

3 ERGEBNISSE

Die physiologische Bedeutung des MVDP-Proteins im murinen Organismus ist bis heute ungeklärt. Jedoch geben sowohl *in vitro*-Enzymaktivitäts-Assays (Lefrancois-Martinez *et al.* 1999, Peters-Kottig 2001), als auch das spatiale und temporäre Expressionsmuster des Gens (Taragnat *et al.* 1990, Lau *et al.* 1999, Brockstedt *et al.* 2000, Peters-Kottig 2001) Hinweise darauf, dass das Protein wichtige Funktionen bei detoxifizierenden Vorgängen erfüllen könnte. Da die MVDP-Expression im *Ovar* der Maus zeitlich eng an den Prozess der Ovulation gekoppelt ist, wurde eine wesentliche Beteiligung an den dann ablaufenden Veränderungen des Organs postuliert. Zum Beispiel könnte es eine Rolle bei der Beseitigung toxischer Verbindungen spielen, die bei verstärkter Steroidhormon-Biosynthese oder bei Lipid-Peroxidationen gehäuft anfallen. Die Nebenniere ist als Steroidhormonsynthetisierendes Organ verschiedensten toxischen Nebenprodukten ausgesetzt. Daher könnte das MVDP-Enzym in der *Zona fasciculata*, seinem Expressionsort, Bestandteil eines detoxifizierenden Mechanismus sein.

Organe wie das *Ovar* oder die Nebenniere sind morphologisch gut organisierte Gewebe und setzen sich aus unterschiedlichen, miteinander kommunizierenden Zelltypen zusammen, welche die Funktionen des Organs ausschließlich gemeinsam erfüllen können. Für funktionelle Analysen einzelner Proteine in komplexen Geweben bietet sich die Technologie des gezielten Gen-Knockouts an, da z.B. Organe *ex vivo* nur schwer kultivierbar sind. Im Tiermodell und damit im Gesamtorganismus kann mit Hilfe von Knockout-Modellen die Auswirkung des Fehlens des Genproduktes auf den Organismus analysiert werden. Durch solche auch als „reverse genetics“ bezeichnete Verfahren lassen sich zuverlässigere Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins im intakten Individuum ziehen als es Zellkulturexperimente zumeist ermöglichen.

3.1 Die gezielte Deletion des MVDP-Gens

Die genomische Organisation des *Mvdp*-Gens war während der letzten Jahrzehnte Gegenstand intensiver Forschung und ist daher heute sehr gut untersucht (Pailhoux *et al.* 1992; Fabre *et al.* 1995; Ho *et al.* 1999). Das Gen besteht aus 10 Exons, hat eine Gesamtlänge von 11 kb und verfügt damit über eine außerordentlich hohe Strukturhomologie zu anderen Aldo-Keto-Reduktasen (Pailhoux *et al.* 1990), wie z.B. zum „*Fibroblast Growth Factor induced Protein*“-Gen (*Fr-1*). Aminosäuresequenzvergleiche zwischen MVDP- und FR-1-Protein verdeutlichen Homologien von 82% (Gui *et al.* 1995; Seery *et al.* 1998). Einen Überblick über den strukturellen Aufbau beider Gene und ihrer Genprodukte bietet Abbildung 8.2 im Anhang. Die Mehrzahl der Aldo-Keto-Reduktasen weisen zu mindestens 50% identische Aminosäuresequenzen auf, und besonders die für die Substratbindung der Enzyme potentiell verantwortlichen Aminosäurereste sind darüber hinaus hoch konserviert (Wilson *et al.* 1995). Ein Vergleich dieser hoch-konservierten Aminosäure-Reste und ihre funktionelle Bedeutung findet sich im Anhang in den Tabellen 8.1 und 8.2. Die verfügbaren Informationen über funktionell bedeutsame Domänen des Proteins, unterstützt durch die außergewöhnlich starken Ähnlichkeiten zu anderen gut untersuchten Mitgliedern der Genfamilie, führten zur Identifikation der katalytisch aktiven Aminosäure-Reste im MVDP-Protein, deren Lokalisation in Abbildung 3.1 dargestellt ist.

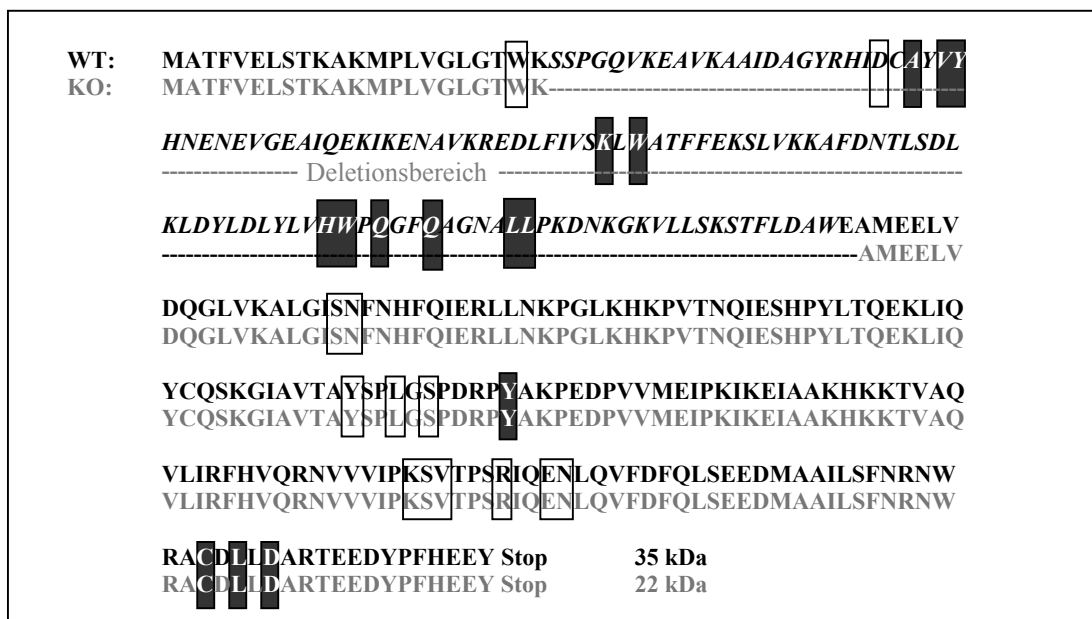


Abb. 3.1: Funktionell bedeutsame Aminosäure-Reste des MVDP-Proteins im Vergleich zum deletierten Knockout-Protein

Dargestellt sind beide Proteinsequenzen (Wildtyp = schwarz, obere Sequenz; Knockout = grau, untere Sequenz). Gekennzeichnet sind der Deletionsbereich beim MVDP-Knockout-Protein und bedeutende Aminosäurereste zur Kofaktor-Bindung (eingrahmt) und zur Substratbindung (dunkel hinterlegt).

Die zur Substratbindung benötigten Aminosäuren werden zum großen Teil von den Exons 2, 3 und 4 kodiert. Daher wurde zur Zerstörung der Funktionsfähigkeit des Proteins diese Genregion als zu deletierender Bereich festgelegt. Das Leseraster der Sequenz blieb dabei unverändert.

3.1.1 „Targeting“-Strategie & Struktur des „Targeting“-Vektors zur homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen

Konventionelle Knockout-Verfahren führen zur Inaktivierung oder Modifikation eines Gens in sämtlichen Geweben eines Organismus. Einsetzend mit dem Beginn seiner Entwicklung halten diese für die gesamte Lebensdauer an. Wird das im Modell inaktivierte Genprodukt in einer frühen Entwicklungsphase des Organismus benötigt, besteht beim konventionellen Knockout die Möglichkeit, dass Effekte auftreten, die von der Kompensation des fehlenden Proteins durch andere Genprodukte bis hin zu fehlgeleiteten Entwicklungsprozessen reichen. Solche Effekte stünden mit der Funktion des Proteins im adulten Individuum in keinerlei Zusammenhang und würden das phänotypische Erscheinungsbild verfälschen. Zudem sind Interferenzen zwischen Effekten der Gendeletion in den einzelnen exprimierenden Organen möglich. Diese könnten bewirken, dass sich ein Gesamtphänotyp ausbildet, welcher kaum Rückschlüsse auf die Funktion des Genprodukts in den einzelnen Organen zulässt. Im Gegensatz dazu existieren eine Reihe Knockout-Strategien, die solche genetischen Modifikationen auf eine bestimmte Zeit des Lebenszyklus oder auf einen bestimmten Gewebetyp beschränken und damit die oben genannten Effekte vermeiden helfen. Sie werden zusammenfassend als konditionelle Strategien bezeichnet.

Eine der Methoden gewebespezifische Geninaktivierungen zu erreichen, macht sich ein Bakteriophagen-Enzym zu Nutze. P1-Bakteriophagen verfügen über das Enzym Cre-Rekombinase, das spezifische 34 bp lange, z.T. palindromische Sequenzmotive (sogenannte *loxP*-Motive) erkennt und im Falle zweier gleichgerichtet orientierter *loxP*-Motive den dazwischen liegenden Bereich sehr effizient exzidiert (Abremski und Hoess 1984, 1985). Die Bezeichnung *loxP* leitet sich von „*locus of crossover x* in P1“ ab. Bereiche, die von zwei *loxP*-Motiven eingerahmt werden, nennt man „gefloxt“. Als Ergebnis eines Rekombinationsereignisses zwischen zwei *loxP*-Sequenzen verbleibt eine der beiden *loxP*-Sequenzen im Genom, wohingegen die zweite mitsamt der geflochten Region entfernt wird. Ein bedeutender Vorteil dieser

Exzisionen besteht darin, dass zuvor eingefügte Resistenzmarker vor der tatsächlichen Generierung des Mausmodells eliminiert werden und somit eventuelle Effekte dieser Fremdsequenzen ausgeschlossen werden können. Gefloxtete Genregionen in einer bereits generierten Maus ermöglichen darüber hinaus Gewebe- oder Zeitpunkt-spezifische Exzisionen. Durch die Verpaarung der gefloxteten Mäuse mit Tieren, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines spezifischen Promotors exprimieren, kommt es bei den Nachkommen nur in Cre-exprimierenden Geweben zu Exzisionen. Diese Nachkommen stellen das eigentliche konditionelle Mausmodell dar.

Gewebespezifische Gendelektionen erlauben die Untersuchung funktioneller Charakteristika eines Proteins in einem ausgewählten Zell- oder Gewebetyp und schließen interferierende Einflüsse aus, die der konventionelle Knockout dieses Gens in allen exprimierenden Geweben verursachen könnte. Die Expression des *Mvdp*-Gens setzt in der Nebenniere bereits während der Embryogenese ein. Die Deletion des Gens auf konventionelle Art in sämtlichen Geweben vom ersten Tag der Entwicklung an birgt daher die Gefahr, dass letale oder pathologische Effekte während oder nach der Embryonalentwicklung auftreten könnten. Zudem wird MVDP sowohl in den *Theca*-Zellen des Ovars kurz vor der Ovulation als auch in der *Zona fasciculata* der Nebenniere exprimiert. Beide Gewebetypen sind stark endokrin geprägt, weshalb Interferenzen oder letale Effekte im Falle eines konventionellen Knockouts nicht ausgeschlossen erschienen.

Abbildung 3.2. stellt den im Folgenden beschriebenen Aufbau des „Targeting“-Konstruktes dar und bietet einen Überblick über den prinzipiellen Ablauf der zur Generierung des Mausmodells führenden Arbeitsschritte. Das „Targeting“-Konstrukt für das *Mvdp*-Gen wurde auf Grund des Expressionsmusters in mehreren endokrinen Organen so gestaltet, dass ein gewebsspezifischer Knockout mittels *Cre/loxP*-Technologie möglich ist.

Zu den Bestandteilen des Konstruktes gehören zwei „Homologiebereiche“ am 3'- und am 5'-Ende des Gens. Diese gewährleisten die Integration des rekombinanten DNA-Abschnittes in das Genom über homologe Rekombination, wobei der zwischen ihnen liegende Bereich ebenfalls integriert wird. Er besteht aus einer Selektionskassette, die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum G418 verleiht und aus dem Deletionsbereich mit den Exons 2, 3 und 4.

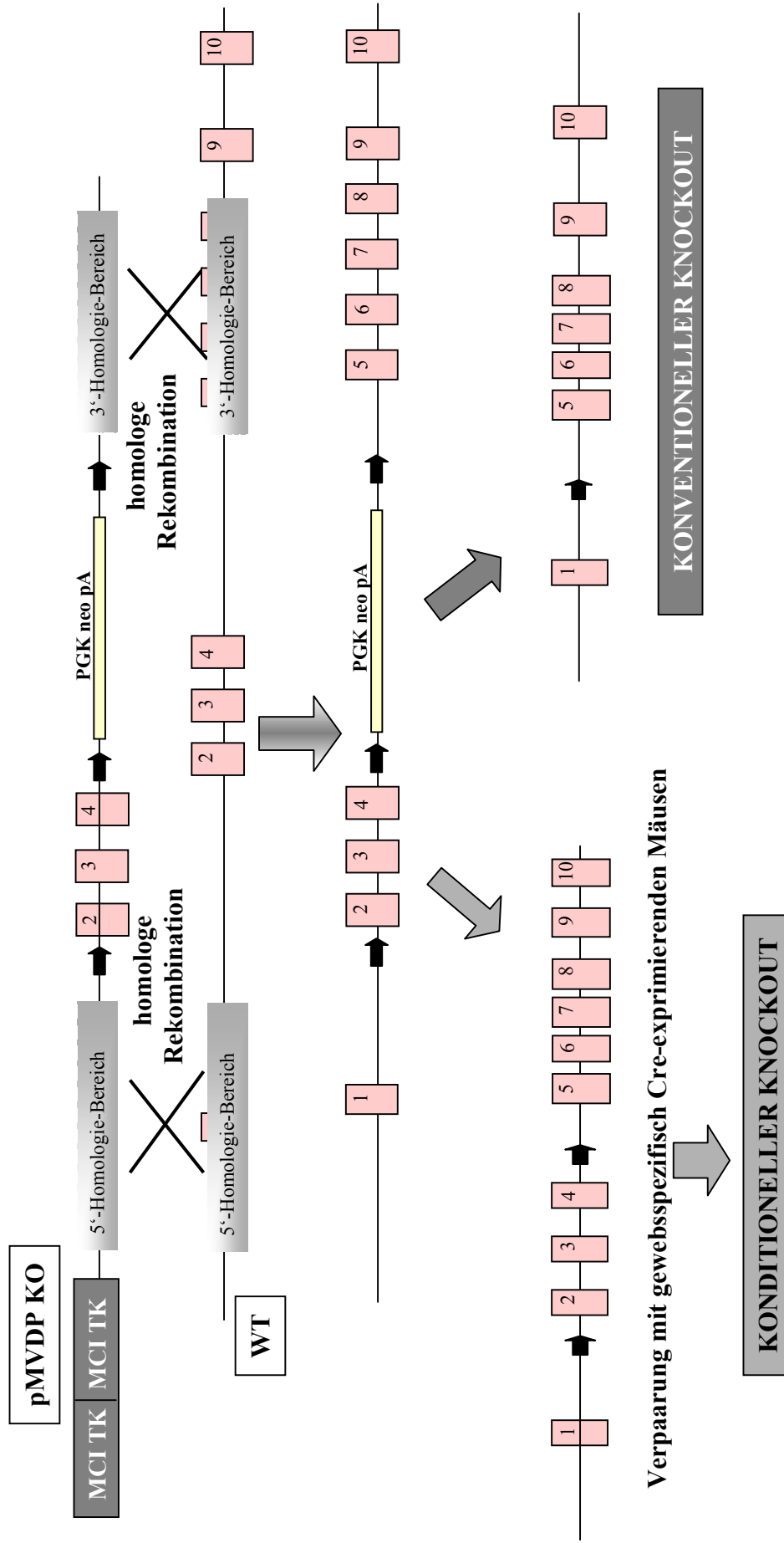


Abb. 3.2: „Targeting“-Strategie des MVDP-Gens
 Struktur des MVDP-, „Targeting“-Vektors, des Wildtyp-MVDP-Locus und des Allels nach erfolgter homologer Rekombination. Exons sind als nummerierte, rosafarbene Kästchen dargestellt. Zwei Dimere der HSV-Thymidin-Kinase werden bei nicht-homologer Rekombination inkorporiert und dienen der negativen Selektion solcher Rekombinationsereignisse. Die Kasette zur positiven Selektion ist mit „PGK neo pA“ bezeichnet. Sie wird, um ein Entfernen dieser Sequenz im zweiten Schritt zu ermöglichen, von loxP-Sequenzen (schwarze Pfeile) flankiert. In Abhängigkeit davon, welche loxP-Sequenzen (von links nach rechts: loxP1 bis loxP3) miteinander rekombinieren, entstehen konventionelle Knockout-Mäuse oder solche, die nach Verpaarung mit einer Cre-exprimierenden Maus gewebspezifische MVDP-Deletionen aufweisen.

