

Herstellung und Charakterisierung einer *Dmd*^{EGFP} Reportermaus als Werkzeug zur Untersuchung der Dystrophinexpression

Mina Petkova

Dystrophin ist ein zytoplasmatisches Protein, welches wesentlich für den Aufbau des Dystrophin-assoziierten Proteinkomplexes (DAPC) ist. Der Komplex vernetzt das Zytoskeletton mit der extrazellulären Matrix, wodurch das Dystrophin entscheidend zur Stabilisierung des Sarkolemmas und zur Erhaltung der Muskelfaserintegrität während der Muskelkontraktion beiträgt. Mutationen im Dystrophin kodierenden *DMD* Gen, verursachen die schwere X-chromosomal vererbte Muskeldystrophie Duchenne (DMD). DMD ist gekennzeichnet durch eine fortschreitende Muskeldegeneration und Fibrose, welche die Skelettmuskel- und Herzmuskelfunktion beeinträchtigt. Darüber hinaus sind zu einem gewissen Grad auch kognitive, visuelle und gastrointestinale Funktionen gestört. Ursache für die Krankheit ist das Fehlen des Dystrophin-Proteins in dem jeweiligen Gewebe. In der vorliegenden Arbeit habe ich ein neues Mausmodell, die *Dmd*^{EGFP} Reportermaus, generiert und charakterisiert. Das Modell ist gekennzeichnet durch die Expression eines Fluoreszenz-markierten Dystrophin-EGFP Fusionsproteins. Bislang existiert keine Reportermaus für Dystrophin, so dass die Visualisierung der Dystrophin-Expression bisher nur mittels indirekter Antikörperfärbung *ex vivo* möglich war. Für die Herstellung der transgenen Maus habe ich einen Targeting-Vektor entwickelt, welcher die FLAG-EGFP Gensequenz downstream des letzten Exons (Exon 79) des *Dmd* Gens der Maus einfügt. Weiter 3' downstream habe ich noch eine loxP flankierte Neomycin Selektionskassette eingebracht, welche später nach homologer Rekombination und Blastozysteninjektion durch Verpaarung der F1-Generation mit einer ubiquitär exprimierenden Cre-Maus wieder entfernt werden konnte. Zum Nachweis der Dystrophin Expression und zum Ausschluss einer möglichen Induktion einer Dystrophinopathie durch das EGFP-markierte Fusionsprotein habe ich die *Dmd*^{EGFP} Mäuse und ihre wildtyp Wurfgeschwister histologisch charakterisiert. Dabei konnte ich eine starke natürliche EGFP Fluoreszenz sowohl in den Skelett-, Herz-, und glatten Muskeln, als auch im Gehirn und Auge beobachten. Das EGFP-Signal kolokalisierte mit dem immunhistologisch nachgewiesenen Expressionsmuster des Dystrophins, was die korrekte Markierung der Mehrheit der Dystrophin Isoformen bestätigt. Im Skelettmuskel wurden

Dystrophin sowie andere Proteine des DAPCs in normaler Menge am Sarkolemma exprimiert. Der Muskel bewahrte seine normale Gewebestruktur, was die korrekte Funktion des Dystrophin-EGFP Fusionsproteins impliziert. Sowohl isolierte Muskelfasern als auch aus Satellitenzellen generierte Myotuben exprimierten das EGFP-Fusionsprotein *in vitro*. Somit ist die neue Reportermaus ein nützliches und wertvolles Model für die direkte Visualisierung der Dystrophin Expression. Darüber hinaus kann man das Model benutzen, um *in* oder *ex vivo* die Dystrophin-Reexpression nach Gentherapie oder in natürlich vorkommenden „*revertant fibers*“ zu studieren.