducibility of the system, as well as the random integration of the constructs, which yielded reporter mice where the expression levels of reporter genes could not be controlled. Ultimately, the further development of LungGlow 1 was abandoned; however, the knowledge gleaned was instrumental in the initiation of LungGlow 2, described further below.

The second of these projects, named “HSV-TK”, was a project that facilitated the deletion of fibrocytes *in vivo*. Only part of the full HSV-TK project is covered here, as this represents a split project undertaken by multiple investigators. The aspects of the HSV-TK project undertaken personally by the candidate included that validation of the inducibility of the transgene, since this knowledge had been acquired by the applicant during the LungGlow 1 project.

The third and final project presented in this dissertation is LungGlow 2, which represents an advance over the abandoned LungGlow 1 project. In LungGlow 2, a directed, forced integration approach was applied, and an element of inducibility was applied to the methodological approach. If further developed, LungGlow2 represents a highly dynamic, inducible and controllable system for the direct labelling of defined cell-types to study transdifferentiation and remodelling processes operative during lung development and disease.

7 Literaturverzeichnis

1. Shi, W., J. Xu, and D. Warburton, *Development, repair and fibrosis: what is common and why it matters*. *Respirology*, 2009. **14**(5): p. 656-65.
2. Rock, J.R., S.H. Randell, and B.L. Hogan, *Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling*. *Dis Model Mech*, 2010. **3**(9-10): p. 545-56.
3. Lopez, A.D. and C.C. Murray, *The global burden of disease, 1990-2020*. *Nat Med*, 1998. **4**(11): p. 1241-3.
4. Terzano, C., et al., *Comorbidity, hospitalization, and mortality in COPD: results from a longitudinal study*. *Lung*, 2010. **188**(4): p. 321-9.
5. du Bois, R.M., *Strategies for treating idiopathic pulmonary fibrosis*. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. **9**(2): p. 129-40.
6. Salazar, L.M. and A.M. Herrera, *Fibrotic response of tissue remodeling in COPD*. *Lung*, 2011. **189**(2): p. 101-9.
7. Rubin, L.J., *Cellular and molecular mechanisms responsible for the pathogenesis of primary pulmonary hypertension*. *Pediatr Pulmonol Suppl*, 1999. **18**: p. 194-7.
8. Zandvoort, A., et al., *Altered expression of the Smad signalling pathway: implications for COPD pathogenesis*. *Eur Respir J*, 2006. **28**(3): p. 533-41.
9. Atzori, L., et al., *Absence of proteinase-activated receptor-1 signaling in mice confers protection from fMLP-induced goblet cell metaplasia*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009. **41**(6): p. 680-7.
10. Rufino, R., et al., *Quantitative assessment of elastic fibers in chronic obstructive pulmonary disease*. *J Bras Pneumol*, 2007. **33**(5): p. 502-9.
11. Saetta, M., et al., *Goblet cell hyperplasia and epithelial inflammation in peripheral airways of smokers with both symptoms of chronic bronchitis and chronic airflow limitation*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. **161**(3 Pt 1): p. 1016-21.
12. Zanini, A., et al., *Bronchial vascular remodelling in patients with COPD and its relationship with inhaled steroid treatment*. *Thorax*, 2009. **64**(12): p. 1019-24.
13. Chaouat, A., R. Naeije, and E. Weitzenblum, *Pulmonary hypertension in COPD*. *Eur Respir J*, 2008. **32**(5): p. 1371-85.
14. Falk, J.A., et al., *Lung elastic recoil does not correlate with pulmonary hemodynamics in severe emphysema*. *Chest*, 2007. **132**(5): p. 1476-84.
15. Inoue, K., et al., *Extensive Analysis of Elastase-Induced Pulmonary Emphysema in Rats: ALP in the Lung, a New Biomarker for Disease Progression?* *J Clin Biochem Nutr*, 2010. **46**(2): p. 168-76.
16. Murarescu, E.D., F. Eloae-Zugun, and M.S. Mihailovici, *Experimental COPD induced by solid combustible burn smoke in rats: a study of the emphysematous changes of the pulmonary parenchyma*. *Rom J Morphol Embryol*, 2008. **49**(4): p. 495-505.
17. Bois, R.M.d., *Diffuse parenchymal lung disease*, in *Oxford Textbook of Medicine*, T.M.C. David A. Warrell, John D. Firth, Editor 2005, Oxford University Press.
18. Selman, M., T.E. King, and A. Pardo, *Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy*. *Ann Intern Med*, 2001. **134**(2): p. 136-51.
19. Hoepfer, M.M., et al., *Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension*. *J Am Coll Cardiol*, 2013. **62**(25 Suppl): p. D42-50.
20. Sakao, S., K. Tatsumi, and N.F. Voelkel, *Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension: apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation*. *Respir Res*, 2009. **10**: p. 95.
21. McGoon, M.D., et al., *Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries*. *J Am Coll Cardiol*, 2013. **62**(25 Suppl): p. D51-9.
22. Seeger, W., et al., *Pulmonary hypertension in chronic lung diseases*. *J Am Coll Cardiol*, 2013. **62**(25 Suppl): p. D109-16.
23. Tuder, R.M., et al., *Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension*. *J Am Coll Cardiol*, 2013. **62**(25 Suppl): p. D4-12.

24. Ameshima, S., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) expression is decreased in pulmonary hypertension and affects endothelial cell growth*. *Circ Res*, 2003. **92**(10): p. 1162-9.
25. Fishman, A.P., et al., *Mechanisms of proliferative and obliterative vascular diseases. Insights from the pulmonary and systemic circulations. NHLBI Workshop summary*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. **158**(2): p. 670-4.
26. Nicolls, M.R., et al., *Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective*. *Eur Respir J*, 2005. **26**(6): p. 1110-8.
27. Weir, E.K. and S.L. Archer, *Counterpoint: Hypoxic pulmonary vasoconstriction is not mediated by increased production of reactive oxygen species*. *J Appl Physiol* (1985), 2006. **101**(3): p. 995-8; discussion 998.
28. Ingram, D.A., et al., *Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells*. *Blood*, 2005. **105**(7): p. 2783-6.
29. Ingram, D.A., et al., *Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood*. *Blood*, 2004. **104**(9): p. 2752-60.
30. Hellstrom, M., et al., *Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse*. *Development*, 1999. **126**(14): p. 3047-55.
31. Hirschi, K.K., S.A. Rohovsky, and P.A. D'Amore, *PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate*. *J Cell Biol*, 1998. **141**(3): p. 805-14.
32. Lindahl, P., et al., *Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice*. *Science*, 1997. **277**(5323): p. 242-5.
33. Diez, J., et al., *Altered regulation of smooth muscle cell proliferation and apoptosis in small arteries of spontaneously hypertensive rats*. *Eur Heart J*, 1998. **19 Suppl G**: p. G29-33.
34. Li, S., et al., *Evidence from a novel human cell clone that adult vascular smooth muscle cells can convert reversibly between noncontractile and contractile phenotypes*. *Circ Res*, 1999. **85**(4): p. 338-48.
35. Owens, G.K., M.S. Kumar, and B.R. Wamhoff, *Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease*. *Physiol Rev*, 2004. **84**(3): p. 767-801.
36. Pollman, M.J., et al., *Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease*. *Nat Med*, 1998. **4**(2): p. 222-7.
37. Zhang, S., et al., *Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003. **285**(3): p. L740-54.
38. Stenmark, K., A. Durmowicz, and E. Dempsey, *Modulation of vascular wall cell phenotype in pulmonary hypertension*. *Pulmonary vascular remodeling*, 1995: p. 171-212.
39. Bucala, R., et al., *Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair*. *Mol Med*, 1994. **1**(1): p. 71-81.
40. Moore, B.B., et al., *CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury*. *Am J Pathol*, 2005. **166**(3): p. 675-84.
41. Andersson-Sjoland, A., et al., *Fibrocytes are associated with vascular and parenchymal remodelling in patients with obliterative bronchiolitis*. *Respiratory Research*, 2009. **10**.
42. Pilling, D., et al., *Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts*. *PLoS One*, 2009. **4**(10): p. e7475.
43. Abe, R., et al., *Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites*. *J Immunol*, 2001. **166**(12): p. 7556-62.
44. Chesney, J., et al., *The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(12): p. 6307-12.