Sowohl die Selektionskassette als auch der Deletionsbereich werden jedoch von insgesamt drei *loxP*-Sequenzen eingerahmt, die durch die Wirkung der Cre-Rekombinase bei der nachfolgenden transienten Cre-Transfektion exzidiert werden können. Dabei führt das Enzym zu Rekombinationsereignissen zwischen jeweils zwei solchen *loxP*-Motiven, wodurch unterschiedliche Klone entstehen: Solche, bei denen der Deletionsbereich exzidiert ist (*loxP1* und *loxP2* wurden rekombiniert), solche, denen die Resistenzkassette fehlt (*loxP2* und *loxP3* wurden rekombiniert; zur späteren Erstellung des konditionellen Knockouts verwendbar) und solche, die weder den Deletionsbereich noch den Selektionsmarker enthalten (*loxP1* und *loxP3* wurden rekombiniert; dienen als Ausgangsmaterial für den konventionellen Knockout).

Die beschriebenen induzierbaren Exzisionen repräsentieren das technologische Grundprinzip des konditionellen Knockouts mittels Cre/*loxP* und haben gleichzeitig zur Folge, dass neben Rekombinationen, die für die Generierung eines konditionellen Knockouts benötigt werden auch solche auftreten, welche die Herstellung eines konventionellen Modells ermöglichen. Außerhalb der durch homologe Rekombination zu integrierenden Abschnitte liegt ein weiterer der Selektion dienender Bereich. Zwei Kopien des Gens für *HSV-Thymidinkinase* (*Tk*-Gen) führen zur Anreicherung von Klonen mit homologer Rekombination an exakt der Stelle im Genom, die auch endogen für das *Mvdp*-Gen kodiert. Bei zufälliger Integration an beliebiger Stelle wird zusätzlich zum Bereich zwischen den Homologiebereichen auch das *Tk*-Gen inkorporiert, wodurch es zur Expression gelangt und seine Wirkung entfalten kann. Die Thymidinkinase phosphoryliert eine als Gancyclovir bekannte Substanz, die in der Medizin als Virostatikum Anwendung findet. Eukaryontische Zellen erwerben die Sensitivität gegenüber dieser Substanz nur durch Virusinfektion oder im Experiment durch nicht-homologe Rekombination und können daher mit Gancyclovir-enthaltendem Medium einfach eliminiert werden.

3.1.2 Durchmusterung einer PAC-Bibliothek zur Identifikation muriner, genomischer *Mvdp*-DNA

Zur Isolierung möglichst großer Bereiche des *Mvdp*-Gens der Maus wurde eine genomische PAC-DNA-Bank (Filter 109, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin) des Mausstammes 129 Ola mit einer *Mvdp*-spezifischen Sonde durchmustert. Die hierfür eingesetzte Sonde wurde unter Verwendung der Primer MVDP3' und MVDP5' durch Amplifikation genomischer DNA embryonaler Stammzellen hergestellt. Die zu positiven Signalen korrespondierenden Klone wurden exakteren Analysen unterzogen. Ihre genomische DNA wurde, wie in Abbildungen 3.3 dargestellt, mit dem Restriktionsenzym *Dra*I verdaut und mit der oben beschriebenen Sonde im Southern Blot hybridisiert. Die Analyse ergab für mehrere Klone positive Signale bei einer Fragmentgröße von 3,0 kb. PAC-Klon Nummer 6 (79Q2) wurde zur Isolation genomischer *Mvdp*-DNA herangezogen.

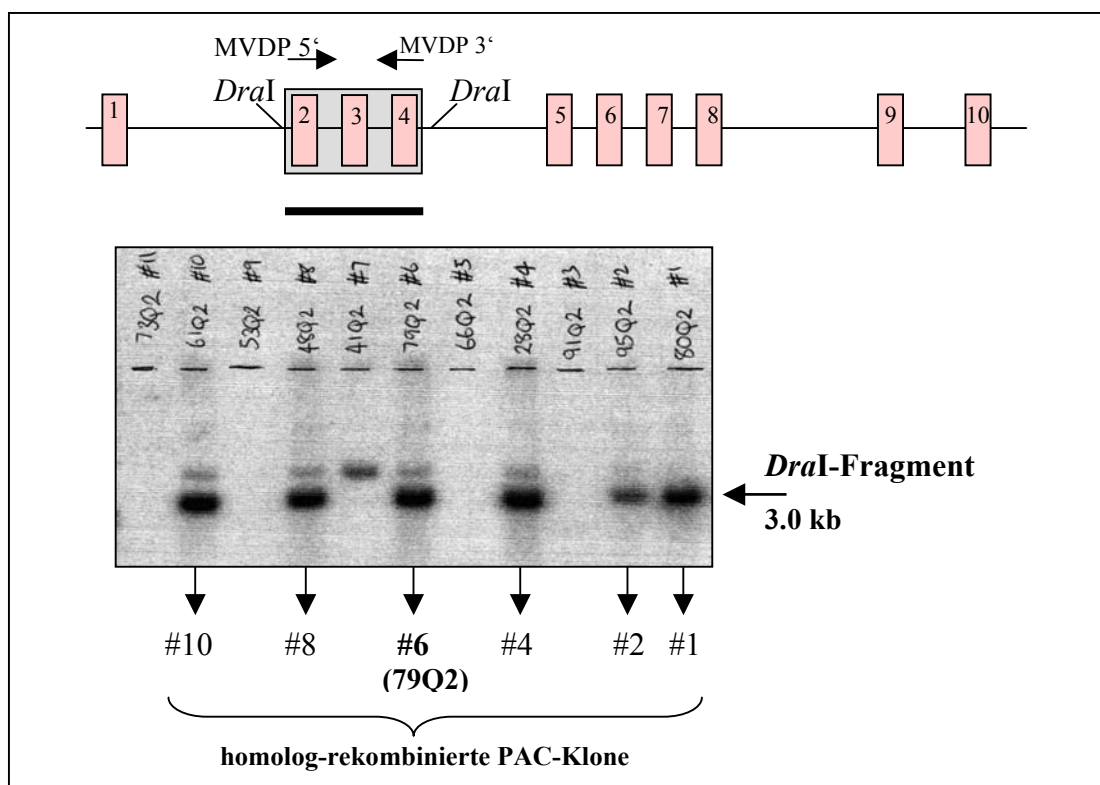


Abb. 3.3: Genomische Organisation des *Mvdp*-Gens und Southern Blot positiver PAC-Klone

Numerierte Kästchen verdeutlichen die Positionen der 10 Exons. Die funktionelle Domäne für die Substratbindung wird hauptsächlich von den Exons 2 bis 4 kodiert (grau unterlegt) und sollte daher deletiert werden. Die Primer MVDP 5' und MVDP 3' (Pfeile, zur Herstellung der MVDP-spezifischen Sonde, (schwarzer Balken) sind als Pfeile dargestellt. Die *Dra*I-Schnittstellen sind markiert. Das Signal bei 3,0 kb entspricht dem Restriktionsfragment, das durch Verdau der genomischen DNA mit *Dra*I entsteht. Die Durchmusterung der PAC-Bibliothek wurde von Dr. Ben Davies (Charité, Berlin) durchgeführt. Klon Nr. 6 (79Q2) wurde für weitere Klonierungsschritte verwendet.

3.1.3 Elektroporation embryonaler Stammzellen und Selektion homolog-rekombinierter Klone

Nach der Elektroporation des linearisierten Konstruktes pMVDP-KO in embryonale Stammzellen erfolgte mit Hilfe der Antibiotika G418 (positive Selektion) und Gancyclovir (negative Selektion) die Anreicherung homolog rekombinierter Stammzellklone. 275 Kolonien wurden isoliert, in 96-Loch-Platten kultiviert und zur zweifelsfreien Markierung der Klone die Koordinaten der drei 96-Loch-Platten jeweils unterschiedlich benannt. Die DNA von jeweils acht Klonen wurde zusammengeführt und mit Hilfe der Primerpaare „Screen F“/„Screen R“ und „Screen F“/„Control R“ per PCR durchmustert. Abbildung 3.4 veranschaulicht die Vorgehensweise. Die Mitglieder eines „Pools“, der positive PCR-Signale zeigte, wurden in einem zweiten Schritt einzeln getestet. Die Überprüfung der 275 Klone ergab drei positiv homolog rekombinierte Stammzell-Klone, die als B10/1, C₂6 und BA3 bezeichnet wurden.

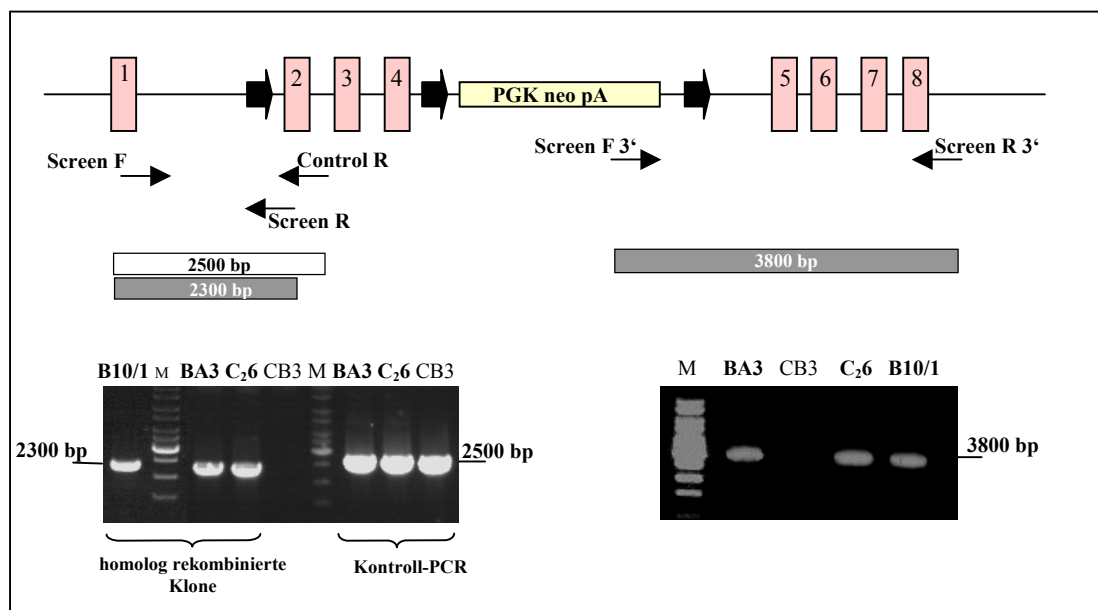


Abb. 3.4: „Screening“-Strategie zur Identifizierung positiv rekombinierter ES-Zell-Klone

Dargestellt ist die genomische Organisation des Allels nach erfolgreicher homologer Rekombination. Die Primer Screen F/Screen R/Control R dienen der Überprüfung der korrekten Integration im 5'-Bereich. Der Nachweis der 3'-Rekombination erfolgte mit dem Primerpaar Screen F 3'/Screen R 3'. Die entstehenden Fragmente sind als graue (homologe Rekombination) und weiße (Kontroll-PCR, funktioniert bei allen Allelen) Balken dargestellt. Die entsprechenden Gelfotos befinden sich unter den jeweiligen Balken. Alle positiv homolog rekombinierten Klone sind fett gedruckt. Klon CB3 ist nicht homolog rekombiniert.

Die Rekombinationseffizienz betrug 1,1 %, wobei Vergleiche mit Literaturangaben kaum möglich sind; schwanken die Effizienzen doch beträchtlich u.a. auf Grund individueller chromosomaler Tertiärstrukturen oder der Länge der Homologiebereiche, die die Zugänglichkeit und die Rekombinationsfreudigkeit eines DNA-Abschnittes entscheidend beeinflussen. Grundsätzlich liegen die hier erzielten Frequenzen durchaus im Normbereich.

Im Anschluß daran wurden diese positiven Klone per Southern Blot unter Verwendung der in Abbildung 3.5 markierten 5'-Sonde verifiziert. Um sicherzustellen, dass die homologe Rekombination im Bereich der beiden Homologiearme und nicht im Bereich der Exons 2, 3 und 4 stattgefunden hatte, wurde zudem die Integration der Neomycin-Resistenzkassette unter Verwendung einer im 3'-Bereich hybridisierenden Sonde untersucht.

