

**Erzeugung und Charakterisierung von Knockout-Mäusen des
Maus Vas Deferens Proteins**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades des Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Claudia Baumann
aus Chemnitz

Februar 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Franz Theuring

2. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Achazi

Disputation am: 19. April 2004

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Superfamilie der Aldo-Keto-Reduktasen.....	1
1.2	Das Maus Vas Deferens Protein.....	3
1.2.1	MVDP-Expression in der Nebenniere.....	4
1.2.2	MVDP-Expression im Ovar	5
1.2.3	Die Regulation des <i>Mvdp</i> -Gens in Vas deferens, Nebenniere und Ovar.....	7
1.3	Genomische Organisation, chromosomale Lokalisation und Homologien innerhalb der Genfamilie	9
1.4	Das MVDP-Protein als detoxifizierendes Enzym	11
1.5	Zielsetzung.....	14
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Material.....	15
2.1.1	Chemikalien und Substanzen	15
2.1.2	Kits	16
2.1.3	Nukleinsäuren und Nukleotide	16
2.1.4	Molekulargewichtsmarker.....	18
2.1.5	Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme.....	18
2.1.6	Antikörper	19
2.1.7	Biologisches Material.....	19
2.1.8	Medien und Zusätze für die Kultur eukaryotischer Zellen.....	19
2.1.9	Versuchstiere und Zelllinien	20
2.1.10	Ausgewählte Zusatzmaterialien.....	20
2.1.11	Puffer und Lösungen	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	22
2.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.2.1.2	Kultivierung von Bakterien	25
2.2.1.3	Isolation von Plasmid-DNA	25
2.2.1.4	Präparation genomischer DNA.....	26
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	27
2.2.2.1	Proteinisolation aus Gewebe.....	27
2.2.2.2	Western Blotting.....	27
2.2.3	Design und Klonierung des Targeting Konstruktes	28
2.2.4	Zellkulturtechniken und Transfektion	30
2.2.4.1	Präparation und Kultur embryonaler Fibroblasten	30
2.2.4.2	Kultur embryonaler Stammzellen (ES-Zellen).....	31

2.2.4.3	Elektroporation embryonaler Stammzellen	31
2.2.4.4	Isolierung erfolgreich transfizierter ES-Zellklone	32
2.2.4.5	Einfrieren und Auftauen embryonaler Stammzellen	32
2.2.5	Grundlegende tierexperimentelle Techniken	33
2.2.5.1	Superovulation, Blastozystenisolierung und Injektion embryonaler Stammzellen in Blastozysten.....	33
2.2.5.2	Genotypisierung.....	34
2.2.6	Phänotypisierung.....	34
2.2.6.1	Feinhistologische Untersuchungen.....	34
2.2.6.2	Bestimmung grundlegender physiologischer Parameter	34
2.2.6.3	Fertilitätsanalyse.....	36
2.2.6.4	Phänotypisierung unter Einwirkung verschiedener Stimuli	38
2.2.6.5	Tierversuchsgenehmigungen.....	40
3	ERGEBNISSE	41
3.1	Die gezielte Deletion des MVDP-Gens.....	42
3.1.1	„Targeting“-Strategie & Struktur des „Targeting“-Vektors zur homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen	43
3.1.2	Durchmusterung einer PAC-Bibliothek zur Identifikation muriner, genomischer <i>Mvdp</i> -DNA	47
3.1.3	Elektroporation embryonaler Stammzellen und Selektion homolog- rekombinierter Klone	48
3.1.4	Transiente Transfektion der rekombinierten Klone mit einem Cre- Rekombinase exprimierenden Plasmid.....	51
3.1.5	Die Generierung chimärer Tiere durch Injektion embryonaler Stammzellen in Wirtsblastozysten.....	54
3.2	Charakterisierung der MVDP-Knockout-Tiere	57
3.2.1	Überprüfung der Gen-Deletion	58
3.2.1.1	Überprüfung der Gen-Deletion mittels Southern-Analyse	58
3.2.1.2	Expressionsanalyse auf Transkriptionsebene	58
3.2.1.2.1	RT-PCR.....	58
3.2.1.2.2	Northern Blot	58
3.2.1.3	Expressionsanalyse auf Proteinebene.....	61
3.2.2	Bestimmung grundlegender physiologischer Parameter	63
3.2.2.1	Histologie.....	64
3.2.2.2	Morphometrie	68
3.2.2.3	Organgewichte.....	70
3.2.2.4	Körpergewichtsentwicklung	72
3.2.2.5	Konzentrationsbestimmung verschiedener Steroidhormone	73
3.2.2.5.1	Corticosteron.....	74
3.2.2.5.2	Testosteron.....	75