45. Metz, C.N., *Fibrocytes: a unique cell population implicated in wound healing*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(7): p. 1342-50.
46. Chesney, J., et al., *Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes*. J Immunol, 1998. **160**(1): p. 419-25.
47. Epperly, M.W., et al., *Bone marrow origin of myofibroblasts in irradiation pulmonary fibrosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **29**(2): p. 213-24.
48. Hashimoto, N., et al., *Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis*. J Clin Invest, 2004. **113**(2): p. 243-52.
49. Phillips, R.J., et al., *Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis*. J Clin Invest, 2004. **114**(3): p. 438-46.
50. Mehrad, B., et al., *Circulating peripheral blood fibrocytes in human fibrotic interstitial lung disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **353**(1): p. 104-8.
51. Andersson-Sjoland, A., et al., *Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(10): p. 2129-2140.
52. Frid, M.G., et al., *Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage*. Am J Pathol, 2006. **168**(2): p. 659-69.
53. Hayashida, K., et al., *Bone marrow-derived cells contribute to pulmonary vascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertension*. Chest, 2005. **127**(5): p. 1793-8.
54. Yeager, M.E., et al., *Circulating fibrocytes are increased in children and young adults with pulmonary hypertension*. Eur Respir J, 2012. **39**(1): p. 104-11.
55. Schmidt, M., et al., *Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma*. J Immunol, 2003. **171**(1): p. 380-9.
56. Kretzschmar, K. and F.M. Watt, *Lineage tracing*. Cell, 2012. **148**(1-2): p. 33-45.
57. Auerbach, A.B., *Production of functional transgenic mice by DNA pronuclear microinjection*. Acta Biochim Pol, 2004. **51**(1): p. 9-31.
58. Buckingham, M.E. and S.M. Meilhac, *Tracing cells for tracking cell lineage and clonal behavior*. Dev Cell, 2011. **21**(3): p. 394-409.
59. Muzumdar, M.D., et al., *A global double-fluorescent Cre reporter mouse*. Genesis, 2007. **45**(9): p. 593-605.
60. Yamamoto, M., et al., *A multifunctional reporter mouse line for Cre- and FLP-dependent lineage analysis*. Genesis, 2009. **47**(2): p. 107-14.
61. Castrop, H., *Genetically modified mice-successes and failures of a widely used technology*. Pflugers Arch, 2010. **459**(4): p. 557-67.
62. Livet, J., et al., *Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system*. Nature, 2007. **450**(7166): p. 56-62.
63. Gordon, J.W. and F.H. Ruddle, *Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei*. Science, 1981. **214**(4526): p. 1244-6.
64. Mao, X., et al., *Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain*. Blood, 2001. **97**(1): p. 324-6.
65. Soriano, P., *Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain*. Nat Genet, 1999. **21**(1): p. 70-1.
66. Zong, H., et al., *Mosaic analysis with double markers in mice*. Cell, 2005. **121**(3): p. 479-92.
67. Feil, R., et al., *Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **237**(3): p. 752-757.
68. Gossen, M. and H. Bujard, *Tight Control of Gene-Expression in Mammalian-Cells by Tetracycline-Responsive Promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(12): p. 5547-5551.
69. St-Onge, L., P.A. Furth, and P. Gruss, *Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(19): p. 3875-7.
70. Strathee, C.A., M.R. McLeod, and J.R. Hall, *Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector*. Gene, 1999. **229**(1-2): p. 21-9.

71. Snippert, H.J., et al., *Intestinal Crypt Homeostasis Results from Neutral Competition between Symmetrically Dividing Lgr5 Stem Cells*. Cell, 2010. **143**(1): p. 134-144.
72. Snippert, H.J., et al., *Slide preparation for single-cell-resolution imaging of fluorescent proteins in their three-dimensional near-native environment*. Nat Protoc, 2011. **6**(8): p. 1221-8.
73. Heyman, R.A., et al., *Thymidine kinase obliteration: creation of transgenic mice with controlled immune deficiency*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(8): p. 2698-702.
74. Canfield, V., et al., *Genetic ablation of parietal cells in transgenic mice: a new model for analyzing cell lineage relationships in the gastric mucosa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2431-5.
75. Tian, B., et al., *An HSV-TK transgenic mouse model to evaluate elimination of fibroblasts for fibrosis therapy*. Am J Pathol, 2003. **163**(2): p. 789-801.
76. Glasser, S.W., et al., *The murine SP-C promoter directs type II cell-specific expression in transgenic mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **288**(4): p. L625-32.
77. Moessler, H., et al., *The SM 22 promoter directs tissue-specific expression in arterial but not in venous or visceral smooth muscle cells in transgenic mice*. Development, 1996. **122**(8): p. 2415-25.
78. Goldberg, H., et al., *Tissue-specific expression of the mouse alpha 2(I) collagen promoter. Studies in transgenic mice and in tissue culture cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(27): p. 19622-30.
79. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
80. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
81. Promega, *pGL3 Luciferase Reporter Vectors*, in *Technical Manual No. 0332002*, Promega Corporation: Madison, USA; www.promega.com. p. 40.
82. Niwa, H., K. Yamamura, and J. Miyazaki, *Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector*. Gene, 1991. **108**(2): p. 193-9.
83. Clontech, *pTRE-Tight Vector Information*. 2010. Protocol No. PT3720-5(Version No. PRO73605): p. 2.
84. Assinder, S.J., J.A. Stanton, and P.D. Prasad, *Transgelin: an actin-binding protein and tumour suppressor*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(3): p. 482-6.
85. Solway, J., et al., *Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 alpha*. J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 13460-9.
86. Li, L., et al., *Expression of the SM22alpha promoter in transgenic mice provides evidence for distinct transcriptional regulatory programs in vascular and visceral smooth muscle cells*. J Cell Biol, 1996. **132**(5): p. 849-59.
87. Zhang, R., et al., *Transgelin as a therapeutic target to prevent hypoxic pulmonary hypertension*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014. **306**(6): p. L574-83.
88. Yu, H., et al., *Transgelin is a direct target of TGF-beta/Smad3-dependent epithelial cell migration in lung fibrosis*. FASEB J, 2008. **22**(6): p. 1778-89.
89. Untergasser, G., et al., *Profiling molecular targets of TGF-beta1 in prostate fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation*. Mech Ageing Dev, 2005. **126**(1): p. 59-69.
90. Shaner, N.C., P.A. Steinbach, and R.Y. Tsien, *A guide to choosing fluorescent proteins*. Nat Methods, 2005. **2**(12): p. 905-9.
91. Okabe, M., et al., *'Green mice' as a source of ubiquitous green cells*. FEBS Lett, 1997. **407**(3): p. 313-9.
92. Shioi, G., et al., *A mouse reporter line to conditionally mark nuclei and cell membranes for in vivo live-imaging*. Genesis, 2011. **49**(7): p. 570-8.
93. Brinster, R.L., et al., *Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(13): p. 4438-42.
94. Brinster, R.L., et al., *Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs*. Cell, 1981. **27**(1 Pt 2): p. 223-31.
95. Gordon, J.W. and F.H. Ruddle, *DNA-mediated genetic transformation of mouse embryos and bone marrow--a review*. Gene, 1985. **33**(2): p. 121-36.