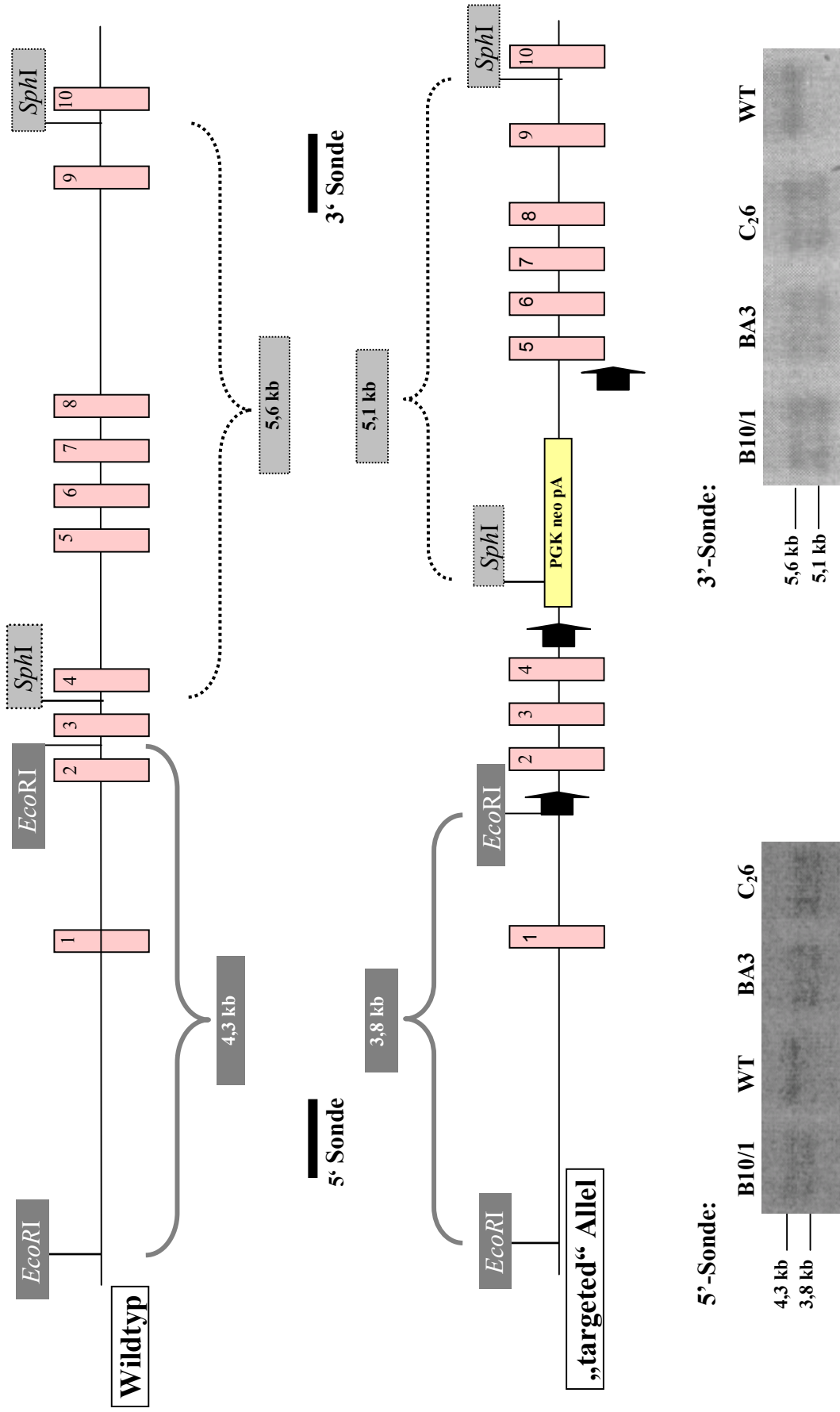


Abb. 3.5: Southern Blot zur Identifizierung homolog rekombinierter ES-Zell-Klone. Genomische DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* (Hybridisierung mit 5' Sonde, dunkel-grau) und *SphI* (Hybridisierung mit 3' Sonde, hell-grau) verdaut. Die Hybridisierung mit den spezifischen Sonden (schwarze Balken) ergab Signale bei 4,3 kb und 3,8 kb (für die 5'-Sonde) und 5,6 kb und 5,1 kb (für die 3'-Sonde), die sich durch zusätzliche Restriktionsschnittstellen in der loxP-Sequenz (5'-Sonde) bzw. in der Neomycin-Resistenzkassette (3'-Sonde) bilden.

3.1.4 Transiente Transfektion der rekombinierten Klone mit einem Cre-Rekombinase exprimierenden Plasmid

Jeder der drei homolog rekombinierten ES-Zell-Klone wurde im Zuge einer weiteren Elektroporation mit dem Cre-Rekombinase-kodierenden Expressionsvektor pCre-PAC transient transfiziert. pCre-PAC kodiert für die Enzyme Cre-Rekombinase unter Kontrolle des MC-1-Promotors (Mario Capecchi-Promotor 1) und Puromycin-N-Acetyltransferase (Phosphoglyceratkinase (P_{gk})-Promotor). Letzteres vermittelt Resistenz gegenüber Puromycin. In Abhängigkeit von der Dauer der Cre-Rekombinase-Wirkung kommt es zu den verschiedenen, bereits erwähnten, Rekombinationen zwischen jeweils zwei der drei vorhandenen *loxP*-Sequenzen, die durch Abbildung 3.6 verdeutlicht werden. Je länger das Cre-Enzym agieren kann, desto häufiger kommt es zu Rekombinationen zwischen weiter auseinander liegenden Sequenzen. Der Selektionsdruck und damit die Zeitspanne der Cre-Rekombinase-Wirkung wird daher zeitlich beschränkt ausgeübt, um Klone aller drei möglichen Rekombinationsvarianten zu erhalten. Ein Selektionsdruck über 48 Stunden wurde als optimaler Zeitraum beschrieben (Taniguchi *et al.* 1998).

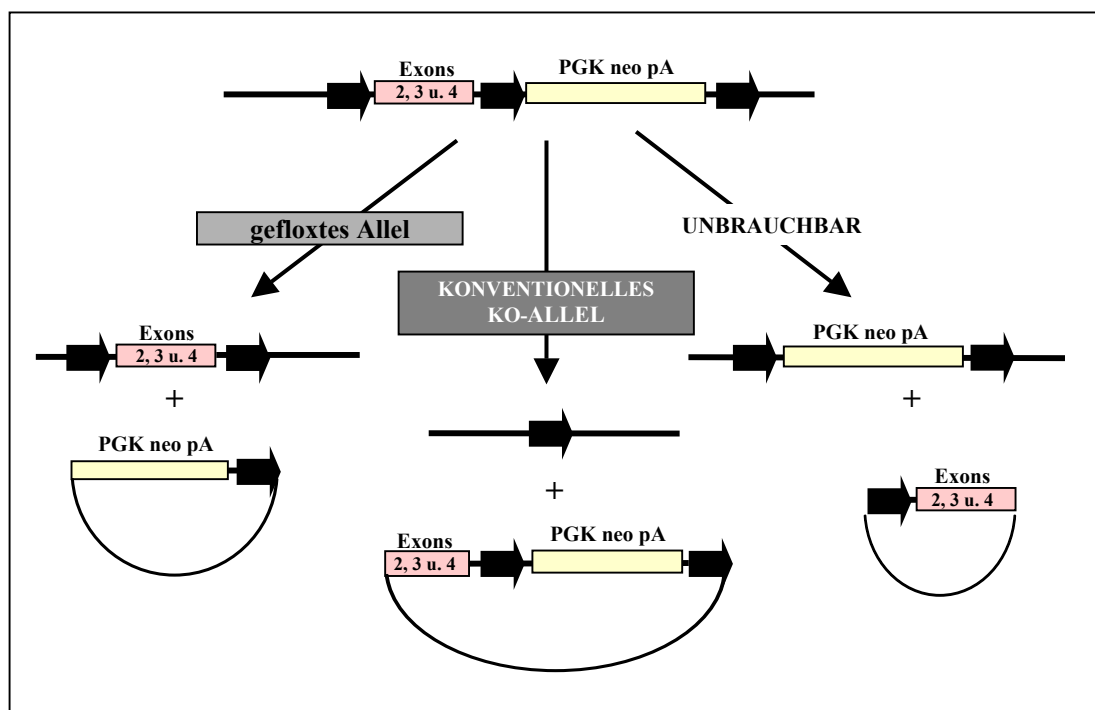


Abb. 3.6: Rekombinationsmöglichkeiten der *loxP*-Stellen im „Tragetig“-Konstrukt.

LoxP-Stellen (schwarze Pfeile) flankieren die Exons 2,3 und 4 und die Neomycin-Resistenzkassette. Bei kürzeren Einwirkzeiten des Cre-Rekombinase-Enzyms werden bevorzugt der gefloxt Typ und der, wegen des alleinigen Verbleibs der Resistenzkassette, unbrauchbare Typ gebildet. Längere Transfektionen verschieben das Gleichgewicht zugunsten des konventionellen Knockouts.

Erfolgreich transfizierte Zellen wurden mit Hilfe des Antibiotikums Puromycin selektiert und in 96-Loch-Platten kultiviert. Je Zelllinie konnten 96 Kolonien isoliert und per PCR und Southern Blot charakterisiert werden. Abbildung 3.7 veranschaulicht die verwendete Durchmusterungsstrategie zur Identifizierung der Rekombinationsereignisse.

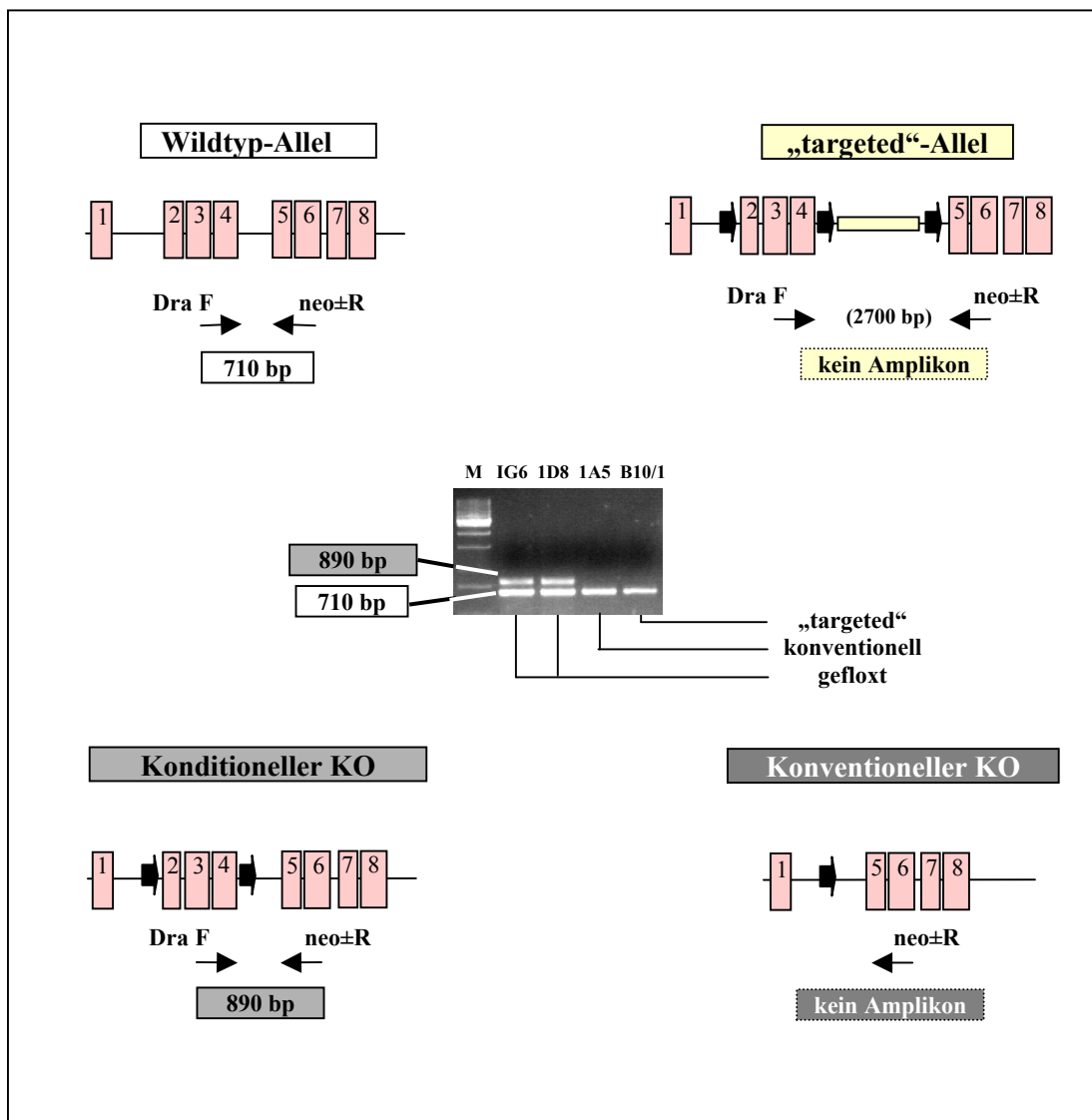


Abb. 3.7: Genotypisierungs-PCR zur Unterscheidung der Rekombinationsereignisse

Oben links ist die genomische Organisation im Wildtyp-Allel dargestellt. Bei Verwendung des Primerpaars DraF/neo±R entsteht ein Fragment von 710 bp. Dieses Fragment wird auf Grund der Heterozygotie bei jedem Klon gebildet. Oben rechts findet sich die Situation vor der Cre-Rekombinase-Reaktion (als „targeted“-Allel bezeichnet). Die Länge der Selektionskassette von 2700 bp verhindert eine Amplifikation unter den gewählten Reaktionsbedingungen. Im Fall vollständiger Exzision (konventioneller Knockout, unten rechts) der Exons 2 bis 4 und der Neomycin-Kassette kann kein Amplikon entstehen, weil der Primer DraF nicht binden kann. Die Fragmentlängen der Produkte des Wildtyp- (710 bp, oben links) und des gefloxten Allels (890 bp, unten links) unterscheiden sich in ihrer Größe durch die Insertion der *loxP*-Sequenz.

Für die Klone B10/1 und C₂₆ konnten jeweils ein gefloxt- und ein konventionell rekombinierter Klon identifiziert werden. Die Analyse der resultierenden Abkömmlinge von Klon BA3 ergab eine Vielzahl gefloxt- und konventionell-rekombinierter Klone, von denen eine Auswahl in Abbildung 3.8 verzeichnet ist. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Klone wurden zur Injektion in Wirtsblastozysten herangezogen. Die Linien für den konventionellen Knockout IIF5, 1A5 und 2F4 leiteten sich aus jeweils einer der drei Ausgangszelllinien ab. Die geflochten Klone IG6 und IIG8 entstammen der Zelllinie BA3.

