

1 EINLEITUNG

1.1 Die Superfamilie der Aldo-Keto-Reduktasen

Im Jahre 1956 beschrieb der belgische Physiologe und Biochemiker Henri-Géry Hers in seinem Artikel über „The mechanism of transformation of glucose to fructose by the seminal vesicles“ die Entdeckung des Enzyms Aldose-Reduktase (Hers 1956). Im Verlauf der folgenden 4 Dekaden wurde eine Vielzahl weiterer Enzyme publiziert, deren Aminosäuresequenz, Substratspezifität und genomische Organisation große Ähnlichkeiten mit der von Hers entdeckten Aldose-Reduktase aufwiesen. Heute wird die Gesamtheit dieser Enzyme zur großen Superfamilie der Aldo-Keto-Reduktasen (AKR) zusammengefaßt. Momentan gehören ihr 119 Mitglieder an, die in 12 Familien unterteilt werden (Jez *et al.* 2001; Hyndman *et al.* 2003). Neben hochentwickelten Vertebraten exprimieren gleichermaßen Pflanzen, Protozoen, Pilze, Eubakterien und überdies auch Archebakterien Vertreter dieser Enzymfamilie (Jez *et al.* 1997). Ein solch ubiquitäres Verbreitungsmuster läßt vermuten, daß es sich bei den Aldo-Keto-Reduktasen um eine evolutionsgeschichtlich früh entstandene Genfamilie handelt (Seery *et al.* 1998). Abbildung 8.1 im Anhang bietet einen Überblick über den Stammbaum der AKR.

Die Bezeichnung Aldo-Keto-Reduktase leitet sich nach enzymologischen Regeln von der Substratspezifität und der biochemischen Reaktion ab. So katalysieren diese Enzyme die Umsetzung von aromatischen und aliphatischen Aldehyden und Ketonen in die jeweils korrespondierenden Alkohole. Zu den bevorzugten Substraten der Superfamilie gehören Kohlenwasserstoff-Verbindungen ebenso wie Steroidhormone, Prostaglandine und Xenobiotika (Bohren *et al.* 1989). Die AKR agieren sämtlich als monomere Proteine und benötigen zur katalytischen Reaktion NADH oder NADPH als Kofaktor (Wermuth 1985).

Die Eigenschaften und Funktionen der Aldose-Reduktase, des am längsten bekannten Vertreters der Aldo-Keto-Reduktasen, wurden bisher besonders intensiv untersucht. Das Protein ist das erste Enzym des Polyol-Reaktionswegs und reduziert neben anderen Zuckerverbindungen vor allem Glucose zu Sorbitol. Ein Enzym einer anderen Superfamilie katalysiert im Weiteren die Umwandlung von Sorbitol zu Fructose. Unter physiologischen Verhältnissen beschreitet die Zelle diesen relativ unbekanntem Reaktionsweg kaum. Erst wenn im Organismus hyperglykämische Bedingungen vorliegen, wird der Metabolismus von Glucose zu Sorbitol aktiviert

und die intrazelluläre Konzentration dieser inerten Verbindung steigt deutlich an (Gabbay 1973). Die Undurchlässigkeit der Zellmembran für Sorbitol begründet die Fähigkeit der Verbindung, als Osmolyt die Zelle vor extrazellulärem, osmotischem Druck zu schützen (Bagnasco *et al.* 1987). Halten diese Bedingungen jedoch über einen längeren Zeitraum an, akkumuliert Sorbitol intrazellulär und führt durch einen hyperosmotischen Effekt zum Anschwellen der Zelle (Lee *et al.* 1995). Sorbitol wird daher mit einer Reihe von Komplikationen beim Diabetes mellitus, wie Nephropathie, Neuropathie und Katarakt in Verbindung gebracht. (Oates *et al.*, 1999; Kinoshita *et al.* 1988). An transgenen Mäusen, die das Aldose-Reduktase Gen überexprimieren, konnte gezeigt werden, dass die pathologischen Veränderungen, z.B. Katarakte, retino-choroidale Gefäßverschlüsse und pathologische Veränderungen der Nieren (Yamaoka *et al.* 1995) durch Gabe eines Inhibitors der Aldose-Reduktase unterdrückt werden können (Lee *et al.* 1995, Yagihashi *et al.* 2001). Überdies hatte die Behandlung der Tiere mit Aldose-Reduktase-Inhibitoren eine Senkung des Glutathionspiegels (Antioxidant) zur Folge (Gonzalez *et al.* 1983; Chung *et al.* 2003). Diskutiert werden daher im Zusammenhang mit diabetischen Komplikationen nicht nur hyperosmotische Effekte des Sorbitols, sondern auch Aldose-Reduktase-vermittelter oxidativer Streß. Anderen Aldo-Keto-Reduktasen werden hingegen selbst detoxifizierende Wirkungen zugeschrieben, die oxidativen Streß vermeiden helfen oder abbauen könnten.

1.2 Das Maus Vas Deferens Protein

30 Jahre waren seit der Entdeckung der ersten Aldo-Keto-Reduktase vergangen als 1986 Catherine Taragnat *et al.* durch Polyacrylamid-Elektrophorese auf ein bedeutendes Glycoprotein im *Vas deferens* stießen. Auf Grund seines außergewöhnlich hohen Anteils von 42 % am Gehalt löslicher Proteine im Samenleiter der Maus (Taragnat *et al.* 1988), erhielt dieses neu entdeckte Eiweiß den Namen „Maus Vas Deferens Protein“- MVDP (Taragnat *et al.* 1990).