96. Garrick, D., et al., *Repeat-induced gene silencing in mammals*. Nat Genet, 1998. **18**(1): p. 56-9.
97. Lau, S., K. Jardine, and M.W. McBurney, *DNA methylation pattern of a tandemly repeated LacZ transgene indicates that most copies are silent*. Dev Dyn, 1999. **215**(2): p. 126-38.
98. Palmiter, R.D., H.Y. Chen, and R.L. Brinster, *Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring*. Cell, 1982. **29**(2): p. 701-10.
99. Liu, C., *Strategies for Designing Transgenic DNA Constructs*, in *Lipoproteins and Cardiovascular Disease - Methods and Protocols*, L.A. Freeman, Editor 2009, Humana Press.
100. Marie-Christine Birling, F.G., Xavier Warot, *Site-Specific Recombinases for Manipulation of the Mouse Genome*, in *Transgenesis Techniques - Principles and Protocols*, E.J. Cartwright, Editor 2009, Humana Press.
101. Qin, J.Y., et al., *Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10611.
102. Wang, R., et al., *Promoter-dependent EGFP expression during embryonic stem cell propagation and differentiation*. Stem Cells Dev, 2008. **17**(2): p. 279-89.
103. J. Simon, C.A., Victoria A. McGuire, *Gene-Targeting Vectors*, in *Transgenesis Techniques - Principles and Protocols*, E.J. Cartwright, Editor 2009, Humana Press.
104. Buchholz, F., P.O. Angrand, and A.F. Stewart, *Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(7): p. 657-62.
105. Rodriguez, C.I., et al., *High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP*. Nat Genet, 2000. **25**(2): p. 139-40.
106. Meyers, E.N., M. Lewandoski, and G.R. Martin, *An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination*. Nat Genet, 1998. **18**(2): p. 136-41.
107. Bronson, S.K., et al., *Single-copy transgenic mice with chosen-site integration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(17): p. 9067-72.
108. Thompson, S., et al., *Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells*. Cell, 1989. **56**(2): p. 313-21.
109. Branda, C.S. and S.M. Dymecki, *Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice*. Dev Cell, 2004. **6**(1): p. 7-28.
110. Rawlins, E.L., et al., *The role of Scgb1a1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(6): p. 525-34.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Das Prinzip der genetischen Rekombination.	18
Abbildung 1-2:	Auswirkungen der Anordnung von Rekombinase- <i>sites</i> und ihre praktische Anwendung.	19
Abbildung 1-3:	Prinzip des Tetracyclin-basierten Systems (<i>Tet-Off</i>) zur temporären Expressionskontrolle.	21
Abbildung 1-4:	Schematische Darstellung eines multifunktionalen <i>Cre/FLP</i> Reporters.	22
Abbildung 1-5:	Beispiele für vielfarbige Reporter-Systeme.....	23
Abbildung 1-6:	Das LungGlow-1 Prinzip.	26
Abbildung 1-7:	Das LungGlow 2 Prinzip.....	29
Abbildung 2-1:	Verwendeter Größenstandard für die Molekularbiologie (Thermo Scientific).	38
Abbildung 3-1:	Das LungGlow 1 Plasmid „pGL3-final“.....	60
Abbildung 3-2:	Testverdau zur Überprüfung des LungGlow 1 Plasmids.	60
Abbildung 3-3:	<i>In vitro</i> Funktionalitätstest des Einzelkonstrukts pGL3- <i>SP-C-mCherry</i>	61
Abbildung 3-4:	<i>In vitro</i> Funktionalitätstest des Einzelkonstrukts pGL3- <i>SP-C-SM22-GFP</i>	62
Abbildung 3-5:	<i>In vitro</i> Funktionalitätstest des Einzelkonstrukts pGL3- <i>SP-C-Col1-YFP</i>	62
Abbildung 3-6:	<i>In vitro</i> Funktionalitätstest des Konstruktteils <i>Col1-YFP</i> aus pGL3- <i>SP-C-mCherry-Col1-YFP</i>	63
Abbildung 3-7:	<i>In vitro</i> Funktionalitätstest des finalen LungGlow 1 Plasmids mit seinen Komponenten <i>SP-C-mCherry</i> , <i>SM22-GFP</i> und <i>Col1-YFP</i>	64
Abbildung 3-8:	Cryoschnitt-Färbung des Lungengewebes eines potentiell positiven Founders.	65
Abbildung 3-9:	HSV-TK Plasmid zur Deletion Kollagen I-exprimierender Zellen.....	66
Abbildung 3-10:	<i>In vitro</i> Funktionstest von GCV auf Kollagen I-exprimierende Lungenfibroblasten transgener Col1a2 ^{HSV-TK-GFP} Mäuse im Vergleich zum Wildtyp.	67
Abbildung 3-11:	Das LungGlow 2 Konstrukt im pCX-Plasmid.	69
Abbildung 3-12:	<i>In vitro</i> Funktionsüberprüfung der <i>FRT</i> - und <i>loxP</i> -Schnittstellen im LungGlow 2 Plasmid.....	71
Abbildung 3-13:	Das vollständige Tet-Operator/FLPe-Konstrukt im Vektor PSKB1.....	73
Abbildung 3-14:	Schematische Darstellung der <i>in vitro</i> Überprüfung des Gesamtkonzepts von LungGlow 2.	74
Abbildung 3-15:	<i>In vitro</i> Expression des FLPe-Proteins.....	75
Abbildung 3-16:	Ausprägung der GFP-Fluoreszenz nach der Transfektion mit drei Plasmiden (Konstrukträger von (1) <i>cmv</i> -Promoter/ <i>tTA</i> (2) <i>Tet-Operator/FLPe</i> und (3) LungGlow 2 Plasmid) bei unterschiedlichen Doxycyclinkonzentrationen.	76
Abbildung 3-17:	<i>In vitro</i> Test der Funktion und Sensitivität des LungGlow 2 Systems bezüglich unterschiedlicher Doxycyclinkonzentrationen.	77
Abbildung 11-1:	Vektorkarten des LungGlow 1 Projektes.....	102
Abbildung 11-2:	Plasmidkarten des LungGlow 2 Zweifarben-Reporters.	104
Abbildung 11-3:	Vektorkarten des TetO/FLPe Plasmids.....	105
Abbildung 11-4:	Plasmide für Transfektionsreaktionen in HEK-Zellen zur <i>in vitro</i> Kontrolle des LungGlow 2 Projektes.	106