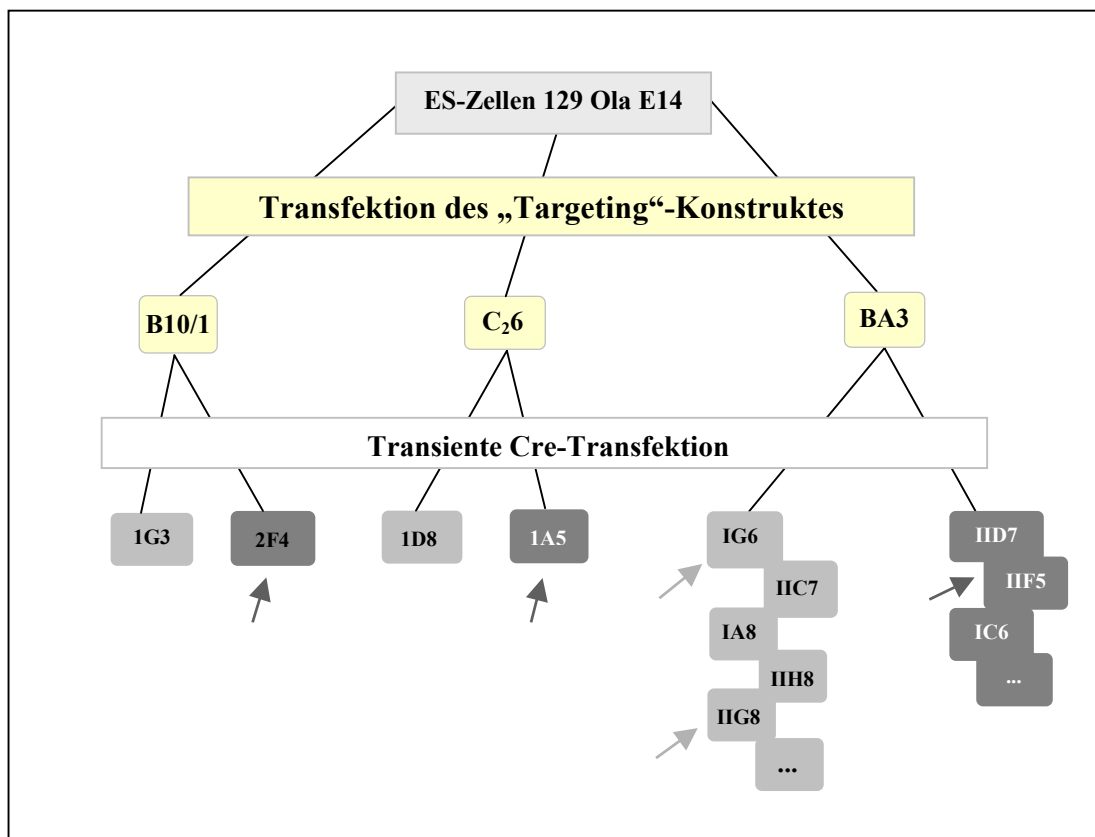


Abb. 3.8: Stammbaum der ES-Zell-Klone

Embryonale Stammzellen (ES) der Zelllinie 129 E14 wurden mit dem „Targeting“-Konstrukt transfiziert. Die drei homolog rekombinierten Klone B10/1, C₂₆ und BA3 dienten der transienten Transfektion mit dem Cre-Enzym-exprimierenden Vektor pCrePAC. Gefloxt-rekombinierte Klone sind hellgrau, konventionell-rekombinierte Klone dunkelgrau dargestellt. Pfeile markieren die zur Herstellung chimärer Mäuse verwendeten Zelllinien.

3.1.5 Die Generierung chimärer Tiere durch Injektion embryonaler Stammzellen in Wirtsblastozysten

Zur Injektion embryonaler Stammzellen in Blastozysten wurden zunächst Zelllinien herangezogen, bei denen durch die Wirkung der Cre-Rekombinase die Exons 2, 3 und 4 bereits exziiert, dh. „ausgeknockt“ waren. Diese Zelllinien dienten der Generierung konventioneller Knockout-Tiere (Tabelle 3.1), denen der Bereich der Exons 2, 3 und 4 vom Beginn ihrer Entwicklung an fehlt.

Zelllinie (konventionell)	injizierte Blastozysten	geborene Jungtiere absolut / (in %)	Anteil Chimären absolut / (in % der Geburten)
1A5	133	23 / (17,3 %)	8 / (35 %)
IIF5	167	13 / (8 %)	3 / (23 %)
2F4	274	43 / (15,7 %)	10 / (23 %)
Gesamt	574	79 (13,8 %)	21 (27 %)

Tab. 3.1: Injektion konventioneller Klone in Wirtsblastozysten.

Die Tabelle gibt die Zahlen (bzw. die Prozentsätze) injizierter Blastozysten, der nach Transfer in den Uterus scheinchwangerer Leihmütter geborenen Jungtiere und den Anteil chimärer Mäuse für jede der drei Zelllinien an.

Die Effizienz der Generierung chimärer Tiere war zufriedenstellend und mit Literaturangaben vergleichbar. Unterschiede zwischen einzelnen Zelllinien kommen in Abhängigkeit von der Vitalität und Kompetenz der Klone, zur Entstehung eines Embryos beizutragen, zustande. Bei der Injektion gefloxt-rekombinierter Zelllinien (Tabelle 3.2) in Blastozysten konnte auf Grund der beim konventionellen Knockout-Modell gesammelten Erfahrungen die Effizienz, mit der Chimärismus erzielt wurde, wesentlich gesteigert werden.

Zelllinie (konditionell)	injizierte Blastozysten	geborene Jungtiere absolut / (in %)	Anteil Chimären absolut / (in % der Geburten)
1G6	65	16 / (25 %)	12 / (75 %)
IIG8	85	4 / (5 %)	4 / (100 %)
Gesamt	150	20 / (13 %)	16 / (80 %)

Tab. 3.2: Injektion gefloxter Klone in Wirtsblastozysten.

Die Tabelle verdeutlicht die Anzahl (bzw. die Prozentsätze) injizierter Blastozysten, der nach Transfer in den Uterus scheinchwangerer Leihmütter geborenen Jungtiere und den Anteil chimärer Mäuse für beide Zelllinien an.

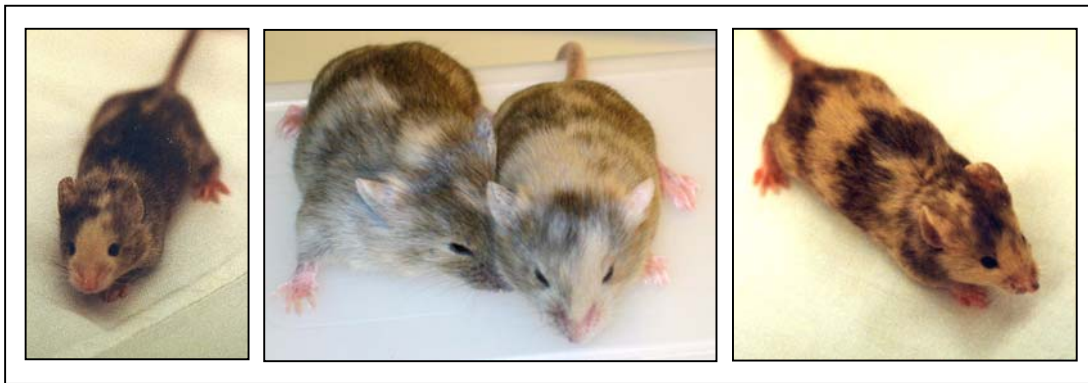


Abb. 3.9: Chimäre Mäuse verschiedener Zelllinien

Erkennbar ist die gefleckte Fellfarbe aus helleren (Mausstamm 129) und aus dunkleren (Mausstamm C57Bl6) Regionen.

Die verwendete embryonale Stammzelllinie wurde ursprünglich aus der Blastozyste eines männlichen Embryos des Mausstammes 129 Ola isoliert. Nach der Injektion dieser embryonalen Stammzellen in Blastozysten des Mausstammes C57/Bl6 entstanden chimäre Tiere, deren Organismus zum einen Teil aus 129 Ola-Stammzellen und zum anderen Teil aus C57/Bl6-Stammzellen hervorgegangen war (Abbildung 3.9). Die Weitergabe der genetischen Veränderung an die Nachkommenschaft konnte nur dann erfolgen, wenn die Keimzellen des Tieres durch Zellen mit dem genetischen Hintergrund 129 Ola (helle Fellfarbe) kolonisiert worden waren. Auf Grund der Verwendung einer männlichen Stammzell-Linie war zudem zu erwarten, dass zum einen mehrheitlich männliche Chimären geboren werden würden und zum anderen wegen der notwendigen Keimbahn-Transmission ausschließlich männliche Chimären in der Lage sein würden, ihre genetische Manipulation an folgende Generationen weiterzugeben. So wurden zwar hin und wieder weibliche Chimären geboren, die Mehrzahl der chimären Tiere war jedoch männlichen Geschlechts. Der Anteil weiblicher Tiere an den ausgewiesenen Chimären betrug nur 10 %.

Zur Analyse der Keimbahntransmission wurden männliche Chimären mit weiblichen C57Bl6 Mäusen (schwarze Fellfarbe) verpaart. Die Fellfarbe der Nachkommen gab Auskunft darüber, ob sich die genetischen Hintergründe der Mausstämme 129 Ola und C57/Bl6 in den Jungtieren vereinigt hatten (d.h. braune Fellfarbe) oder ob auf Grund fehlender Keimbahntransmission keine solche Kreuzung stattgefunden hatte (schwarze Nachkommen). Braune Jungtiere waren im Verhältnis 1:1 entweder Wildtyptiere oder heterozygote Knockout-Tiere. Ihr genetischer Hintergrund bestand zu jeweils 50 % aus 129 Ola und C57/Bl6. Eine Keimbahntransmission fand bei

24 (73 %) der 33 männlichen Chimären statt. Deren Jungtiere wurden mittels Schwanzspitzenbiopsie und PCR genotypisiert. Abbildung 3.10 zeigt, wie durch die gewählten Oligonukleotid-Primer $\Delta\text{Ko F}$, genoWT R und $\Delta\text{Ko R}$ zwischen den einzelnen Genotypen unterschieden werden konnte. Heterozygote Tiere dienten der Generierung von homozygoten Tieren in der F2-Generation, wobei diese eine Vielzahl verschiedener, jedoch vom Genotyp unabhängiger, Fellfarben aufweisen.

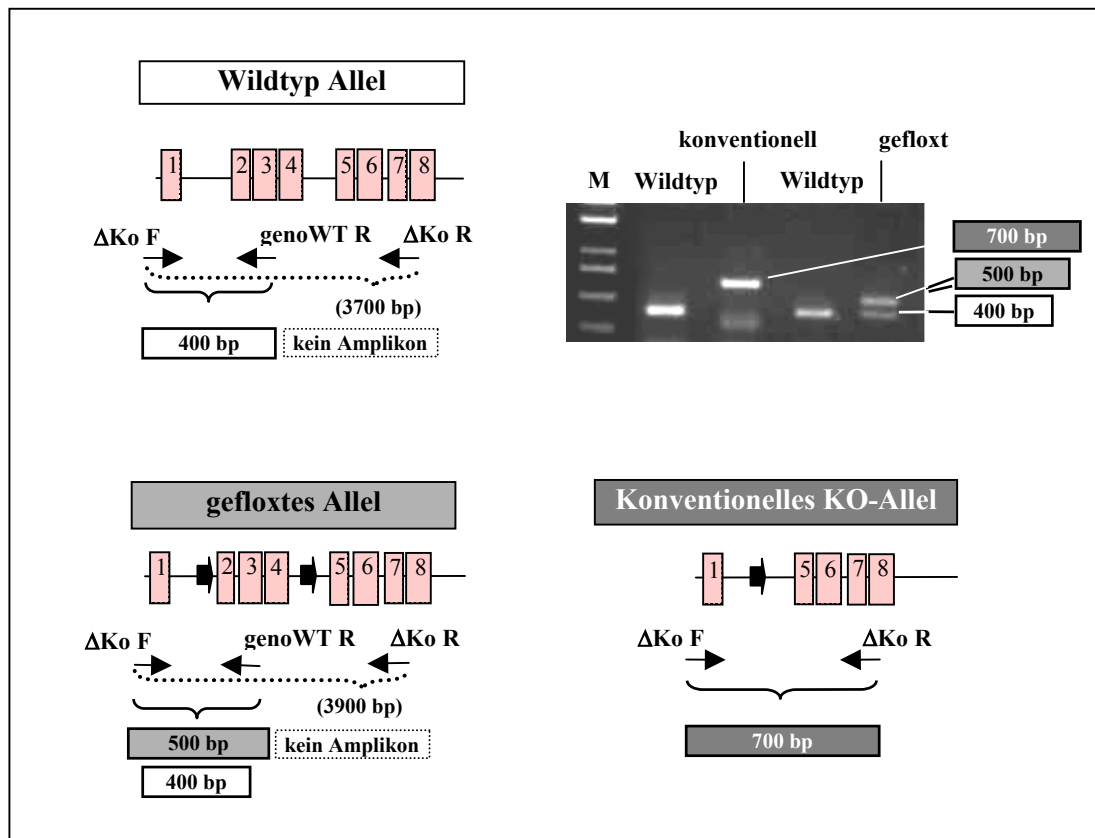


Abb. 3.10: Genotypisierung der F1-/F2-Generation

Die Primerkombination $\Delta\text{Ko F}/\text{genoWT R}/\Delta\text{Ko R}$ erlaubt die Unterscheidung zwischen den verschiedenen Genotypen. $\Delta\text{Ko F}$ und genoWT R gewährleisten die Amplifikation eines 500 bp Fragments (hell-grau) bei geflochten Allelen und eines 400 bp-Fragments (weiß) des Wildtyp-Allels. Das Primerpaar $\Delta\text{Ko F}/\Delta\text{Ko R}$ führt unter den gewählten Reaktionsbedingungen nur beim konventionellen Knockout zur Amplifikation eines 700 bp Fragments (dunkel-grau), das Wildtyp-Fragment kann nicht entstehen, weil das hierfür verwendete Tier homozygot Knockout ist. Geflochte Mäusen weisen den heterozygoten Genotyp auf, daher kann das 400 bp-Fragment auf dem Wildtyp-Allel amplifiziert werden.

Bei sämtlichen im Zuge der Phänotypisierung der Tiere durchgeführten Untersuchungen wurden die Ergebnisse homozygoter Knockout-Tiere der F2-Generation mit denen der jeweiligen Wildtyp-Geschwister verglichen. Diese phänotypischen Untersuchungen sind im Folgenden beschrieben.

3.2 Charakterisierung der MVDP-Knockout-Tiere

Die verfügbaren Informationen über das MVDP-Protein deuten, z.B. auf Grund der Substratspezifität für die toxischen Aldehyde Isocaproaldehyd und 4-Hydroxynonenal (Lefrancois-Martinez *et al.* 1999, Peters-Kottig 2001) darauf hin, dass das Protein eine wichtige Rolle bei Detoxifizierungsprozessen spielen könnte. Störungen solcher Prozesse durch Deletion eines beteiligten Gens könnten die Entwicklungs- und Lebensfähigkeit des Organismus beeinflussen. Zudem wird das Gen bereits während der Embryogenese exprimiert. Die Inaktivierung könnte daher auch negativen Einfluß auf die Entwicklung des Embryos nehmen, wodurch letale Effekte wiederum nicht ausgeschlossen werden können.

Auf Grund der vermuteten Rolle von MVDP und des spezifischen Expressionsmusters des Gens sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowohl ein konventionelles als auch ein konditionelles Knockout-Modell generiert werden. Konventionelle Knockout-Tiere können im Gegensatz zu konditionellen Modellen sofort zu phänotypischen Untersuchungen herangezogen werden. Konditionelle Modelle hingegen entstehen erst als Nachkommen von Verpaarungen mit Mausstämmen, die das Cre-Rekombinase-Enzym gewebspezifisch exprimieren. Nur so kann es zu Deletionen in Cre-Enzym-exprimierenden Geweben kommen. Alle nicht exprimierenden Gewebe und Zelltypen verbleiben dagegen im unveränderten Zustand. Der Effekt der Gen-Deletion kann damit begrenzt auf die interessierenden Gewebe analysiert werden.