3.2.2.5.3 Progesteron	76
3.2.2.6 Kaplan-Meier-Überlebenskurve	77
3.2.2.7 Apoptosefärbung.....	79
3.2.2.8 Fertilitätsanalyse	81
3.2.2.8.1 Testverpaarung.....	81
3.2.2.8.2 Zyklusverlauf	83
3.2.2.8.3 Bestimmung der Follikelstadien-Verteilung.....	84
3.2.2.8.4 Spermienanalyse	85
3.2.3 Charakterisierung unter Einwirkung exogener Stimuli	87
3.2.3.1 Lipopolysaccharide.....	87
3.2.3.2 Stressinduktion durch Immobilisierung.....	91
3.2.3.3 Nahrungsentzug	92
3.2.4 Untersuchung möglicher Kompensationseffekte	93
4 DISKUSSION 95	
4.1 Strategische Überlegungen zum Knockout-Modell	95
4.2 Das MVDP-Protein und seine hypothetische Wirkung	96
4.3 MVDP-Knockout-Mäuse als Modelle der <i>in vivo</i> - Genfunktion	98
4.4 MVDP-Knockout-Tiere zeigen geschlechtsspezifisch eine erhöhte Mortalität und Veränderungen der Steroid-hormonwerte	99
4.5 MVDP-Knockout-Tiere sind fertil und zeigen keine Veränderungen im Paarungsverhalten.....	103
4.6 MVDP-Knockout-Tiere zeigen geschlechtsabhängige Veränderungen der Körpergewichtsentwicklung.....	105
4.7 Weibliche Knockout-Mäuse weisen verbreiterte <i>Zonae fasciculatae</i> auf	107
4.8 Die Induktion inflammatorischer Stresszustände führt bei weiblichen MVDP-Knockout-Tieren zu verstärkter Apoptose in der <i>Zona fasciculata</i>	110
4.9 Die Bedeutung des MVDP-Proteins für den Organismus: Ein Ausblick..	113
5 ZUSAMMENFASSUNG	116
6 ABSTRACT	117
7 LITERATURVERZEICHNIS	118
8 ANHANG	127
8.1 Die Superfamilie der Aldo-Keto-Reduktasen.....	127
8.2 Aminosäure-Reste zur Substrat- und Kofaktorbindung verschiedener AKR im Vergleich	128
8.3 Direkter Aminosäure-Sequenzvergleich der Proteine MVDP und FR-1 ..	129
9 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	130

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

4-HNE	4-Hydroxynonenal
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropin
AKR	Aldo-Keto-Reduktase
AP-1	„Activating Protein 1“
ARE	„Androgen Response Element“
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CHO	„Chinese Hamster Ovary“
cM	centi Morgan
CMV	Cytomegali-Virus
CRH	Corticotropin-Releasing-Homon
DAX-1	„Dosage-sensitive Sex Reversal-adrenal Hypoplasia Congenita Critical Region on the x-Chromosome Gene 1“-Protein-1
DMEM	„Dulbecco’s Minimal Essential Medium“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
ECL	„Enhanced Chemiluminescence“
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FCS	Fötales Kälberserum
FR-1	Fibroblasten Wachstumsfaktor-induziertes Protein-1
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
G418	Antibiotikum, Neomycin-Analagon
GMEM	„Dulbecco’s Minimal Essential Medium with Glutamax-1“
GST	Glutathion-S-Transferase
HCG	Humanes-Chorion-Gonadotropin
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
kb	Kilobase
kDa	kilo Dalton

LB	Luria-Bertani-Medium
LH	Luteinisierendes Hormon
LIF	„Leukemia Inhibitory Substance“
loxP	„locus of crossover x in P1“-Sequenz
LPS	Lipopolysaccharid
MC-1	Mario Capecchi-Promotor-1
MEF	„Mouse Embryonic Fibroblasts“
mRNA	messenger RNA
MVDP	Maus Vas Deferens Protein
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF- κ B	Nukleärer Faktor-kappaB
P450 _{sc}	Cytochrom P450 „Side Chain Cleavage Enzyme“
PAC	„P1-derived Artificial Chromosome“
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
Pgk	Phosphoglyceratkinase-Promotor
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
PMSG	„Pregnant Mares Serum Gonadotropine“
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygene Species
RT-PCR	Reverse Transkription gefolgt von einer PCR
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SF-1	Steroidogener Faktor-1
StAR	Steroidogenesis Acute Regulatory Protein
Tab.	Tabelle
TE	Tris/EDTA
TNF α	„Tumor Necrosis Factor alpha“
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	Terminale Desoxyribosyl-Transferase vermitteltes dUTP Nick End Labeling