Histologisch unterscheidet man im Samenleiter ein zentrales Lumen, das mit pseudostratifiziertem Epithel ausgekleidet ist, und eine kräftige Lage glatter Muskulatur, die die inneren Schichten aus *Lamina propia* und Epithel umschließt (Hamilton 1975). Immunhistochemische Analysen zeigten *Mvdp*-Expression im *Vas deferens* nur in den zum Lumen gerichteten Epithelzellen. Die Plasmamembran von aus dem *Vas deferens* gewonnenen Spermatozoen erscheint in der Immunfluoreszenz fast gänzlich von MVDP bedeckt. Spermien aus dem *Testis* und aus der *Epididymis* weisen einen solchen „Überzug“ aus MVDP hingegen nicht auf (Taragnat *et al.* 1990). Das Epithel des *Vas deferens* sezerniert das Protein in großem Maße in das Lumen, wo es eine noch unbekannte Funktion an der Spermienoberfläche erfüllt (Taragnat *et al.* 1990).

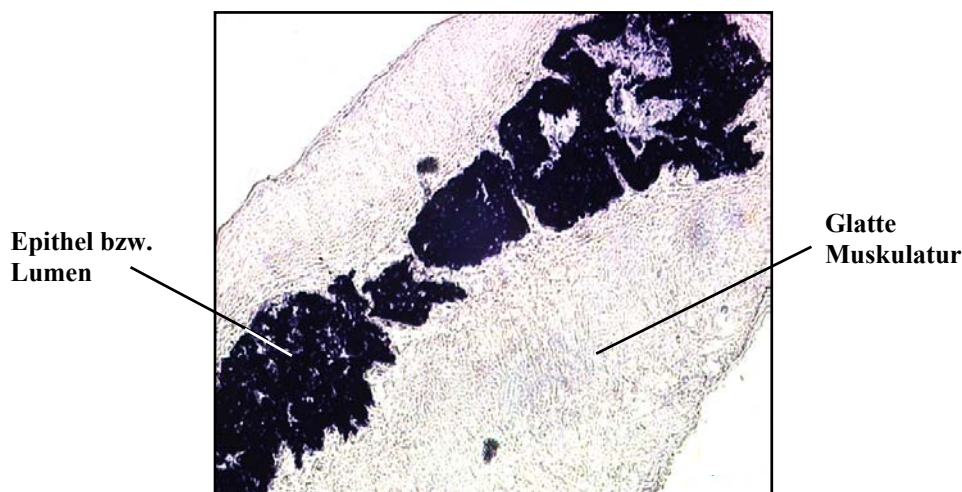


Abb. 1.1: MVDP-Expression im Vas deferens

In situ-Hybridisierung mit einer spezifischen *Mvdp*-Sonde zum Nachweis der starken Expression des *Mvdp*-Gens im *Vas deferens*. Dargestellt ist ein Längsschnitt durch das Organ mit deutlicher Färbung des auskleidenden Epithels bzw. des Lumens. (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Peters-Kottig, Schering AG Berlin)

1.2.1 MVDP-Expression in der Nebenniere

Neben der überaus starken Repräsentanz des MVDP-Proteins im *Vas deferens* der Maus konnte mit Hilfe von „RNase Protection Assays“ als bedeutender Expressionsort auch die Nebenniere gefunden werden (Lau *et al.* 1995). *In situ*-Hybridisierungsexperimente zeigten eine spatiale Einschränkung der Expression auf die *Zona fasciculata* des Nebennierencortex (Brockstedt *et al.* 2000).

Die Hauptfunktion des Cortex liegt in der Biosynthese von Steroidhormonen. Die *Zona fasciculata* ist dabei speziell für die Produktion der Glukocorticoide verantwortlich. Des Weiteren konnte MVDP mit weitaus niedrigerer Expressionsstärke auch im Auge, in den Epithelzellen des Darms, in der Samenblase, in der Niere, im Hoden und in der Lunge nachgewiesen werden (Lau *et al.* 1995; Brockstedt *et al.* 2000). Als frühester Zeitpunkt der MVDP-Expression während der Embryonalentwicklung wurde Tag E13,5 in der Nebenniere bestimmt. (Lau *et al.* 1995).