In der vorliegenden Arbeit stand der konventionelle Knockout des *Mvdp*-Gens früher als gefloxtete Tiere für Charakterisierungs-Experimente zur Verfügung. Darüber hinaus existierten keine adäquaten Cre-transgenen Mauslinien zur gewebspezifischen Deletion des *Mvdp*-Gens in *Theca interna*-Zellen des *Ovars*. Es wurde daher intensiv versucht, einen geeigneten Promotor zu identifizieren, der die Expression des Cre-Enzyms auf das *Ovar* beschränken würde um selbst eine Cre-transgene Maus herzustellen. Aus diesen Gründen konzentrierten sich die Phänotypisierungsexperimente zunächst auf den konventionellen Knockout. Sie beinhalteten einerseits grundlegende Untersuchungen zur Gen-Deletion auf genomischer, RNA- und Protein-Ebene. Die Bestimmung physiologischer Parameter, Untersuchungen der Funktionsfähigkeit des *Ovars*, der Nebenniere und des *Vas deferens* und die Reaktionen des Organismus auf exogene Stimuli dienten indessen der präzisen Charakterisierung des Mausmodells.

3.2.1 Überprüfung der Gen-Deletion

3.2.1.1 Überprüfung der Gen-Deletion mittels Southern-Analyse

Die genotypische Charakterisierung schließt neben der Polymeraseketten-Reaktion (Abschnitt 3.1.5) auch die Analyse per Southern Blot ein. Die Vorgehensweise und ein exemplarisches Beispiel sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Genomische Leber-DNA von Tieren der F2-Generation wurde zur Überprüfung der homologen Rekombination im 5'-Bereich mit dem Restriktionsenzym *Bgl*II verdaut. Die zur Hybridisierung verwendete Sonde markierte Fragmente der Größen 11 kb (Wildtyp-Allel) und 9 kb (Knockout-Allel). Anhand dieser Fragmentlängen-Differenz konnte die Deletion des genomischen Bereichs der Exons 2 bis 4 nachgewiesen werden. Wildtyptiere zeigen ausschließlich Signale bei einer Fragmentlänge von 11 kb, wohingegen homozygote Knockout-Tiere kleinere Fragmente einer Größe von 9 kb aufweisen. Heterozygote Knockout-Tiere besitzen sowohl das längere Wildtyp-Allel als auch das kürzere Knockout-Allel und sind durch Signale bei 9 und 11 kb identifizierbar.

3.2.1.2 Expressionsanalyse auf Transkriptionsebene

DNA von MVDP-Knockout-Tieren unterscheidet sich von Wildtyp-DNA durch das Fehlen der Exons 2, 3 und 4. Diese genomische Modifikation sollte sich gleichermaßen im Transkript des Gens und auf Translationsebene niederschlagen. Zur Expressionsanalyse des *Mvdp*-Gens auf Transkriptionsebene wurden RT-PCR- und Northern Blot-Analysen herangezogen.

3.2.1.2.1 RT-PCR

mRNA aus dem *Vas deferens* und der Nebenniere wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und dem Primerpaar MVDPsp5/ MVDPsp3 amplifiziert. Abbildung 3.12 verdeutlicht, dass dabei der Bereich des Transkripts detektiert wird, der bei Wildtyp-Tieren vorhanden, bei Knockout-Tieren jedoch deletiert ist.

3.2.1.2.2 Northern Blot

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Transkriptionsaktivität ist das Northern Blotting. RNA wird im denaturierenden Agarose-Gel aufgetrennt, auf eine Nylon-Matrix transferiert und mit einer radioaktiv-markierten Sonde hybridisiert. Die verschiedenen *Mvdp*-Transkripte wurden mit einer *Mvdp*-spezifischen cDNA-Sonde detektiert (zur Verfügung gestellt von Dr. Peters-Kottig, Schering AG, Berlin), die im Bereich der kodierenden Sequenz der Exons 9 -10 hybridisiert.

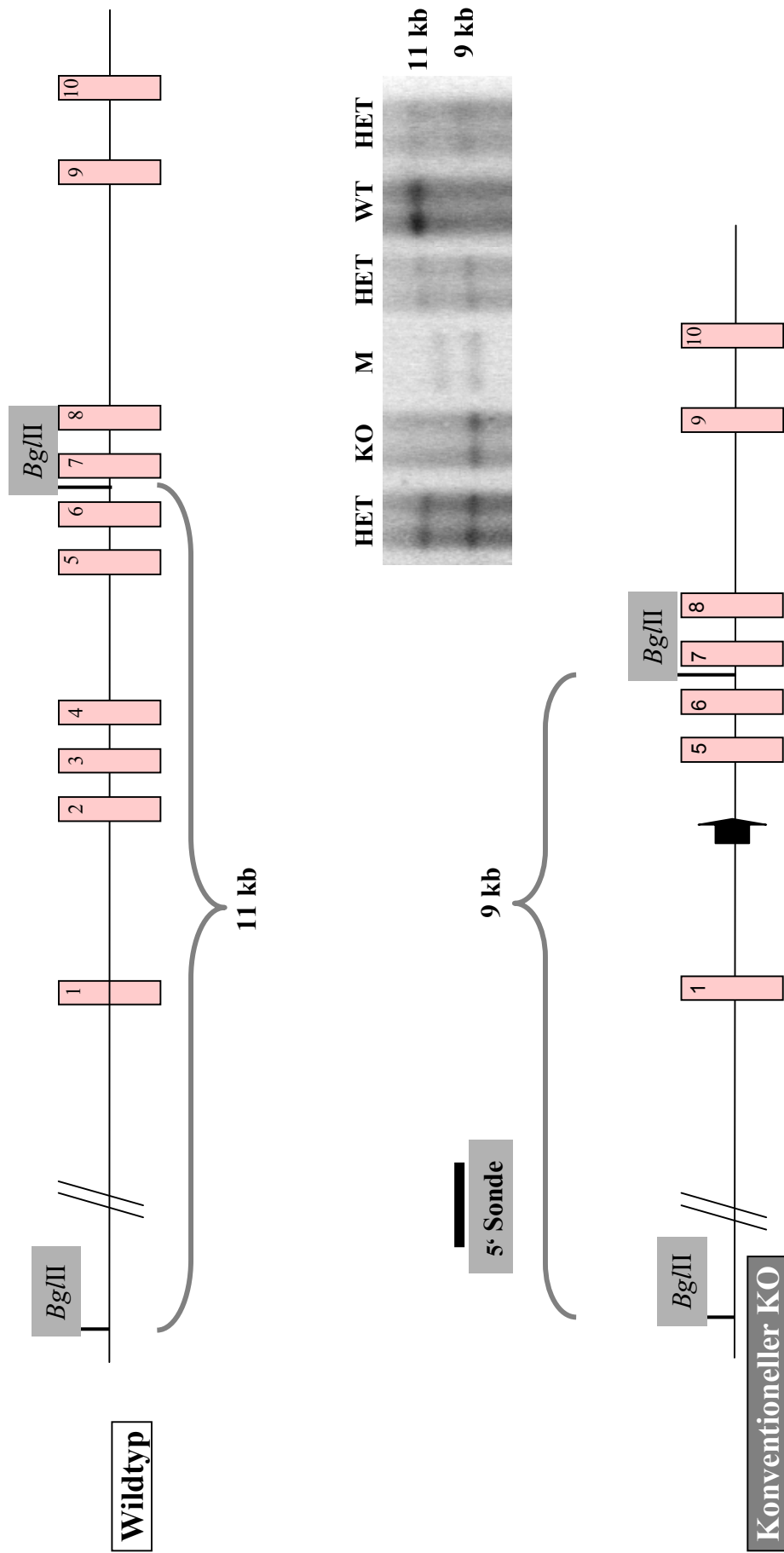


Abb. 3.11: Southern Blot zur Genotypisierung der F2-Generation des konventionellen Knockouts. Genomische DNA wurde mit dem Restriktionsenzymen *Bgl*/II verdaut. Die Hybridisierung mit der spezifischen 5'-Sonde (schwarzer Balken) ergab Signale bei 9 kb und 11 kb, deren Differenz durch die Deletion der drei Exons 2, 3 und 4 begründet ist. Wildtyp-Allele (WT) weisen eine Fragmentgröße von 11 kb, Knockout-Allele (KO) hingegen von 9 kb auf, heterozygote Tiere (HET) sind durch die Existenz beider Allele gekennzeichnet; Molekulargewichtsmarker (M).

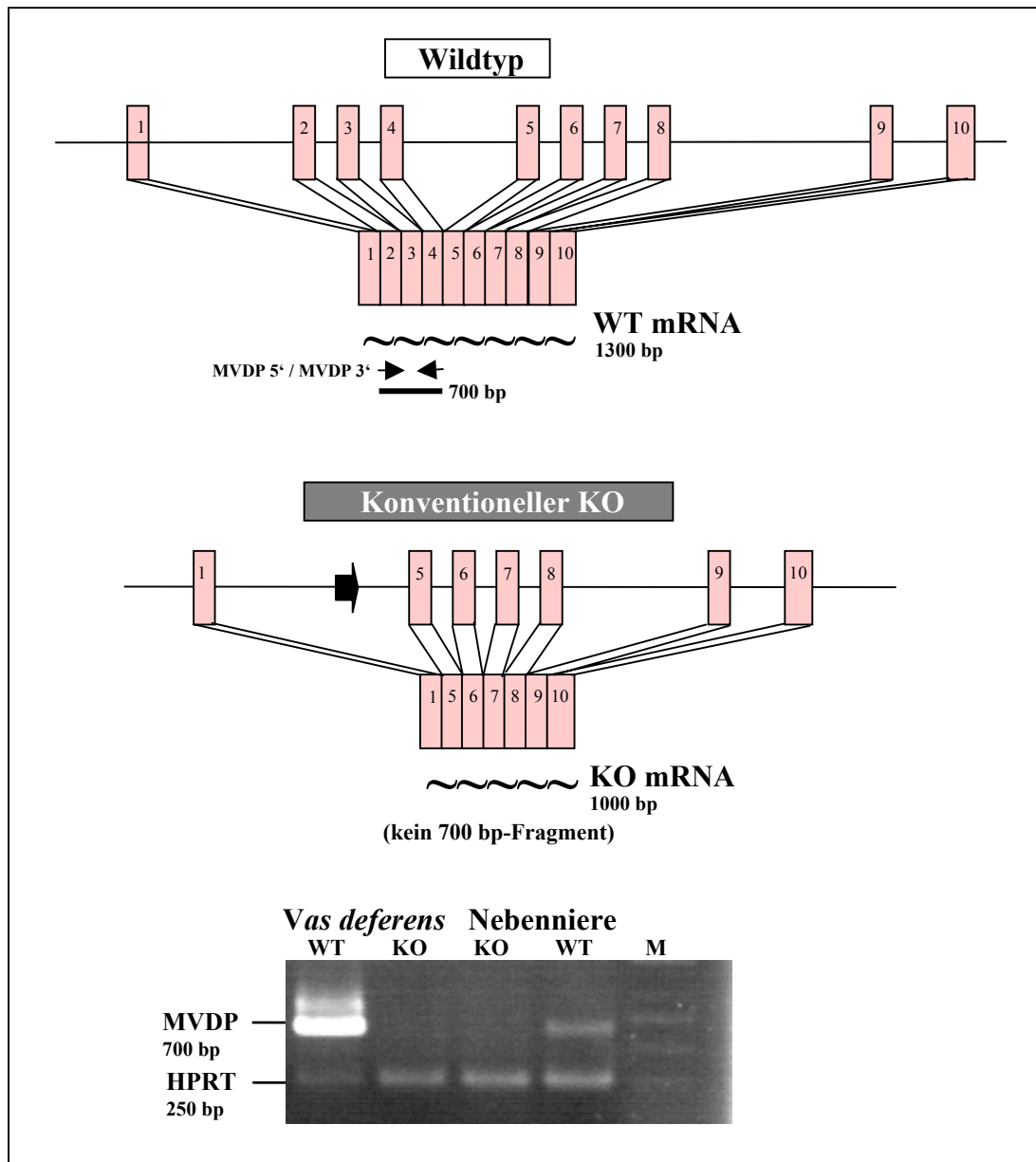


Abb. 3.12: Modifikationen auf Transkriptionsebene und RT-PCR

Dargestellt sind für das Wildtyp- (oben) und das Knockout-Allel (unten) die genomischen Verhältnisse, die Situation nach erfolgtem „Splicing“ der Introns und die daraus resultierenden mRNA (Wellenlinie). Isolierte RNA aus Wildtyp- und Knockout-Tieren wurde mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und mit MVDP-spezifischen Primern (MVDPsp5'/MVDPsp3') amplifiziert. Die Primer binden im Bereich der drei deletierten Exons, wodurch bei Wildtyp-Tieren ein 700 bp-Fragment amplifiziert wird (schwarzer Balken), das bei Knockout-Tieren jedoch nicht entstehen kann. Die gleichzeitige Amplifikation der Transkripte des HPRT-Gens („House Keeping“ Gen, Hypoxanthin-Guanine Phosphoribosyltransferase) erlaubt den Vergleich der Expressionsstärke zwischen den verschiedenen Reaktionsansätzen.

Abbildung 3.13 verdeutlicht zwei Signale unterschiedlicher Größe. Das Größere von beiden repräsentiert das „full length“-Transkript des MVDP-Gens bei Wildtyp-Tieren. Das Fehlen der drei Exons auf genomischer Ebene führt erwartungsgemäß zur Bildung eines verkürzten Transkriptes bei Knockout-Tieren.

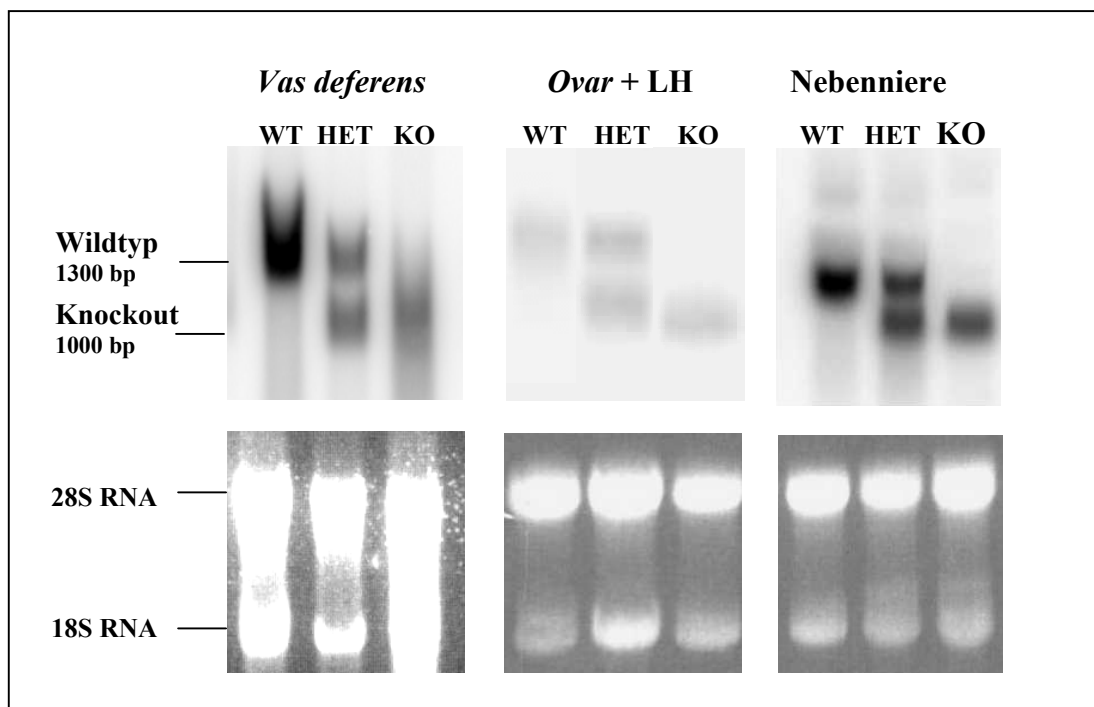


Abb. 3.13: Northern Blot

Isolierte RNA verschiedener MVDP-exprimierender Gewebe wurde mit einer *Mvdp*-spezifischen Sonde detektiert, die mit Sequenzen der Exons 9 und 10 hybridisiert. Im Gegensatz zur RT-PCR, werden hierbei sowohl Wildtyp- als auch Knockout-Transkripte visualisiert, da der detektierte Bereich durch die Deletion nicht betroffen ist. Im *Ovar* erfolgt die *Mvdp*-Expression nur nach Induktion durch Luteinisierendes Hormon (LH). Im unteren Teil der Abbildung finden sich als Ladekontrolle die 28S und 18S RNA. Abb. 3.12 stellt die Bildung der verschiedenen Transkripte schematisch dar.