Abbildung 11-5: Multiple Cloning Site des LungGlow 1 Projektes.	107
Abbildung 11-6: Synthetische MCSs (Linker) des LungGlow2 Plasmids.....	107
Abbildung 11-7: Die MCS des LungGlow 1 Plasmids, ergänzt durch den HPRT-Linker mit den Restriktionsschnittstellen <i>SmaI</i> und <i>XbaI</i> zur Klonierung des Tet-Operator/FLPe Konstruktes.....	107
Abbildung 11-8: MCS des PSKB1 Vektors zur homologen Rekombination in den <i>HPRT</i> -Lokus....	107

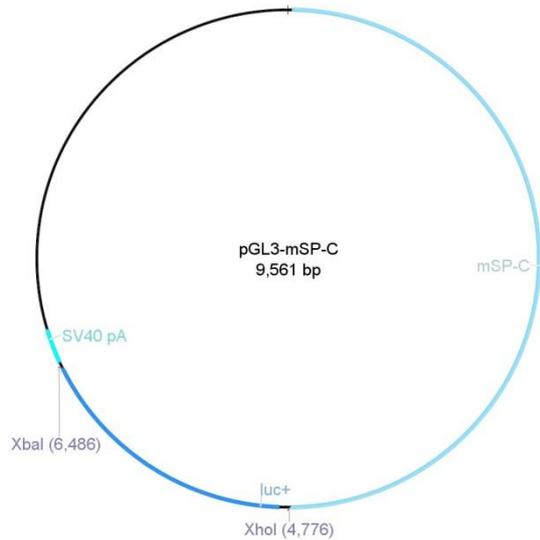
9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Verwendete Laborgeräte.....	30
Tabelle 2-2: Verwendete Chemikalien.....	32
Tabelle 2-3: Laborbedarfsartikel für Molekularbiologie, Histologie, Proteinbiochemie und Mausarbeit.	33
Tabelle 2-4: Medien und Lösungszusätze für die Zellkultur.....	35
Tabelle 2-5: Zusätze und Transfektionsreagenzien für Zellkulturexperimente.	36
Tabelle 2-6: Verwendete Zelltypen.....	36
Tabelle 2-7: Kulturmedien für die Zellkultur.....	36
Tabelle 2-8: Verwendete Antikörper und Komponenten für die Alveolare Typ II Zell- Isolierung.	37
Tabelle 2-9: Verwendete Reagenzien, Kits und Standards für Molekularbiologie.....	38
Tabelle 2-10: Enzyme für die Molekularbiologie.....	38
Tabelle 2-11: Medien, Puffer, Zusätze und Materialien für die Molekularbiologie.	39
Tabelle 2-12: Lösungen für die Minipräparation ohne Kit.....	40
Tabelle 2-13: Verwendete Antikörper und Zusatz-Komponenten für die Histologie.	40
Tabelle 2-14: Reagenzien für die Proteinisolierung und den Bradfordtest.....	41
Tabelle 2-15: Puffer und Proteinstandards für Acrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.	41
Tabelle 2-16: Antikörper für Western Blot.	42
Tabelle 2-17: Verwendete Mauslinien.	42
Tabelle 2-18: Ansatz und Amplifizierungsprotokoll für eine Standard-PCR (50 µl).....	43
Tabelle 2-19: <i>Annealing</i> -Ansatz und -Programm zur Klonierung synthetischer DNA.	47
Tabelle 2-20: Phosphorylierungsprogramm zur Klonierung synthetischer DNA.	47
Tabelle 2-21: Eingesetzte Ganciclovir-Konzentrationen für die <i>in vitro</i> Überprüfung der aus HSV-TK transgenen Mäusen isolierten Lungenfibroblasten.	55
Tabelle 2-22: Nachweis und Aktenzeichen der genehmigten Tierversuche.	58
Tabelle 11-1: Verwendete Klonierungs- und Screening-Primer für das LungGlow 1- und das LungGlow 2 Plasmid sowie die TetO/FLPe.....	108

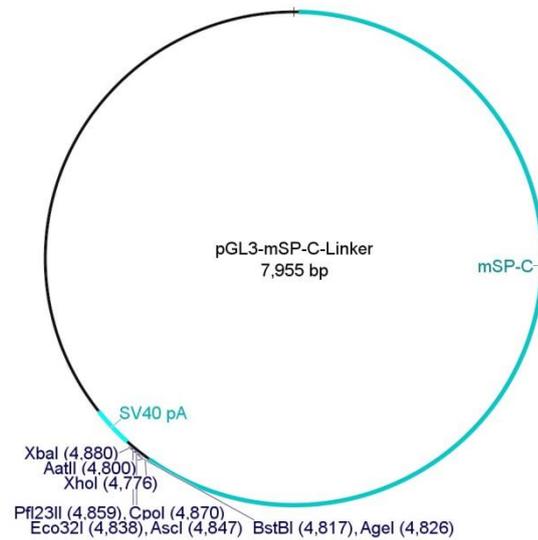
10 Anhang

10.1 Vektorkarten

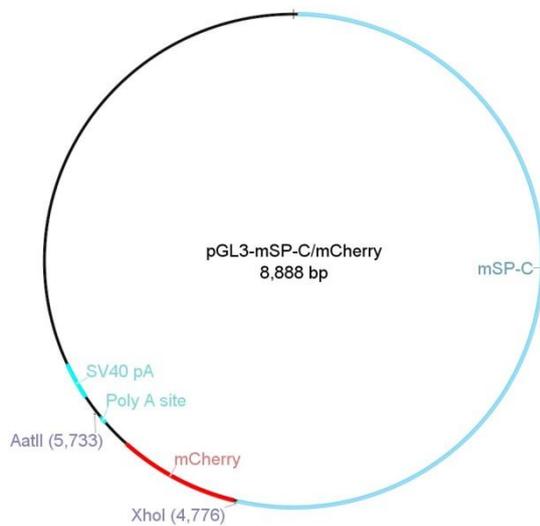
10.1.1 LungGlow 1



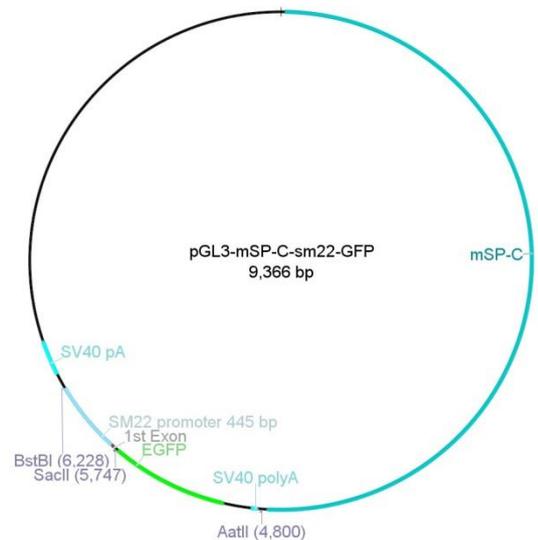
pGL3 Plasmid mit murinem *SP-C* Promoter und Reporter gen Luciferase.



pGL3 Plasmid mit murinem *SP-C* Promoter und synthetischer MCS.



pGL3 Plasmid mit murinem *SP-C* Promoter und dem *mCherry*-Reporter gen (pGL3-SPC-*mCherry*).



pGL3 Plasmid mit murinem *SP-C* Promoter, dem Promoter *sm22* und dem *GFP*-Reporter gen (pGL3-SPC-*sm22-GFP*).