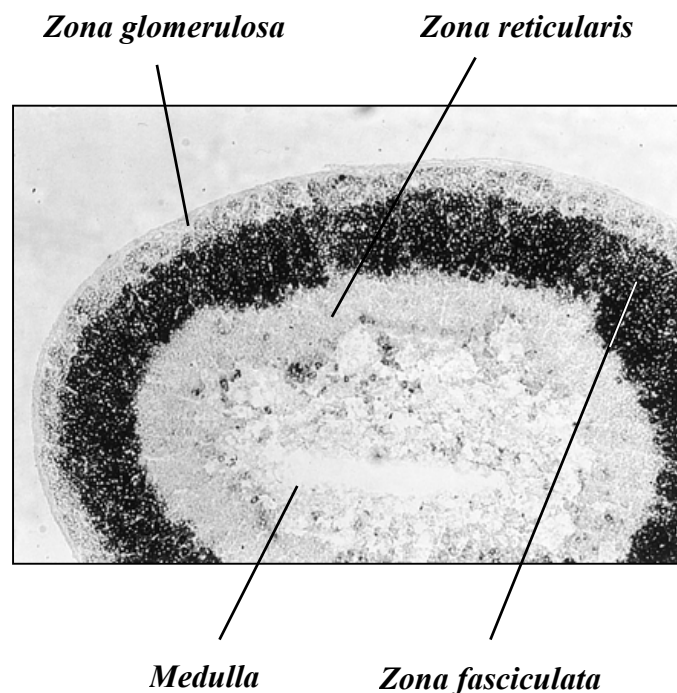


Abb. 1.2: MVDP-Expression in der Nebenniere

In situ-Hybridisierung. Die *Mvdp*-Expression in der adulten Nebenniere ist auf die *Zona fasciculata* beschränkt (dunkle Färbung). (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Peters-Kottig, Schering AG Berlin)

1.2.2 MVDP-Expression im Ovar

Mit Hilfe einer Proteom-Analyse konnten Brockstedt *et al.* im Jahre 2000 mehrere am Ovulationsprozeß potentiell beteiligte Proteine identifizieren. Zwei-Dimensionale Gelelektrophoresen der ovariellen Proteine zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einer Ovulation-auslösenden LH-Gabe, wiesen mehrere differentiell exprimierte Proteine aus. Die nachfolgende massenspektrometrische Analyse eines der prominentest regulierten Proteine identifizierte das bereits aus dem *Vas deferens* und der Nebenniere bekannte MVDP. In weiterführenden Untersuchungen des Expressionsverlaufs während des Östruszyklus zeigte sich das temporär scharf umgrenzte Auftreten dieses Proteins im *Ovar*, was diesen Expressionsort in vorangegangenen Studien vermutlich maskierte. Schwache Signale waren bereits 1,5 Stunden nach der LH-Gabe erkennbar, was auf eine frühe transkriptionelle Antwort hinweist. Die Expression stieg innerhalb von 6 Stunden auf ein Maximum an und war nach 36 Stunden nicht mehr detektierbar. Der Zeitraum der MVDP-Präsenz im *Ovar* scheint daher zur Ovulationsauslösung, die nach rund 14 Stunden stattfindet, parallelisiert. Im Vergleich zur offenbar persistierenden *Mvdp*-Expression in der Nebenniere und im *Vas deferens* ist das Protein im *Ovar* auffallend reguliert. Aus diesem Grund wurde eine bedeutsame Funktion des Proteins während der komplexen Ovulationsvorgänge im *Ovar* postuliert (Brockstedt *et al.* 2000).

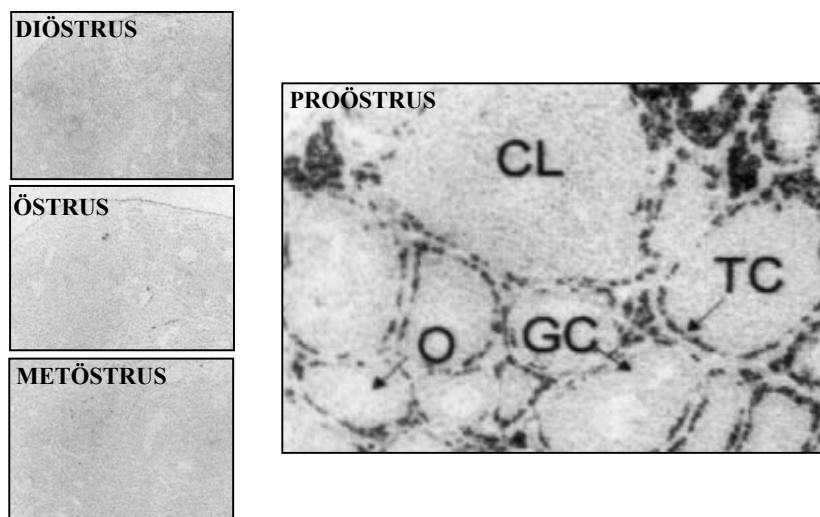


Abb. 1.3: *Mvdp*-Expression im *Ovar*

In situ-Hybridisierung. Die *Mvdp*-Expression ist im *Ovar* auf Grund der LH-Induktion auf die Proöstrus-Phase beschränkt (rechts). Signale sind nur in den die Follikel umgebenden *Theca*-Zellen (TC) erkennbar (dunkle Körnung). Oozyten (O), *Granulosa*-Zellen (GC) und *Corpora lutea* (CL) weisen keine Färbung auf. (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Peters-Kottig, Schering AG Berlin)