3.2.1.3 Expressionsanalyse auf Proteinebene

Von größtem Interesse bei der Grundcharakterisierung einer Knockout-Maus ist, ob sich die genetische Modifikation auf DNA-Ebene letztendlich auch auf Proteinebene niederschlägt. Die Deletion des Translations-Startkodons ist in dieser Hinsicht die sicherste Variante. Sie birgt jedoch die Gefahr, auf Grund potentiell vorhandener alternativer Translationsstartpunkte, die Genexpression nicht vollständig verhindern zu können. Das *Mvdp*-Gen sollte durch Deletion der Regionen inaktiviert werden, welche wichtige Funktionen des Proteins kodieren, wobei jedoch keine Verschiebung des Leserasters entstand. Abbildung 3.14 verdeutlicht die Lokalisation des Deletionsbereichs und der Region, die vom verwendeten Antikörper erkannt wird, im Vergleich zwischen Wildtyp- und putativem Knockout-Protein. Der verwendete polyklonale MVDP-Antikörper (zur Verfügung gestellt, Schering AG, Berlin) erkennt ein Epitop, das im Knockout-Protein fehlt. Knockout-Tiere zeigen daher im Western Blot, der in Abbildung 3.15 gezeigt ist, keine Signale.

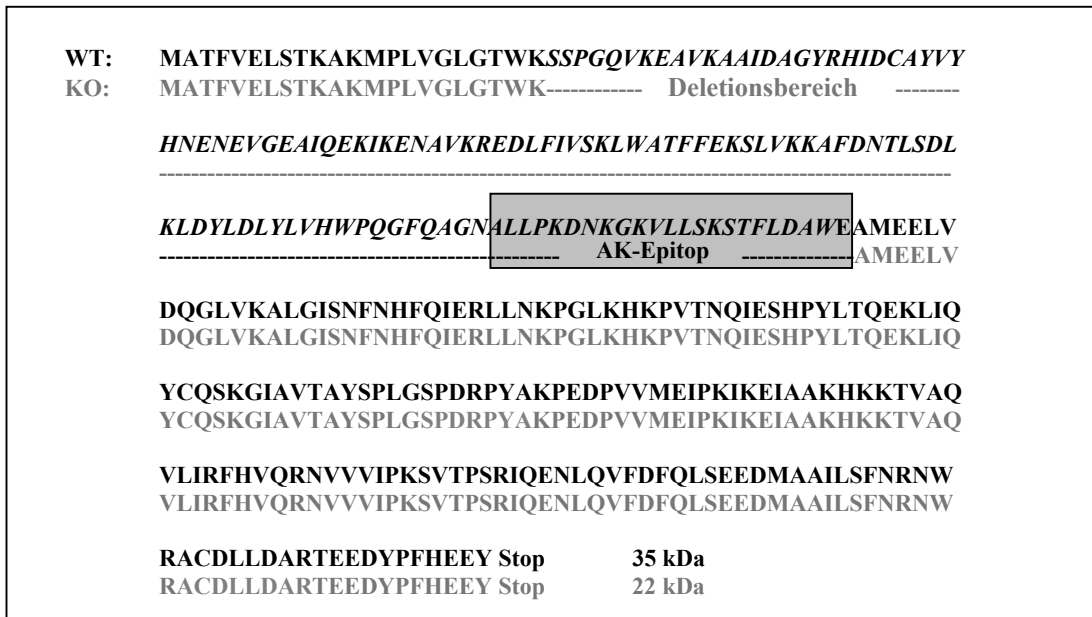


Abb. 3.14: Schematische Darstellung des Wildtyp- und des deletierten Knockout-Proteins
 Dargestellt sind beide Proteinsequenzen (Wildtyp = schwarz, obere Sequenz; Knockout = grau, untere Sequenz). Gekennzeichnet sind der Deletionsbereich beim MVDP-Knockout-Protein und die Aminosäure-Reste des Antikörper (AK)-Epitops (grau unterlegt).

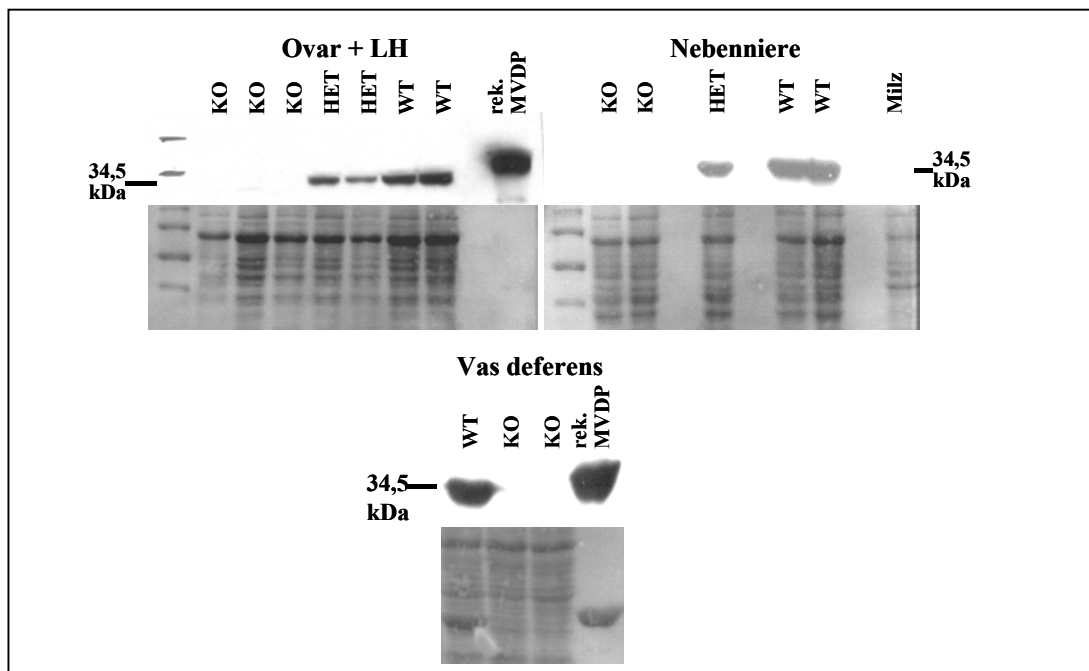


Abb. 3.15: Western Blot
 Dargestellt sind Western Blots verschiedener MVDP-expimierender Gewebe (*Ovar* nach LH-Gabe, *Nebenniere* und *Vas deferens*). Sie zeigen, dass mit dem verwendeten rekombinanten Antikörper bei Knockout-Tieren (KO) kein MVDP-Protein nachweisbar ist. Hingegen kann MVDP bei heterozygoten (HET) und bei Wildtyp-Tieren (WT) detektiert werden. Das Protein weist eine Größe von 34,5 kDa auf, als positive Kontrolle ist rekombinantes MVDP, als negative Kontrolle Proteinextrakt aus der Milz aufgetragen. Unter den jeweiligen Western Blots finden sich als Ladekontrolle die Ponceaufärbten Gesamtproteinmengen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Analyse der genetischen Manipulation auf genomischer Ebene (Southern Blot und PCR) und der daraus resultierenden Veränderungen des Genproduktes auf Transkriptions- (RT-PCR und Northern Blot) und Translationsebene (Western Blot) gezeigt werden konnte, dass die angestrebte Deletion der vermutlich funktionell-essentiellen Region erfolgreich durchgeführt wurde. Nachweislich wird bei MVDP-Knockout-Mäusen ein im Vergleich zum Wildtyp-Gen verkürztes Transkript gebildet. Das MVDP-Protein ist bei Knockout-Tieren weder im *Ovar*, im *Vas deferens* noch in der Nebenniere nachweisbar.

3.2.2 Bestimmung grundlegender physiologischer Parameter

Die Generierung von Mausmodellen, bei denen Gene oder Teile von Genen deletiert sind, birgt vor allem beim konventionellen Knockout von Genen, die bereits während der Embryonalentwicklung exprimiert werden, die Gefahr, dass die Lebensfähigkeit der genetisch veränderten Nachkommen *in utero* oder *post partum* vermindert ist. Es stellte sich daher zunächst die Frage, inwiefern die Lebensfähigkeit der konventionellen Knockout-Tiere in dieser Entwicklungsphase beeinträchtigt ist. Dazu wurde untersucht, ob sich die Genotypen der Jungtiere der F2-Generation nach Mendel'schen Regeln aufspalten. Abweichungen vom 1:2:1 Verhältnis zwischen Wildtyp-, heterozygoten Knockout- und homozygoten Knockout-Tieren lassen letale Effekte der Gendeletion vermuten.

Für keine der zur Generierung der konventionellen Knockout-Tiere herangezogenen Zelllinien konnten Abweichungen von Mendel'schen Vererbungsmustern festgestellt werden. Exemplarisch soll in Tabelle 3.3 die genotypische Verteilung der Jungtiere einer der drei verwendeten Zelllinien dargestellt werden.

	Homozygot-Knockout	Heterozygot-Knockout	Wildtyp-Tiere	Chi ² -Test
Tierzahl Weibchen	50	96	51	p=0,93
Tierzahl Männchen	53	106	49	p=0,89

Tab. 3.3: Genotyp-Häufigkeiten unter den Jungtieren einer der drei Zelllinien.

Wildtyp-, heterozygote und homozygote Tiere treten mit nach Mendel'schem Vererbungsmuster (1:2:1) erwarteten Verteilungshäufigkeiten auf. Das Ergebnis des Chi²-Tests mit einem Freiheitsgrad von 1 ergab sowohl für männliche als auch für weibliche Tiere p-Werte größer als 0,05.

Homozygote Tiere des konventionellen Knockout-Modells sind damit bewiesenermaßen lebensfähig und werden mit den erwarteten Häufigkeiten geboren. Auf Grund dieses Ergebnisses schienen Entwicklungsstörungen oder akute lebensbedrohliche Zustände ausgeschlossen. Die geborenen Jungtiere wiesen keine äußerlich erkennbaren, pathologischen Veränderungen oder Krankheitszeichen auf und entwickelten sich zunächst normal.

3.2.2.1 Histologie

Histologische Untersuchungen dienten der Beantwortung der Frage, ob die Deletion des *Mvdp*-Gens in den endogen MVDP-exprimierenden oder in mit diesen in Zusammenhang stehenden Organen zu morphologischen Veränderungen führen könnte. Sie schlossen daher neben den MVDP-exprimierenden Organen *Ovar*, Nebenniere und *Vas deferens* auch den Hoden, Nebenhoden und die Adenohypophyse ein. Begutachtet wurden Tiere unterschiedlicher Altersgruppen, d.h. immature, mature und seneszente Tiere.

Abbildung 3.16 zeigt exemplarisch HE-gefärbte Paraffinschnitte dieser Organe. Die Ovarien von Knockout-Tieren wiesen keine augenscheinlichen Unterschiede zu Wildtyp-Organen und keine erkennbaren pathologischen Veränderungen auf. Es konnten Follikel verschiedener Reifegrade, einschließlich sprungreifer Follikel, *Corpora lutea* und *Corpora albicans* beobachtet werden. Da sich letztere erst nach dem Eisprung aus dem zurückbleibenden Follikelrest, den *Granulosa*- und *Theca*-Zellen, herausbilden, ist unstrittig, dass Eisprünge stattgefunden hatten. Sie sind ein Hinweis darauf, dass Störungen des Ovulationsprozesses bei MVDP-Knockout-Weibchen nicht vorzuliegen scheinen.

Bei männlichen Tieren wurden das *Vas deferens*, der Testis und die *Epididymis* untersucht. Die Gewebeschnitte der Knockout-Tiere sind in Abbildung 3.16 und 3.17 exemplarisch zu sehen und wiesen im Vergleich zu Wildtyp-Organen keine morphologischen oder pathologischen Besonderheiten auf. Das Epithel des Samenleiters und die umliegenden Muskelschichten blieben ohne Befund. In den Hoden- und Nebenhoden-Kanälchen und im *Vas deferens* konnten Spermien beobachtet werden.

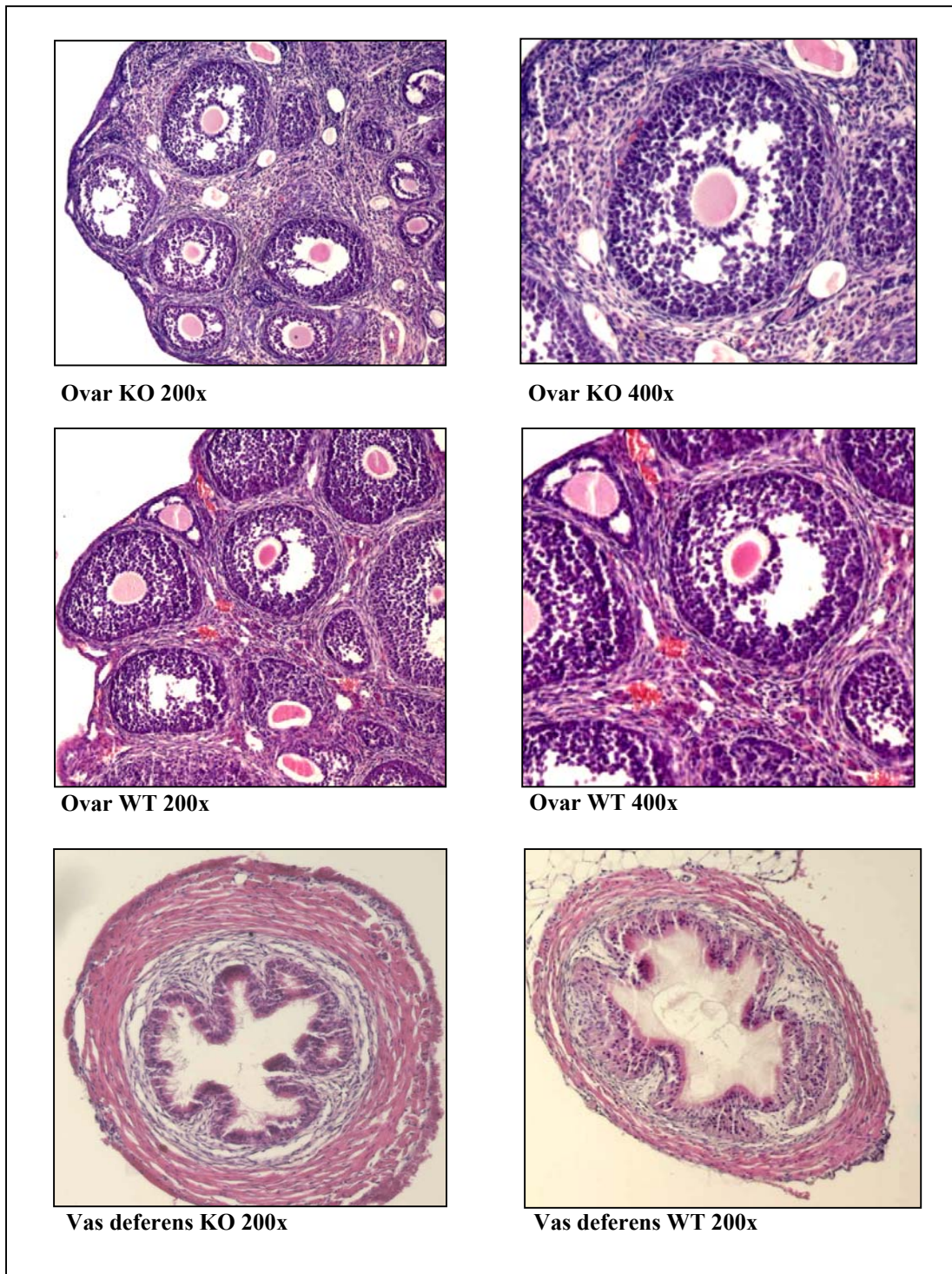


Abb. 3.16: Histologische Schnitte vom *Ovar* und *Vas deferens*

Abgebildet sind HE gefärbte Paraffinschnitte (5 μ m) vom *Ovar* weiblicher Tiere (Wildtyp: WT; Knockout:KO) und vom *Vas deferens* männlicher Tiere. Histologische Auffälligkeiten konnten nicht beobachtet werden.