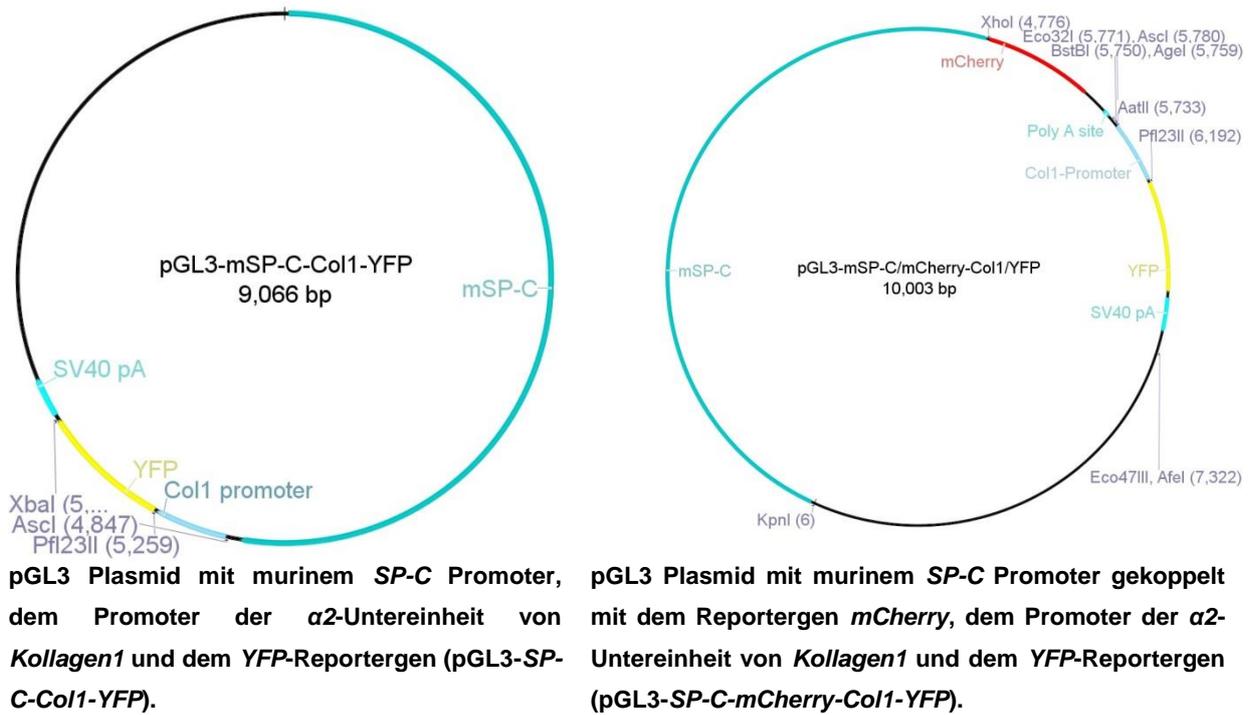
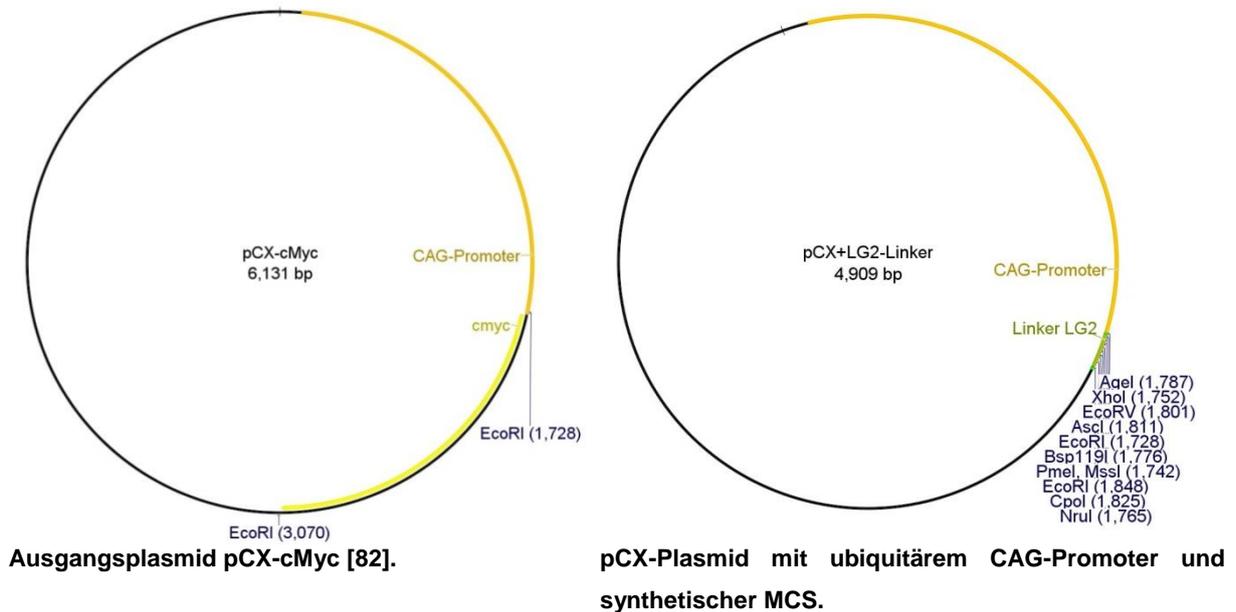
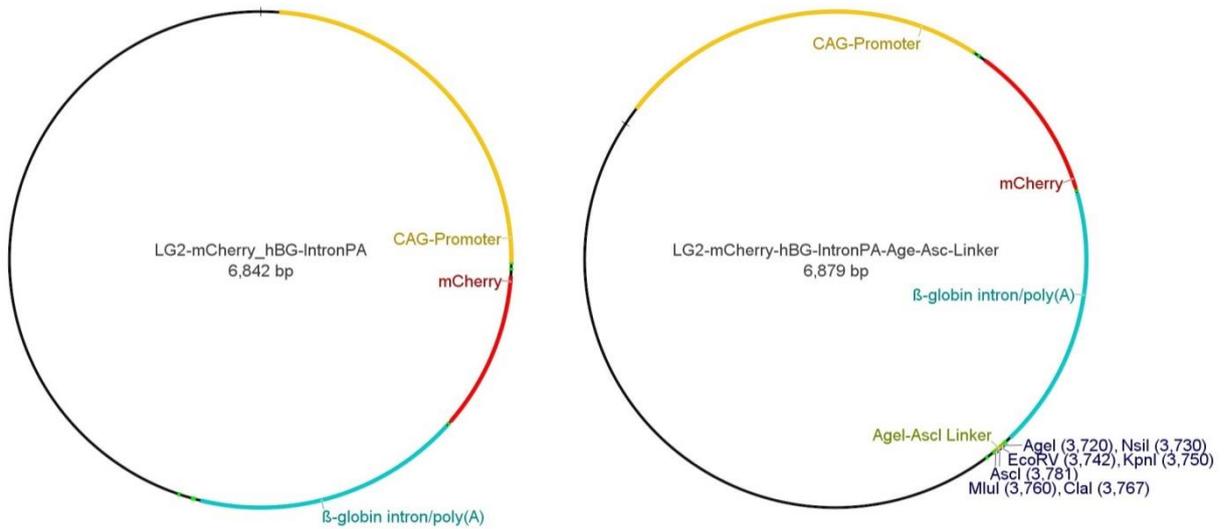