Im *Ovar* existieren zur Ausübung der verschiedenen Funktionen unterschiedlichste Zelltypen. Im Follikel wird die Eizelle von Östradiol-synthetisierenden *Granulosa*-Zellen und der Basalmembran umgeben. Außerhalb dieser liegen wenige Lagen aus *Theca interna*- bzw. *Theca externa*-Zellen. Dem 1941 von Fevold begründetem „Zwei-Zellen-Zwei-Gonadotropine“-Modell zufolge produzieren *Theca*-Zellen als Antwort auf einen LH-Stimulus Androgene und Testosteron, die in *Granulosa*-Zellen mit Hilfe des Aromatase-Enzyms in Östradiol umgewandelt werden. *In situ* Hybridisierungen demonstrierten die Lokalisation von MVDP in *Theca interna*- und sekundären interstitiellen Drüsenzellen, den Orten der Androgensynthese (Brockstedt *et al.* 2000)

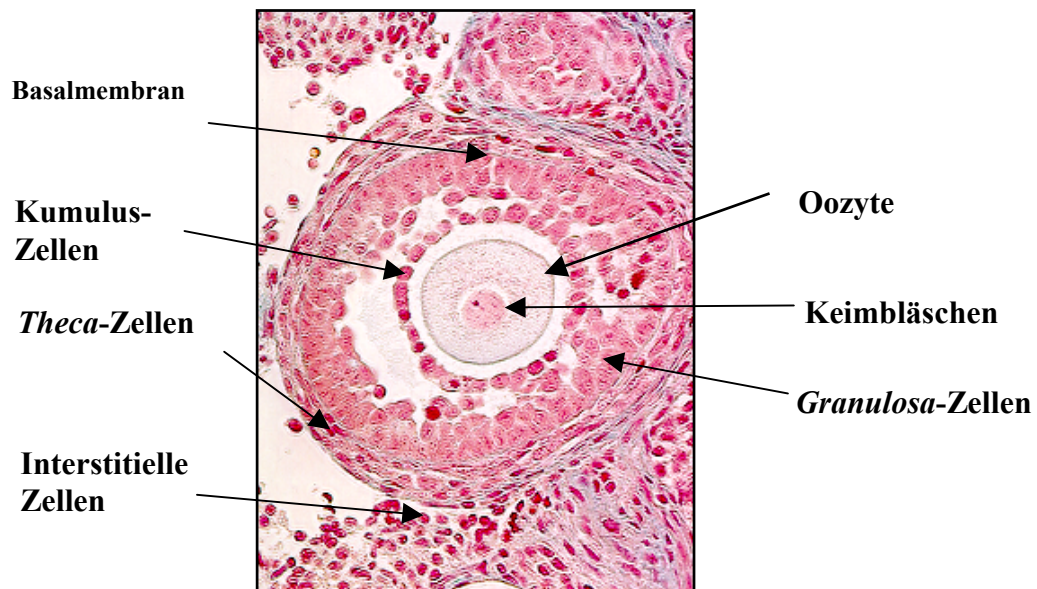


Abb. 1.4: Aufbau eines Follikles

Die Oozyte im inneren des Follikels wird von Kumuluszellen umgeben. Unter der Basalmembran liegen zudem *Granulosa*-Zellen. Außerhalb der Basalmembran finden sich wenige Lagen *Theca*-Zellen. Den Raum zwischen den einzelnen Follikeln füllen interstitielle Zellen aus.

1.2.3 Die Regulation des *Mvdp*-Gens in *Vas deferens*, Nebenniere und Ovar

Im *Vas deferens* kastrierter Maus-Männchen ist das MVDP-Protein nicht nachweisbar. Die Expression des Proteins kann durch Androgengaben jedoch wiederhergestellt werden (Martinez *et al.* 1989). Diese Beobachtung war Ausgangspunkt für Untersuchungen der Regulationsmechanismen der Expression. Im Promotorbereich des Gens wurde ein funktionelles „Androgen Response Element“ (ARE) identifiziert, welches im *Vas deferens* die Expression als Antwort auf den Signalgeber Testosteron sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene induziert (Martinez *et al.* 1990). Im *Vas deferens* ist das MVDP-Protein erstmalig am Tag 10 *post partum* detektierbar und erreicht eine maximale Induktion im Alter von 40 Tagen, die sodann konstant bleibt (Martinez *et al.* 1993).

Die Funktionen des Nebennieren-Cortex unterliegen der Wirkung der zirkulierenden Hormone Angiotensin II und ACTH. Angiotensin II beeinflusst die außen liegende *Zona glomerulosa*, wohingegen das von der Hypophyse sezernierte ACTH die Genexpression in den beiden inneren Schichten, der *Mvdp*-exprimierenden *Zona fasciculata* und der *Zona reticularis*, reguliert (Simpson *et al.* 1988; Quinn *et al.* 1988). ACTH wirkt über den intrazellulären second Messenger cAMP sowohl kurz- als auch langfristig auf die adrenale Genexpression (Simpson *et al.* 1988; Aigueperse *et al.* 1999). Akute Wirkungen, die innerhalb weniger Sekunden bis Minuten erzielt werden, beinhalten die Entleerung der Steroidhormon-Depots dieser Zellschichten und die Bereitstellung von Cholesterol zur verstärkten Biosynthese von Steroiden, beispielsweise durch die Induktion von Transportproteinen, wie StAR (Steroidogenic acute regulatory protein), die Cholesterol in die innere Mitochondrienmembran befördern (Stocco *et al.* 1996). Die längerfristigen Effekte von ACTH, die erst nach mehreren Stunden erreicht werden, schließen vor allem verstärkte Transkriptionsraten von verschiedenen cAMP-induzierten Genen ein, die Schlüsselenzyme des Steroidmetabolismus kodieren oder diese regulieren (Simpson *et al.* 1988). Wichtige Vertreter dieses Signaltransduktionsweges sind z.B. der nukleäre „orphan“-Rezeptor SF-1 (steroidogenic factor 1), dessen Wirkung auf die Transkriptionsstärke verschiedener steroidogener Enzyme, wie z.B. der Steroid-Hydroxylasen, nachgewiesen ist (Morohashi *et al.* 1993; Chau *et al.* 1997) oder das bereits erwähnte StAR-Protein (Sugawara *et al.* 1997). SF-1 ist darüberhinaus an der Regulation von Genen betei-