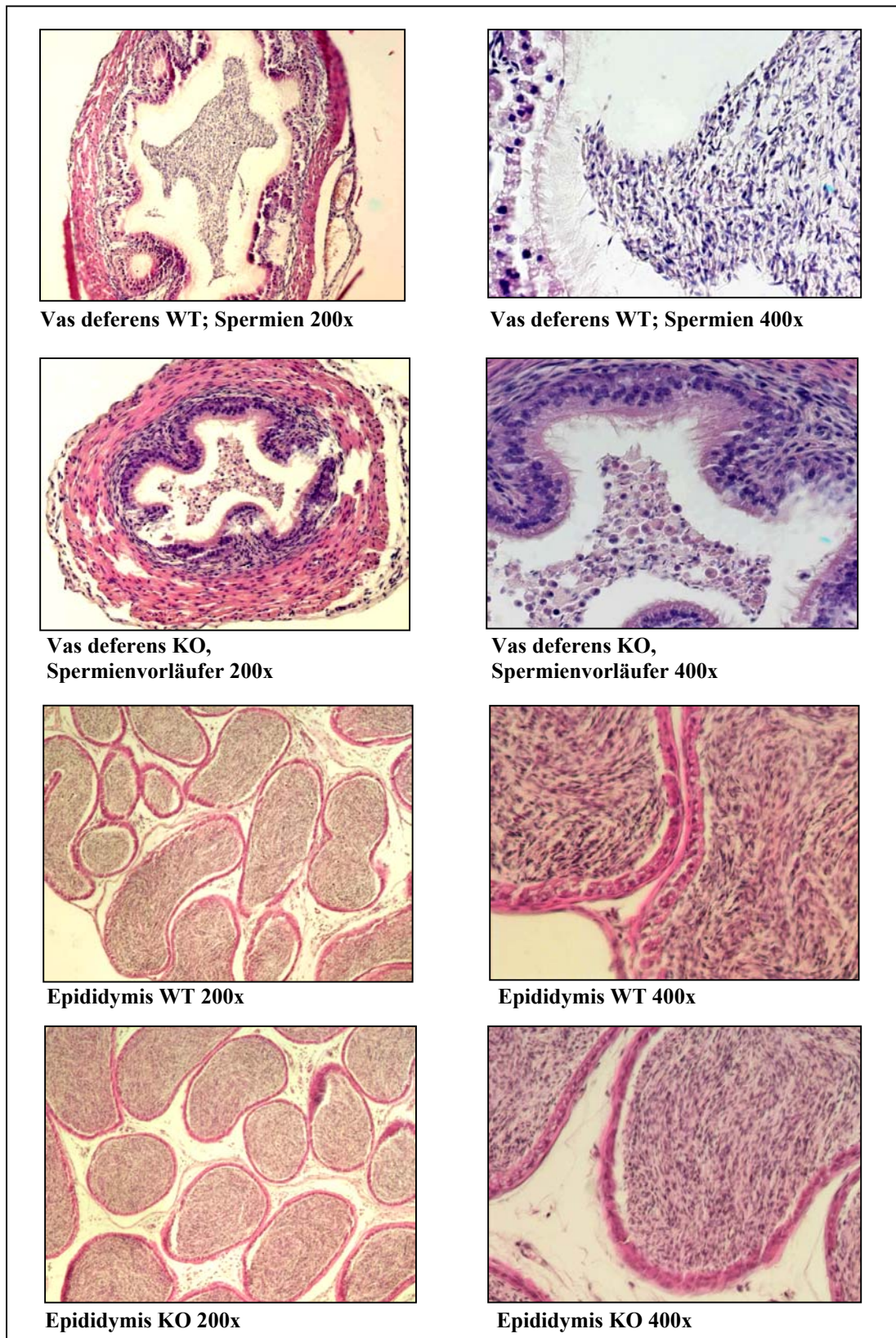


Abb. 3.17: Histologische Schnitte vom *Vas deferens* und Nebenhoden

Abgebildet sind HE gefärbte Schnitte vom *Vas deferens* männlicher Tiere mit im Lumen befindlichen Spermien. Das Knockout-Tier (KO) weist hier eine große Anzahl Spermiovorläuferzellen auf. Der Befund ist jedoch nicht repräsentativ für alle Knockout-Tiere, sondern trat nur vereinzelt auf. Im unteren Teil sind histologische Schnitte von der *Epididymis* dargestellt. Wildtyp (WT). Histologische Auffälligkeiten konnten nicht beobachtet werden.

Bei weiblichen wie männlichen Tieren wurden Gewebeschnitte der Nebennieren untersucht (Abbildung 3.18). Histologisch konnten dabei keine Anomalien festgestellt werden. Die *Medulla* und die Rindenschichten erschienen morphologisch wie funktionell unverändert. Lediglich die Schichtdickenverhältnisse deuteten auf einen möglichen Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren hin. Aus diesem Grund wurde eine morphometrische Analyse der Nebennieren-Kompartimente durchgeführt, die im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

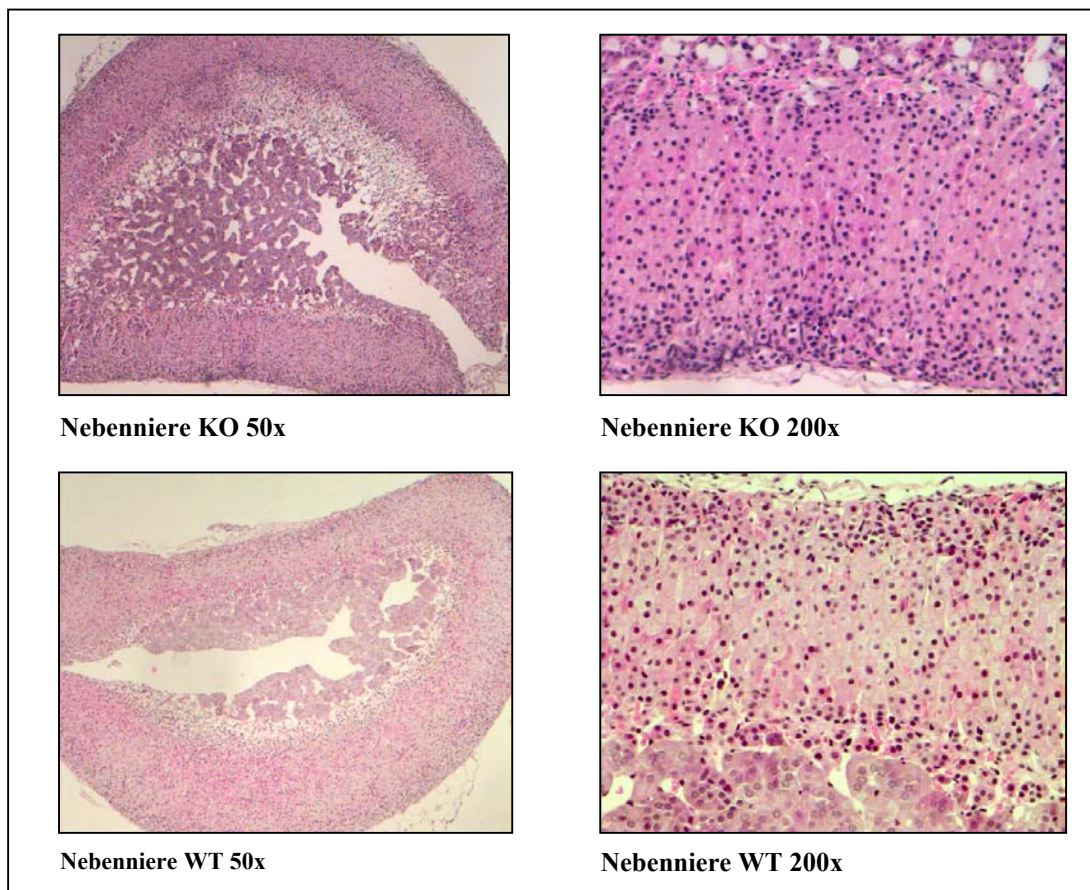


Abb. 3.18: Histologische Schnitte der Nebennieren

Dargestellt sind HE-gefärbte Paraffinschnitte (5µm) von Nebennieren weiblicher Tiere. Wildtyp (WT) und Knockout (KO)

Die histologischen Schnitte der verschiedenen Reproduktionsorgane, der Nebennieren, der Milz und Hypophyse wurden Dr. Rainer Ernst (Schering AG, Berlin) zur weitergehenden Begutachtung vorgelegt. Einige der Nebennierenpräparate von Knockout-Tieren zeigten Infiltrationen durch Lymphozyten; ein auch bei Wildtyp-Mäusen häufiger zu beobachtendes Erscheinungsbild, das nicht im Zusammenhang mit der Deletion des *Mvdp*-Gens zu stehen scheint. Zusammenfassend ließen sich anhand der histologischen Präparate keine Pathologien feststellen.

3.2.2.2 Morphometrie

MVDP wird in der *Zona fasciculata* der Nebennierenrinde stark exprimiert. In den beiden benachbarten Zellschichten der *Zona glomerulosa* und der *Zona reticularis* findet sich dieses Protein nicht (Abbildung 1.2 Einleitung). Angesichts dieser scharf abgegrenzten Expression stellte sich die Frage, ob durch das Fehlen des MVDP-Proteins in der *Zona fasciculata* morphologische Veränderungen der Nebenniere hervorgerufen werden. Wie im vorangegangenen Abschnitt bereits erwähnt, konnten bei Knockout-Tieren keine Auffälligkeiten hinsichtlich der histologischen Architektur dieses Organs identifiziert werden. Veränderungen der Proportionen der einzelnen Zellschichten innerhalb des Organs wurden mit Hilfe morphometrischer Messungen der Nebennieren von weiblichen und männlichen Tieren im Alter von 3-4 bzw. 5-6 Monaten registriert. Ausgewählt wurde der Paraffinschnitt eines jeden Organs, der den größten Durchmesser aufwies. Die Flächenausmaße der einzelnen Schichten wurden blind bestimmt und nachfolgend zwischen den Gruppen verglichen. Vorgehensweise und Ergebnisse der Analyse sind in den Abbildungen 3.19, 3.20 und 3.21 dargestellt.

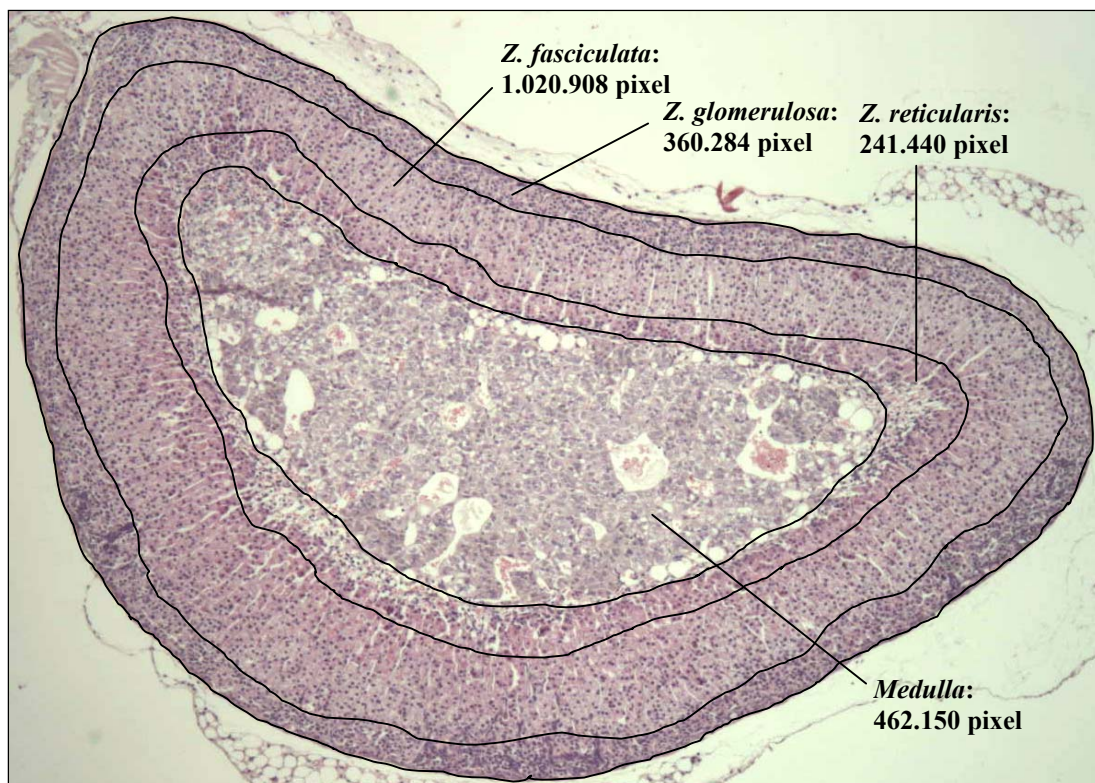


Abb. 3.19: Nebennieren-Morphometrie: Verfahrensweise.

HE-gefärbte Paraffinschnitte des jeweils größten Durchmessers eines Organs wurden zur Vermessung herangezogen. Die verschiedenen Rindenschichten wurden mit Hilfe des Programmes AxioVision 3.1 (Carl Zeiss Vision GmbH) umrandet und ihre Flächenmaße in pixel bestimmt.