Abbildung 10-1: Vektorkarten des LungGlow 1 Projektes.

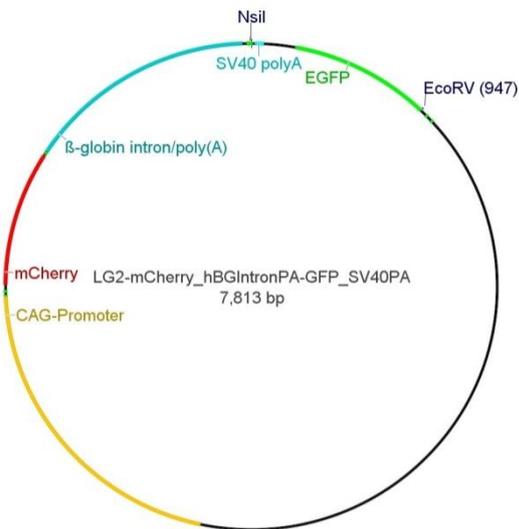
10.1.2 LungGlow 2



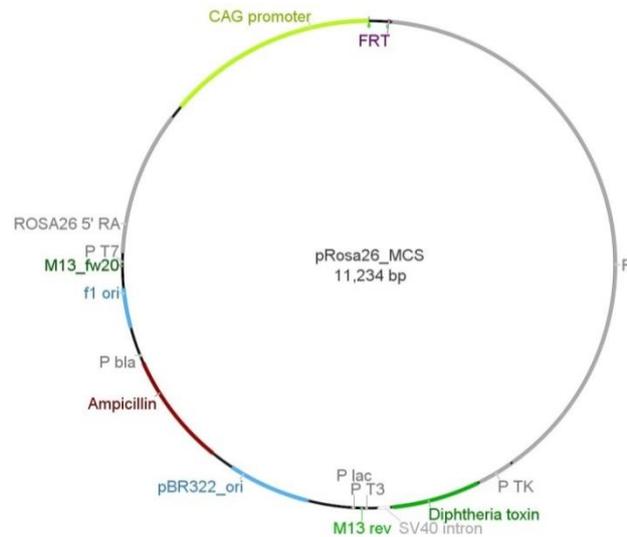


pCX-Plasmid (LG2) mit dem Reporter gen *mCherry-hGB-IntronPA*.

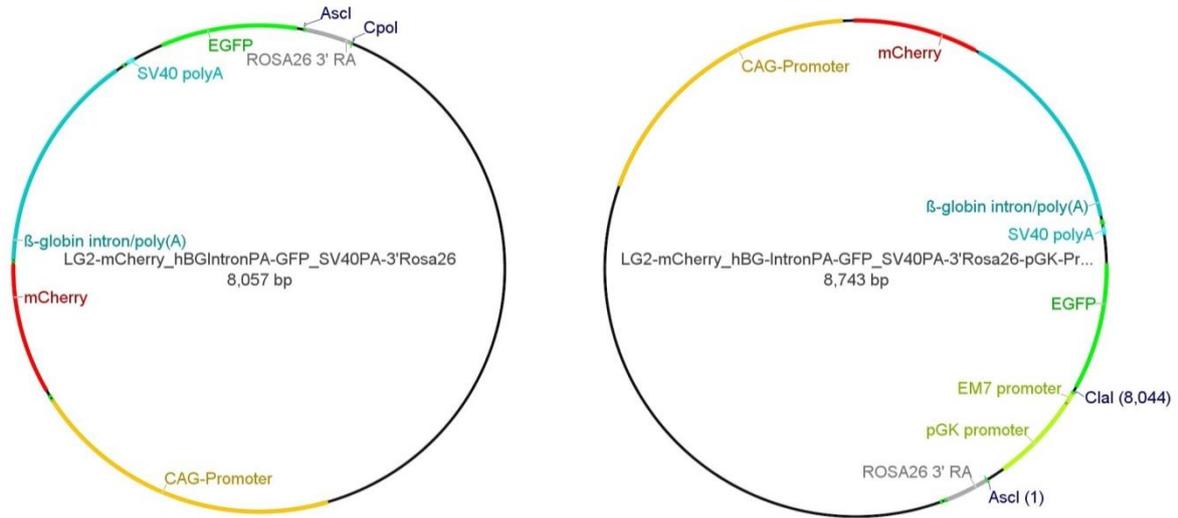
LG2-Plasmid, ergänzt durch die Restriktionsschnittstellen *NsiI*, *EcoRV*, *KpnI*, *MluI* und *ClaI*.



LG2-Plasmid ergänzt durch das Reporter gen *GFP-SV40PA*

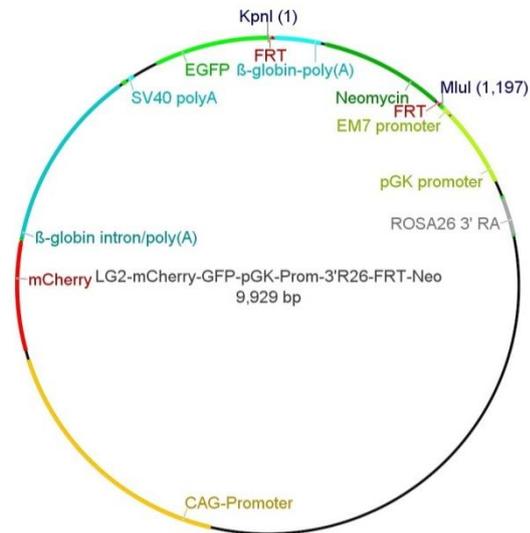


pRosa26_MCS-Vektor zur homologen Rekombination in ES-Zellen.