ligt, die, wie beispielsweise die β -Untereinheit des LH-Rezeptors (Keri *et al.* 1996), der ACTH-Rezeptor (Cammass *et al.* 1997) und der GnRH-Rezeptor (Duval *et al.* 1997), in die Organisation der Steroidogenese involviert sind. Als Gegenspieler des induktiv wirkenden SF-1 kommt ein als DAX-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the x-chromosome gene 1-Protein) bezeichnetes Protein in Frage, das *in vivo* und *in vitro* durch SF-1 positiv reguliert wird (Vilain *et al.* 1997; Kawabe *et al.* 1999) und das die SF-1-vermittelte Transaktivierung inhibiert (Ito *et al.* 1997). DAX-1 wurde auch in direkte Verbindung mit der Regulation steroidogener Enzyme gebracht, und soll z.B. die Expression von StAR, P450_{sc} und 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase reprimieren (Lalli *et al.* 1998). Die simultane Regulation durch induzierendes SF-1 und antagonistische Regelkreise (DAX-1) scheint für die normale Entwicklung und die Funktionalität der steroidogenen Organe notwendig zu sein (Parker *et al.* 2002; Achermann *et al.* 2002).

Die *Mvdp*-Expression in *Theca*-Zellen und interstitiellen Zellen des *Ovars* unterliegt der Regulation durch das Luteinisierende Hormon (Brockstedt *et al.* 2000). Für beide Zelltypen konnte zudem gezeigt werden, daß sie den LH-Rezeptor exprimieren (Peng *et al.* 1991), dessen vorherrschende Signalübertragung durch einen Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels vermittelt wird. Im Promotor des *Mvdp*-Gens finden sich zwei Sequenzmotive mit hoher Homologie zum cAMP Response Element (Aigueperse *et al.* 1999). Auf Grund der bereits 1,5 Stunden nach der LH-Gabe detektierbaren *Mvdp*-Expression im *Ovar* könnte die Regulation in diesem Organ direkt durch cAMP vermittelt werden (Brockstedt *et al.* 2000).

1.3 Genomische Organisation, chromosomale Lokalisation und Homologien innerhalb der Genfamilie

Die genomische Struktur des *Mvdp*-Gens wurde 1992 von Eric Pailhoux *et al.* aufgeklärt. Das circa 11 kb lange Gen enthält einen offenen Leserahmen von 948 Nukleotiden und besteht aus 10 Exons, deren Größen sich zwischen 78 (Exon 4) und 168 bp (Exon 2) erstrecken. Sämtliche Introns weisen die für das Splicen eukaryontischer Primärtranskripte typischen Konsensussequenzen auf (Breathnach *et al.* 1981; Aebi *et al.* 1987). Ihre Größe variiert zwischen 292 (Intron 5) und 2833 (Intron 1) Nukleotiden. Zusammengenommen entfallen damit 90 % der genomischen Sequenz auf Intronstrukturen (Pailhoux *et al.* 1992). Das *Mvdp*-Gen ist autosomal auf Maus-Chromosom 6 lokalisiert und befindet sich dort in unmittelbarer Nachbarschaft zu zwei anderen Aldo-Keto-Reduktasen, dem *Fgfrp*-Gen (*FR-1*) und dem murinen Gen für Aldose-Reduktase (*Aldor1*) 15,7 cM vom Zentromer entfernt (Ho *et al.* 1999).

