

ZUSAMMENFASSUNG

Durch das Fehlen Keimzell-kompetenter embryonaler Stammzellen in der Ratte ist die Geninaktivierung durch homologe Rekombination nicht möglich. Das Hauptziel dieser Arbeit war es, dieses Problem durch die Etablierung einer neuen Technologie zum Herunterregulieren von Genen durch Nutzung von shRNA zu lösen, einem natürlichen Phänomen und einem Werkzeug zum Ausschalten von Genen in Säugerzellen und in Mäusen. Es wurden drei DNA-Konstrukte generiert, die Hairpin-Kassetten gegen das EGFP-Gen beinhalten und unter der Kontrolle des U6-Promotors standen. Nach einer standardmäßigen pronukleären Mikroinjektion in Zygoten von EGFP-transgenen Ratten wurden mehr als dreihundert Ratten geboren. Überraschenderweise hatte nur ein Tier das Konstrukt in das Genom integriert. In diesem transgenen Founder wurde weder GFP-Silencing beobachtet noch war shRNA-Expression nachweisbar. Sogar die Nutzung eines BAC-Konstrukts basierend auf dem Rosa26-Lokus der Maus, um eine einzelne transgene Integration zu erreichen, resultierte nicht in der erfolgreichen Generierung von shRNA-transgenen Ratten.

Aufgrund einer vermuteten Embryo-Toxizität durch die starke Produktion von shRNA-Molekülen sein könnte, wurde eine *in vitro* Studie durchgeführt. Die Untersuchungen der embryonalen Entwicklung und die Überlebensrate von Ratten- und Mäuseembryos nach der Injektion eines Hairpin-Konstrukts bewiesen, dass die Expression der shRNA die embryonale Entwicklung im frühen Präimplantations-Stadium nicht stört. Folglich sollte das Problem später in der Schwangerschaft auftreten.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, funktioniert die pronukleäre Mikroinjektion ubiquitär und dauerhaft aktiver shRNA-Konstrukte in der Ratte nicht. Deshalb wurde eine neue Strategie getestet, um eine konditionelle Gen-Ausschaltung zu erreichen. Für dieses Vorhaben wurde ein durch Tetracyclin aktivierbares System benutzt, welches die Expression von shRNA gegen das Gen für den Insulin Receptor (InsR) kontrolliert, woraus ein induzierbares Modell der Insulinresistenz resultierte. Somit war ein induzierbares und chronisches Modell für Typ II Diabetes etabliert, das verschiedene Merkmale dieser Krankheit aufwies.

Zusätzlich wurde mit Hilfe eines Liganden-abhängigen chimären Transkriptionsfaktors ein neues induzierbares Expressionssystem für shRNA entwickelt. In Zellkulturversuchen wurde gezeigt, dass ein mutiertes TATA-bindendes Protein (mTBP) einen U6 Promotor mit einer entsprechenden TATA-Box-Mutation aktiviert. Die Fusion einer mutierten Liganden-Bindungsdomäne eines Estrogenrezeptors mit dem mTBP führt zu einem chimären Protein. Die Translokation des Fusionsproteins in den Nukleus sollte von der Anwesenheit von Tamoxifen abhängig sein. Jedoch konnte diese Liganden- Induzierbarkeit des mTBP in dieser Arbeit nicht gezeigt werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Zeit und/oder Dosis abhängige Gen-Inhibierung in Ratten durch die Nutzung des Doxycyclin induzierbaren shRNA Systems möglich ist. Diese flexible Genmanipulationsstrategie in dem bevorzugten Tiermodell für physiopathologische Studien kann ein starkes Werkzeug für das Verständnis von Genfunktionen werden.