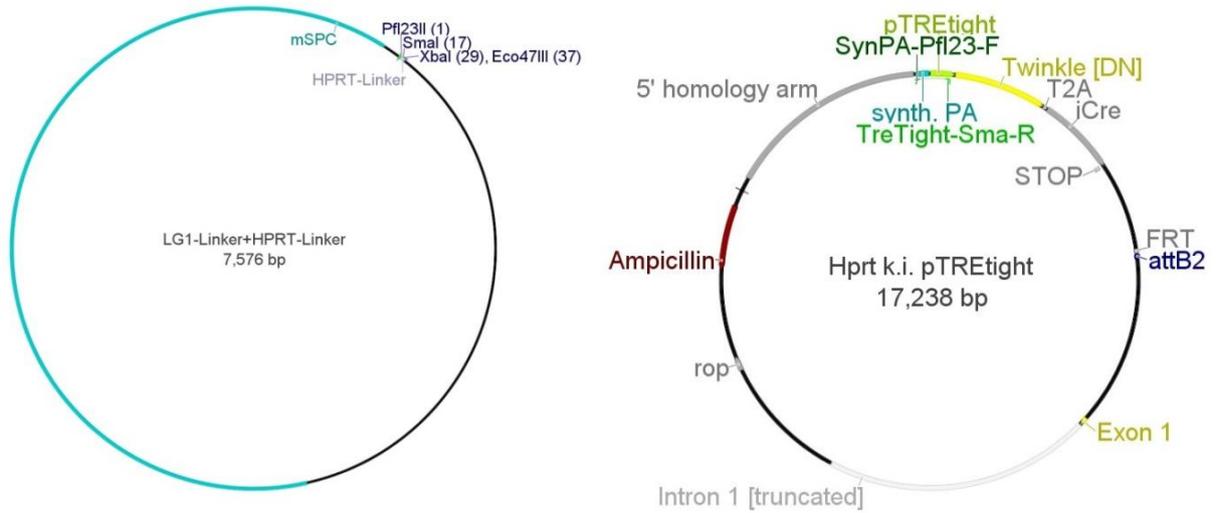
LG2-Plasmid ergänzt durch das 250 bp-DNA-Fragment des 3'-Rosa26-Arms.

LG2-Plasmid ergänzt durch den pGK-Promoter.

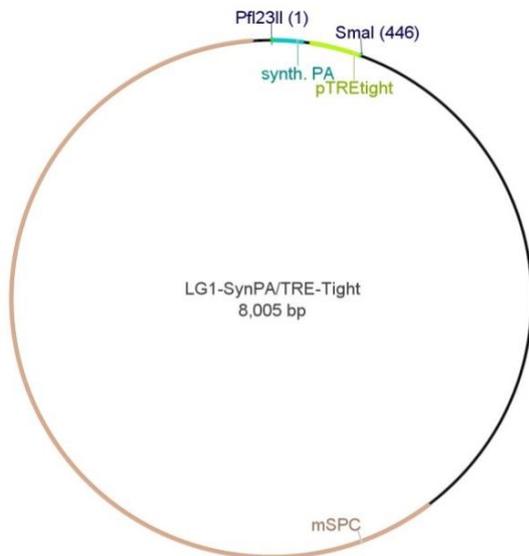


LG2-Plasmid ergänzt durch die Neomycinresistenz (Neo), flankiert von FRT sites.

Abbildung 10-2: Plasmidkarten des LungGlow 2 Zweifarben-Reporters.

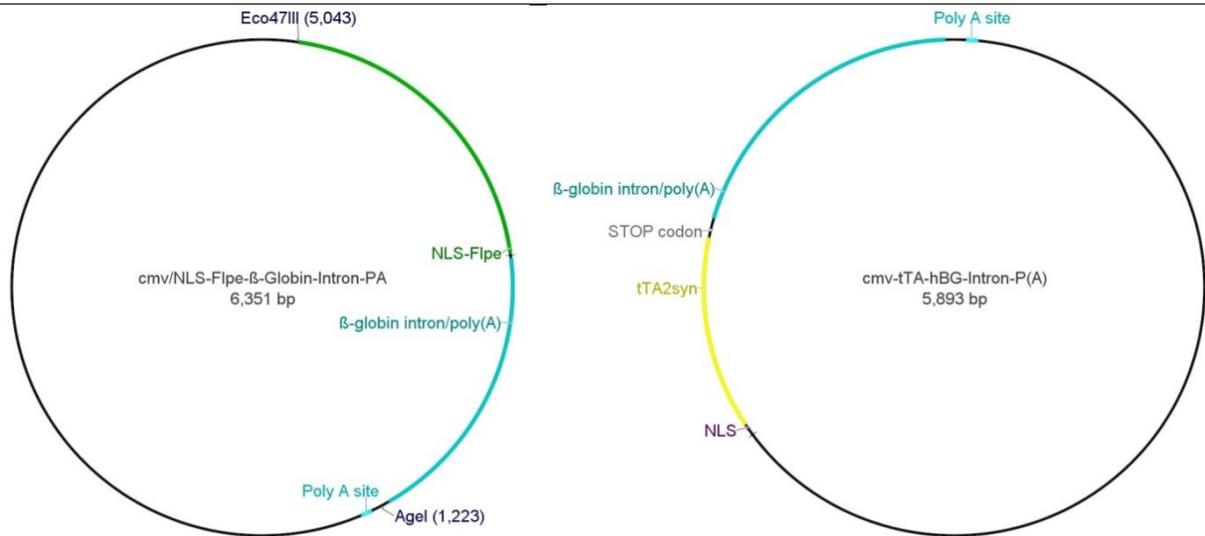


LG1-Plasmid (pGL3-mSP-C-Linker) + ergänzende Vektor zur Amplifizierung des synthetischen Poly(A) MCS mit den Restriktionsschnittstellen *SmaI* und TRE-Tight. und *XbaI*



LG1-Plasmid + synthetischem Poly(A) und dem den Tet-Operator beinhaltenden TRE-Tight.

Abbildung 10-3: Vektorkarten des TetO/FLPe Plasmids.



Plasmid für die eukaryotische Expression **Plasmid mit Transaktivator (tTA), getrieben von einem**
der Rekombinase FLPe unter dem ubiquitären cmv-Promoter.
ubiquitären cmv-Promoter.

Abbildung 10-4: Plasmide für Transfektionsreaktionen in HEK-Zellen zur *in vitro* Kontrolle des LungGlow 2 Projektes.

10.2 Design der synthetischen *multiple cloning sites* (MCS)

10.2.1 LungGlow 1



Abbildung 10-5: Multiple Cloning Site des LungGlow 1 Projektes.

10.2.2 LungGlow 2



Abbildung 10-6: Synthetische MCSs (Linker) des LungGlow2 Plasmids.

A) LG2-Linker. B) Linker zur Ergänzung der *SmaI*-Restriktionsschnittstelle. C) Linker zur Ergänzung der Restriktionsschnittstellen *NsiI*, *EcoRV*, *KpnI*, *MluI* und *ClaI*.