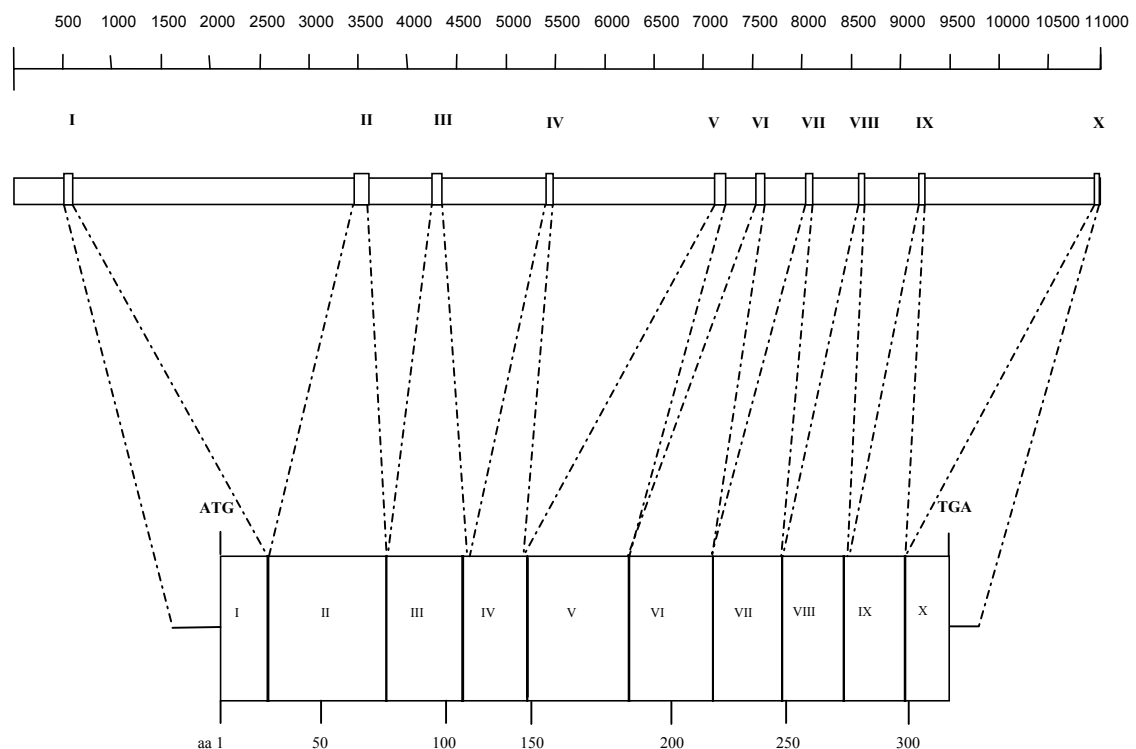


Abb. 1.5: Genomische Organisation des *Mvdp*-Gens

Relative Positionen und Größen der 10 Exons auf chromosomaler (Einheit in Nukleotiden) und mRNA-Ebene (Einheit in Aminosäuren (aa)).

Das Gen kodiert für ein 316 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 34,5 kDa (Taragnat *et al.* 1986; 1988). Auf Grund seiner außerordentlich hohen Sequenzhomologie zu Mitgliedern der Aldo-Keto-Reduktasen wurde das Protein in diese Superfamilie eingeordnet (Pailhoux *et al.* 1990). Aldo-Keto-Reduktasen der Säugetiere finden sich hauptsächlich in der AKR1-Familie, die wiederum in vier Unterfamilien, die Aldehyd-Reduktasen, die Aldose Reduktasen, die Hydroxysteroid-Dehydrogenasen und die Steroid-Reduktasen gegliedert ist. Gemeinsam mit dem murinen Fibroblasten-Wachstumsfaktor-induzierten Protein-1, Fgfrp1 (FR-1) und einigen anderen Proteinen bildet MVDP eine kleine Untergruppe innerhalb der Aldose-Reduktasen-Unterfamilie. MVDP (AKR1B7) und FR-1 (AKR1B8) stellen zwei hoch homologe Proteine dar, deren Aminosäure-Sequenzen zu 82 % identisch sind (Seery *et al.* 1998). Zudem weisen beide Proteine große Ähnlichkeit mit dem murinen Aldose-Reduktase-Gen (*Aldor-1*) auf. Die Sequenzhomologie beträgt hier 68,9 %; im Zusammenhang mit der starken Kopplung der drei Gene auf Chromosom 6 Ausgangspunkt für die These, daß alle drei Gene aus einem einzigen Vorläufer-Gen durch Tandem-Genduplikation hervorgegangen sein könnten (Ho *et al.* 1999).

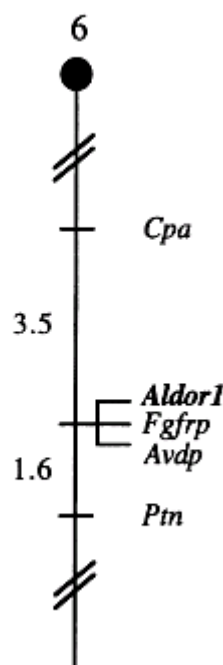


Abb. 1.6: Chromosomale Lokalisation von *Mvdp*

Mvdp (hier als *Avdp* - androgen regulated vas deferens protein – bezeichnet) und die hoch-homologen Gene *Fgfrp* (Fibroblasten-Wachstumsfaktor-induziertes Protein-1-Gen) und *Aldor1* (Aldose Reduktase) liegen auf Maus-Chromosom 6 in unmittelbarer Nachbarschaft. (aus Ho *et al.* 1999)

1.4 Das MVDP-Protein als detoxifizierendes Enzym

Eine nennenswerte *Mvdp*-Expression wurde bislang im *Vas deferens*, in der Nebenniere und in Abhängigkeit vom Östruszyklus im *Ovar* beschrieben - drei Organe recht unterschiedlicher Funktion. Nebenniere und *Ovar* teilen die Eigenschaft, Orte intensiver steroidogener Syntheseprozesse zu sein. Aus diesem Grund wurde eine Beteiligung des MVDP-Proteins am Steroidmetabolismus postuliert. Die Funktion des *Vas deferens* als Transmissions-Organ und Depot der Spermatozoen scheint auf den ersten Blick keine befriedigende Erklärung für die außerordentlich starke Expression in diesem Organ und die bewiesene Assoziation mit der Spermienmembran zu liefern (Taragnat *et al.* 1990). Jedoch ist bekannt, daß Spermien äußerst empfindlich auf oxidativen Streß reagieren. Ihre Plasmamembran ist reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren und macht sie dadurch empfindlich gegenüber oxidativen Schädigungen (Aitken 1994).