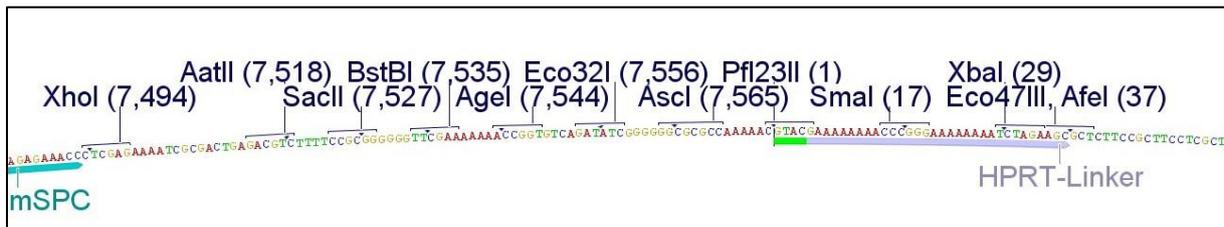


Abbildung 10-7: Die MCS des LungGlow 1 Plasmids, ergänzt durch den HPRT-Linker mit den Restriktionsschnittstellen *SmaI* und *XbaI* zur Klonierung des Tet-Operator/FLPe Konstruktes.

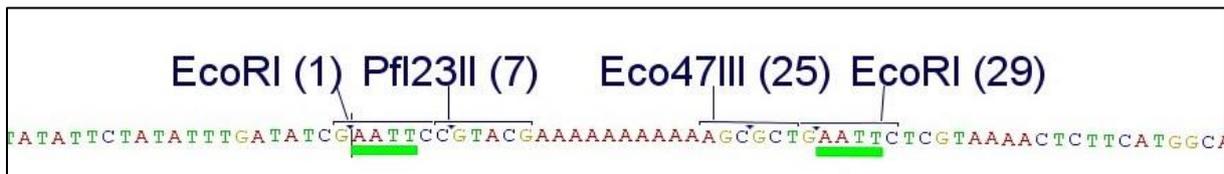


Abbildung 10-8: MCS des PSKB1 Vektors zur homologen Rekombination in den *HPRT*-Lokus.

10.3 Primer der Projekte LungGlow 1 und LungGlow 2

Tabelle 10-1: Verwendete Klonierungs- und Screening-Primer für das LungGlow 1- und das LungGlow 2 Plasmid sowie die TetO/FLPe.

Konstrukt	Name	Sequenz 5' – 3'
LungGlow 1		
MCS	Linker-1	tcgagaaaatcgcgactgagacgtctttccgcgggggggtcgaaaaaacgggtg cagatatcggggggcgcccaaaacgtacgttttcggaccgtgcat
	Linker-2	ctagatgcacggtccgaaaacgtacgtttttggcgcccccgatatctgacaccg gtttttcgaaccccccgcgaaaagacgtctcagtcgcgatttc
mCherry	mCherry-R-AatII	gatatgacgtctggacaaccacaactagaatgcagtg
	mCherry-XhoI-F	gatattctcgaggccaccatggtgagcaagggcgaggaggataa
Sm22	SM22-BstBI-F	gatattcgaactgcagtcaagactagtcccaccaactc
	Sm22-SacII-R	gatatccgcgtagcttcggtgtctgggctg
	sm22-F-AscI	gatatggcgcgccctgcagtcaagactagtcccaccaactc
GFP	GFP-SacII-F	gatattcggcgccaccatggtgagcaagggcgagga
	GFP-AatII-R	gatatgacgtccacaactagaatgcagtgaaa
	GFP-R-AgeI	gatataccgttcacaactagaatgcagtgaaa
Col1	Coll1-AscI-F	gatatggcgcgccgatctgtaaagagcccacgtaggt
	Coll1-Pfl23II-R	gatatcgtacggcaatcgtggaccgttccctccaact
YFP	YFP-Pfl23II-F	gatattcgtacggccaccatggtgagcaagggcgagga
	YFP-R-Xba-Stop	gatattctagatcactgtacagctcgtccatgccgagagtg
LungGlow 1 Screen		
	LG14	gtccttcaccctgtctctctgtctctg
	mCherry-R-214	acatgaactgaggggacagg
	mCherry-F-414	ccccgtaatgcagaagaaga
	mCherry-F-661	aacagtacgaacgcgcccaggggcccacc
	eGFP_4	aacatcgaggacggcagcgt
	eGFP_5	gactgaagaagtcgtgtctctc
	GFP-97F	acgtaaacggccacaagttc
	GFP-814R	aaacctcccacacctccc
	sm22-133-R	ctcaatgagaaagaaagggggagggcat
	sm22-362-F	ccatgggcagggagggggcgccag
	Col1-277-F	ggtggagacgttttgaggcac
	Col1-129-R	tttcgaggggaactctgactcc
	R-linker screen	ccccctgaacctgaaacataaaaatg
LungGlow 2		
MCS	LG2-Linker-F	aattcggggggttaaacgggggctcgagaaaaatcgcgaggggggttcgaaaa aaaaccgggtttttgatatcggggggcgccaatttcggaccgggggggctag cttttg
	LG2-Linker-R	aattcaaaaagctagcccccccggtccgaaaattggcgcccccccgatatcaa aaaaccgggttttttcgaacccccctcgatttttctcgagccccgttaaacccc cgg
SmaI-schnittstelle	Sma-Linker-F	tcgagcccgggaaaaaaa
	Sma-Linker-R	ccggtttttttcccgggc
mCherry	SmaXho-Cher-Koz	gagaccgggctcgaggccaccatggtgagcaagggcgaggaggata
	mCherry-R-AgeI	gatataccggttgacaaccacaactagaatgcagtg
Age-Asc-Linker	Age-Ace-Linker-F	ccggtatgcataaaaaaagatatcggtaacaaaaaaacgcgtatcgataaaa aaaagg
	Age-Ace-Linker-R	cgcgcttttttatcgatcgcgtttttttgtaccgatattttttatgcata
GFP	GFP-EcoRV-F	gcgcatatgccaccatggtgagcaagggcgagga
	GFP-Nsi-R	gcgcatgatcacaactagaatgcagtgaaa
3'Rosa26	3'R26iRA-F-Asc	gcgcgcgcgccagatggcgggagcttctgg
	3'R26iRA-R-Cpo	gcgccggtccgctacctcgatggaaaatactc

FRT-Neomycinresistenz	FRT-Neo-F-MluI	acgcgtgaagttcctatttctctagaaagtataggaacttcgccaccatgggatcggccattgaaca
	FRT-Neo-R-KpnI	ggtaccgaagttcctatactttctagagaataggaacttcgaagggttccgcaagctctagtcg
TetO-FLPe		
PSKB1-Linker	pSKB1-Linker-F	aattccgtacgaaaaaaaaaagcgctg
	pSKB1-Linker-R	aattcagcgcttttttttcgtacgg
pGK3-Linker	LG1-HPRT-F	gtacgaaaaaaaaaccgggaaaaaaaaatctagaaaaaaaaaagc
	LG1-HPRT-R	gcttttttttctagatttttttccgggttttttc
TRE-Tight	SV-TreTight-Pfl-F	gagacgtacgcagacatgataagatacatt
	SV-TreTight-Sma-R	gagaccgggtccaggcgatctgacggttca
NLS-FLPe	FLPe-Eco47III-F	gagaagcgctgccaccatgagccaatttgatatattatg
	FLPe-BamHI-RStop	gagaggatccgaagagtatgcgtctattatgtagga

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Quellen entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ort, Datum

Unterschrift