Zur Aufklärung der Substratspezifität des MVDP-Proteins wurden Enzymaktivitäts-Assays durchgeführt. Dabei bestimmte man photometrisch den während der Reaktion erfolgenden Farbumschlag des Kofaktors NADPH. Bevorzugte Substrate dieses Enzyms sind demnach mit K_m -Werten von 62 μM und 320 μM 4-Hydroxynonenal und Isocaproaldehyd: äußerst reaktive Verbindungen (Lefrançois-Martinez *et al.* 1999). Sehr ähnliche Meßwerte nennt auch Peters-Kottig (2001).

4-Hydroxynonenal (HNE) entsteht endogen während der Lipid-Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren und gilt unter den dabei anfallenden zytotoxischen Verbindungen als das maßgebliche Aldehyd (Esterbauer *et al.* 1991). Oxidativer Streß - die Hauptursache für Lipid-Peroxidationen - spielt eine bedeutende Rolle bei einer Reihe pathologischer Erkrankungen, wie Atherosklerose, neurodegenerativen Störungen und Krebs (Facchinetti *et al.* 1998; Sun *et al.* 1998; Klatt *et al.* 1996). 4-Hydroxynonenal wurde wegen seiner Fähigkeit zu diffundieren als „second toxic messenger“ bezeichnet und wirkt weitaus zerstörerischer als die initiale Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. HNE greift SH- und NH_2 -Aminosäurereste an (Übersicht in Esterbauer *et al.* 1991) und agiert darüber hinaus auf Grund der Bildung von DNA-Addukten als genotoxische und mutagene Verbindung (Yi *et al.* 1997; Rindgen *et al.* 1999). Abbildung 1.7 zeigt die chemische Struktur von 4-HNE und seine Interaktion mit Nukleotiden. Die Beseitigung einer solch reaktiven Verbindung ist für das Überleben der Zelle von essentieller Bedeutung. Multiple enzymatische Detoxifi-

kationswege entstanden daher im Laufe der Evolution. Zu ihnen gehören die Glutathion-S-Transferasen, die Aldehyd-Dehydrogenasen, die Alkohol-Dehydrogenasen und auch Vertreter der Aldo-Keto-Reduktasen, wie FR-1 (Srivastava *et al.* 1998), humane Aldose-Reduktase (Srivastava *et al.* 2000; Rittner *et al.* 1999) und MVDP (Peters-Kottig 2001; Lefrançois-Martinez *et al.* 1999).

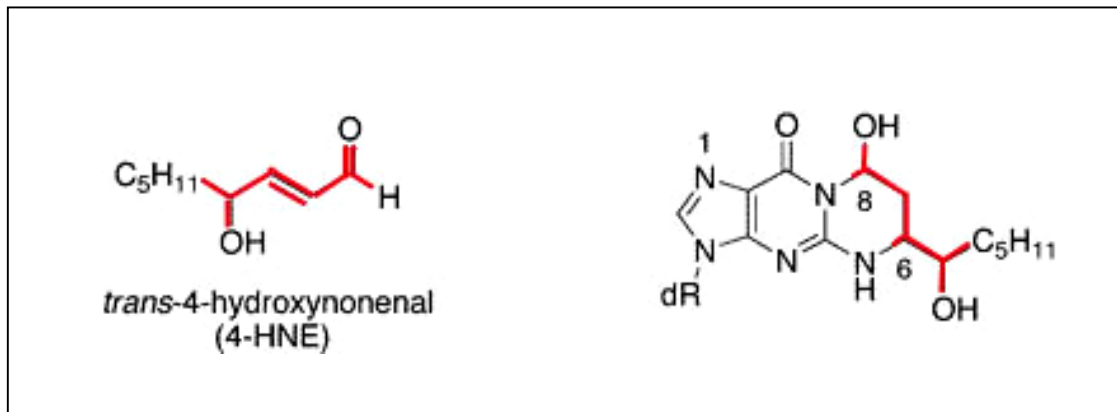


Abb. 1.7: Im *in vitro*-Essay identifiziertes MVDP-Substrat 4-HNE

Chemische Struktur von 4-Hydroxynonenal (links) und als Addukt mit Guanin (rechts).

Der erste Schritt der Steroidbiosynthese beinhaltet die Bildung von Pregnenolon unter Abtrennung der Cholesterol-Seitenkette durch P450_{sc} (Cytochrom P450 side-chain cleavage enzyme). Als Nebenprodukt entsteht dabei in hohen Konzentrationen das bioreaktive Isocaproaldehyd (4-Methylpentanal, Abbildung 1.8) (Burstein *et al.* 1971; Constantopoulos *et al.* 1996), das in einem weiteren Abbauprozess zu Isocapronsäure oxidiert oder zu Isocaprylalkohol reduziert wird (Hall 1970). Die große Substratspezifität des MVDP-Proteins für das reaktive Isocaproaldehyd legt dessen Beteiligung an der Reduktion dieser Verbindung nahe (Lefrançois-Martinez *et al.* 1999; Peters-Kottig 2001). Die fötale, murine Nebenniere nimmt ihre Funktion als steroidogenes Organ ungefähr zum Tag 13 *post conceptionem* auf (Rugh 1968). Dieser Zeitpunkt markiert gleichermaßen die früheste *Mvdp*-Expression in der Nebenniere (Lau *et al.* 1995; Peters-Kottig 2001). Auch die nachgewiesene erhöhte Expression dieses Enzyms bei gesteigerten Steroidsynthese-Prozessen im Vorfeld der Ovulation, deuten auf eine Rolle des MVDP-Proteins als detoxifizierendes Enzym hin.

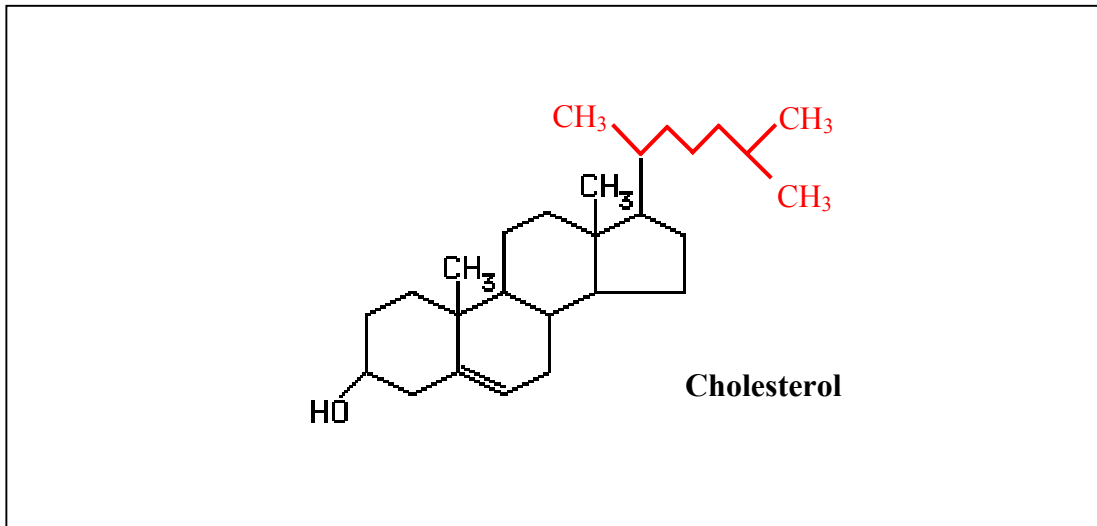


Abb. 1.8: Im *in vitro*-Essay identifiziertes MVDP-Substrat Isocaproaldehyd

Chemische Struktur des Cholesterols – durch Wirkung von P450sc entsteht Pregnenolon und Isocaproaldehyd (rot).

1.5 Zielsetzung

Die Entdeckung des MVDP-Proteins in *Theca*-Zellen des *Ovars* und dessen deutlich auf die Ovulationsphase begrenzte Expression gaben Grund zur Vermutung, daß dem Protein eine wesentliche Bedeutung bei Ovulationsprozessen zukommt. Seine postulierte detoxifizierende Wirkung dient der Zelle möglicherweise als Schutzmechanismus vor nun vermehrt gebildeten, zytotoxischen Verbindungen. Das Ausbleiben der Enzymwirkung führt daher möglicherweise zum Zelluntergang und zu Ovulationsstörungen. Durch die starke Präsenz des MVDP-Proteins im Samenleiter könnte es darüber hinaus neben der weiblichen auch als potentieller Angriffspunkt für die männliche Fertilitätskontrolle dienen. Die zu Grunde liegende Idee ist dabei, Ansatzpunkte zu finden, die möglicherweise zur Entwicklung nicht-hormoneller und so eventuell nebenwirkungsärmerer Kontrazeptiva führen.

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der funktionellen Charakteristika des MVDP-Proteins durch die Deletion des Gens im Modellorganismus Maus und die Charakterisierung des resultierenden Phänotyps. Auf Grund der multiplen Expressionsorte des Proteins sollte der Knockout des *Mvdp*-Gens konventionell, d.h. im Gesamtorganismus, und zusätzlich in einem zweiten Modell organspezifisch (d.h. konditionell) erfolgen. Diese Vorgehensweise versprach die größtmögliche funktionelle Aussagekraft der generierten Modelle, da durch die Präsenz des Proteins in der Nebenniere und seine vermutete Beteiligung an Detoxifizierungsprozessen bei der Steroidbiosynthese nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Deletion letale Effekte auf den Organismus haben könnte. Zum Anderen ermöglicht ein organspezifischer Knockout die Zuordnung der phänotypischen Erscheinungsbilder zum jeweiligen Organ und schließt interferierende Effekte aus.

Im Zuge dieser Arbeit sollten daher mit Hilfe der Knockout-Technologie Erkenntnisse über die Funktion des MVDP-Proteins bei Fortpflanzungsprozessen und bei Steroidsynthese-Vorgängen im Gesamtorganismus erzielt werden.