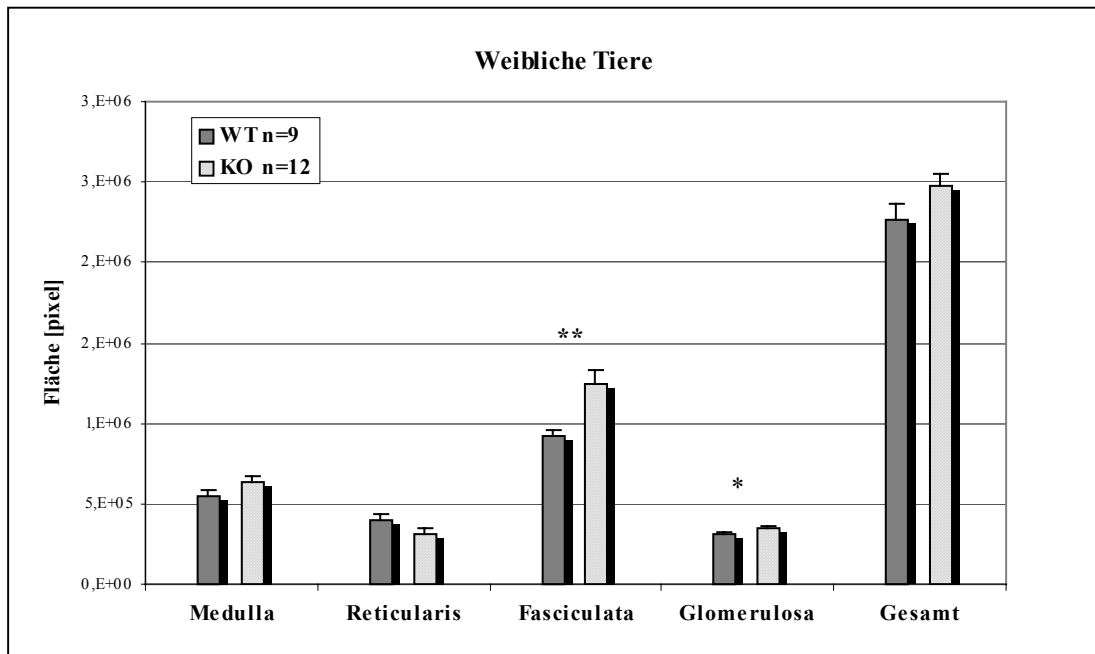


Abb. 3.20: Nebennieren-Morphometrie weiblicher Tiere

Dargestellt sind die Größenverhältnisse der Nebennieren-Rindenschichten bzw. der Gesamtflächen von Wildtyp- bzw. Knockout-Tieren. Signifikante Unterschiede; (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, SEM und Gruppengröße (n) im Diagramm verzeichnet) zeigten sich zwischen den Flächen der *Zona fasciculata* und der *Zona glomerulosa*. Alter der Tiere: 3-4 Monate.

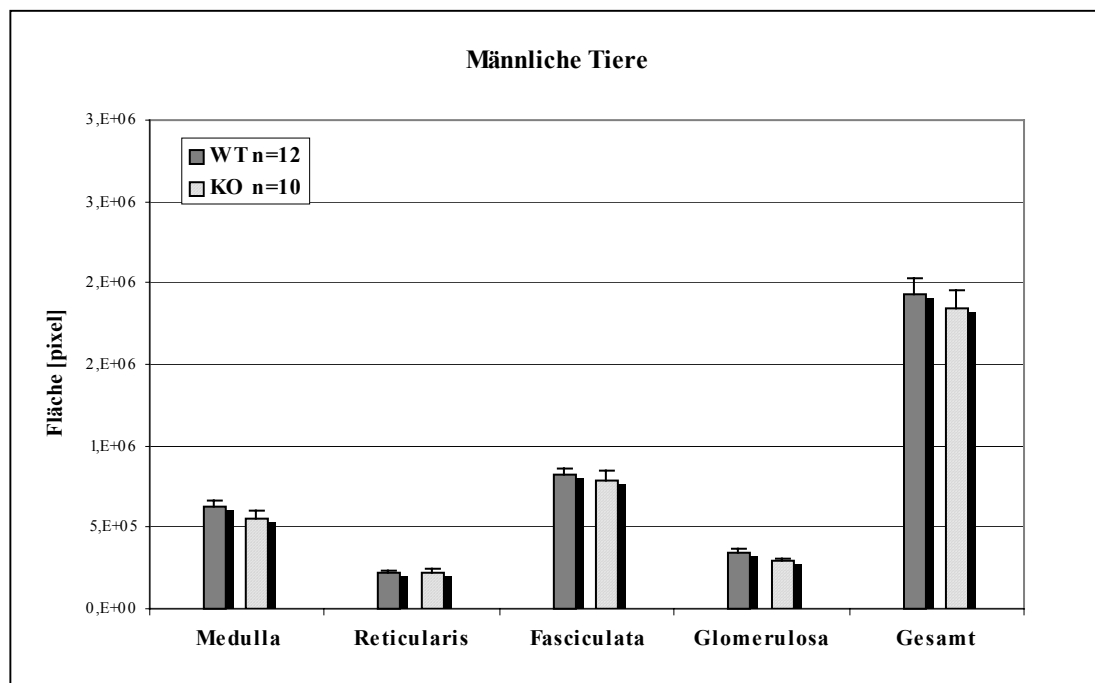


Abb. 3.21: Nebennieren-Morphometrie männlicher Tiere

Dargestellt sind die Größenverhältnisse der Nebennieren-Rindenschichten bzw. der Gesamtflächen von Wildtyp- bzw. Knockout-Tieren. Signifikante Unterschiede konnten bei Männchen nicht festgestellt werden. (SEM und Gruppengröße (n) im Diagramm verzeichnet). Alter der Tiere: 5-6 Monate.

Der Vergleich der gemittelten Flächenmaße zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren machte deutlich, dass weibliche Knockout-Mäuse anders als männliche Tiere signifikante Vergrößerungen der beiden äußersten Rindenschichten *Zona fasciculata* und *Zona glomerulosa* aufweisen. Die Verbreiterung dieser Schichten beträgt durchschnittlich 30 % für die MVDP endogen exprimierende *Zona fasciculata* und weniger als 10 % für die *Zona glomerulosa*. Die Deletion des *Mvdp*-Gens scheint daher bei weiblichen Mäusen für die signifikante Vergrößerung der *Zona fasciculata* verantwortlich zu sein.

Die Nebenniere erfüllt als sekretorisches Organ eine Reihe wichtiger Funktionen. Ihre morphologische Unterteilung in die *Medulla* und in Rindenzonen trennt zugleich unterschiedliche steroidogene Aktivitäten, welche ihre Bedeutung bei verschiedenen physiologischen Prozessen begründen. So spielen allein die von der *Zona fasciculata* gebildeten Glukocorticoide eine wichtige Rolle bei z.B. inflammatorischen und metabolischen Prozessen und bei Stressreaktionen. Die folgenden Experimente dienten daher der Analyse der verschiedenen Nebennieren-Funktionen. Inwiefern sich die Verbreiterung der Cortexschichten auch auf das Nebennieren-Gewicht auswirkt, sollte z.B. durch Bestimmung der Organgewichte geklärt werden.

3.2.2.3 Organgewichte

Im Zuge der Organpräparationen wurde das Feuchtgewicht verschiedener Reproduktionsorgane bestimmt, um eventuelle Größenveränderungen der inneren Organe festzustellen. Dabei wurde besonders bei sehr kleinen Organen, wie den Nebennieren und den Ovarien darauf geachtet, dass keine Gewichtsverluste durch Austrocknung entstanden, und dass die Organe von umliegendem Fettgewebe komplett befreit wurden. Durch den Vergleich der Organgewichte der Versuchsgruppen untereinander konnten, wie in den Abbildungen 3.22 und 3.23 dargestellt, keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

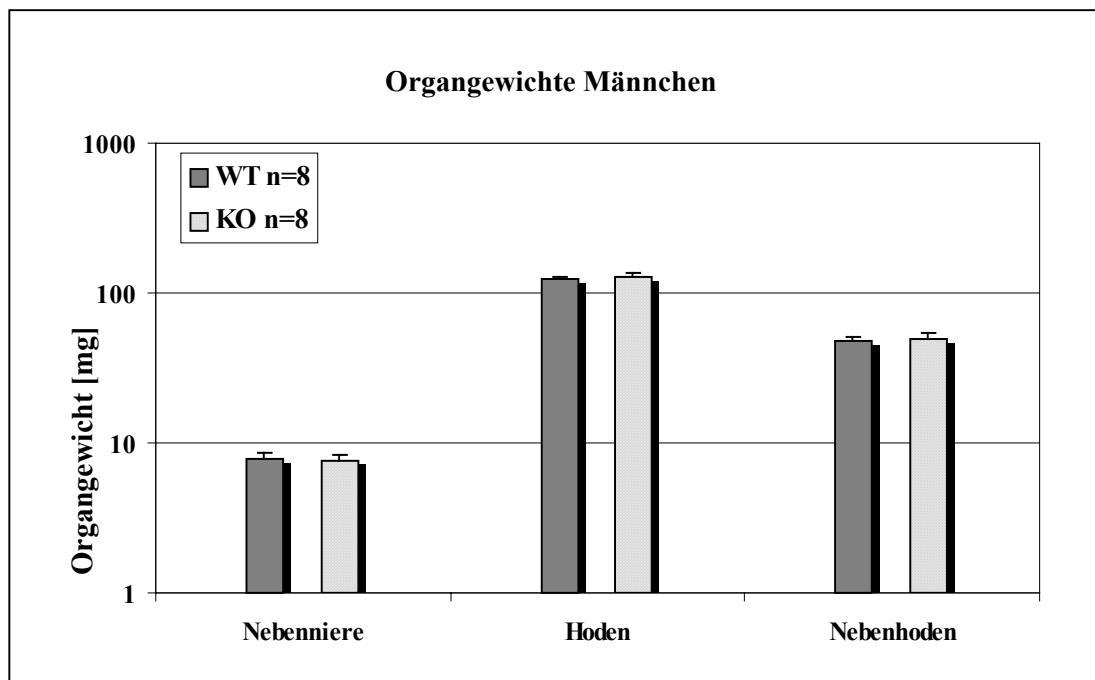


Abb. 3.22: Feuchtorgangewichte männlicher Mäuse im Vergleich.

Die Organgewichte der Nebennieren (bilateral), der Hoden (unilateral) und des Nebenhodens (unilateral) sind jeweils im Vergleich zwischen Wildtyp- (WT) und Knockout-(KO) Tieren logarhythmisch dargestellt. ($p > 0,05$; SEM und Gruppengrößen (n) sind in der Legende angegeben). Die Versuchstiere entstammten einheitlichen Altersgruppen (5-6 Monate).

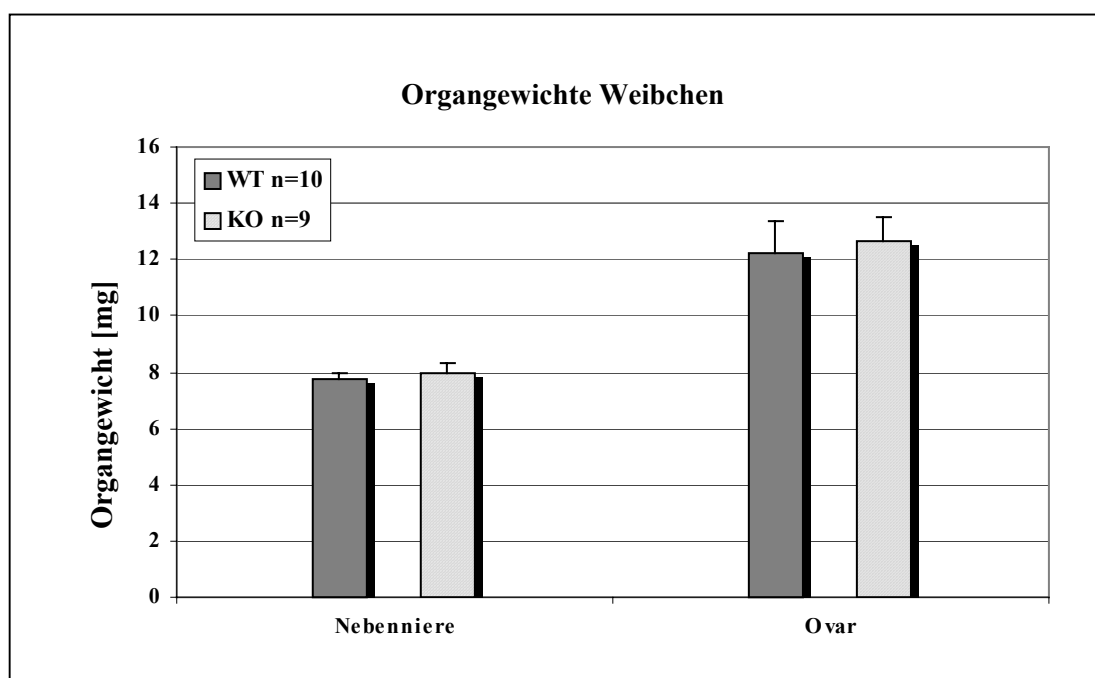


Abb. 3.23: Feuchtorgangewichte weiblicher Mäuse im Vergleich.

Die Organgewichte der Nebennieren (bilateral) und der Ovarien (bilateral) sind jeweils im Vergleich zwischen Wildtyp- (WT) und Knockout-(KO) Tieren dargestellt. ($p > 0,05$; SEM und Gruppengrößen (n) sind in der Legende angegeben). Die Versuchstiere entstammten einheitlichen Altersgruppen (3-4 Monate).

Die Analyse Organgewichte ergab, dass der Knockout des *Mvdp*-Gens keine signifikanten Veränderungen der Organgewichte von Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren verursacht. Die Verbreiterung des Nebennieren-Cortex weiblicher Knockout-Tiere findet daher keine Entsprechung in einem messbaren Gewichtszuwachs der Nebennieren.

3.2.2.4 Körpergewichtsentwicklung

Zur Untersuchung möglicher metabolischer Effekte des MVDP-Proteins wurden im Rahmen der Grundcharakterisierung Körpergewichtsbestimmungen der Tiere ab einem Alter von 36 Tagen (Weibchen) bzw. 65 Tagen (Männchen) durchgeführt. Die mittleren Körpergewichte von Knockout- und Wildtyp-Tieren glichen einander zu Beginn der Messungen. Daher wurde auf die vergleichende Gewichtsbestimmung jüngerer Tiere verzichtet. Im Verlauf von rund 120 Tagen entwickelten sich die Körpergewichte der Versuchsgruppen signifikant unterschiedlich. Die Abbildungen 3.24 und 3.25 zeigen die Gewichtsentwicklung der Tiere im Verlauf der Zeit. Knockout-Weibchen wogen im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern etwa 19 % mehr. Die absolute Gewichtszunahme war etwa doppelt so hoch wie bei Wildtyp-Tieren. Männliche Tiere wiesen gerade entgegengesetzte Verhältnisse auf. Knockout-Männchen sind signifikant leichter (18 %) als ihre Wildtyp-Geschwister.

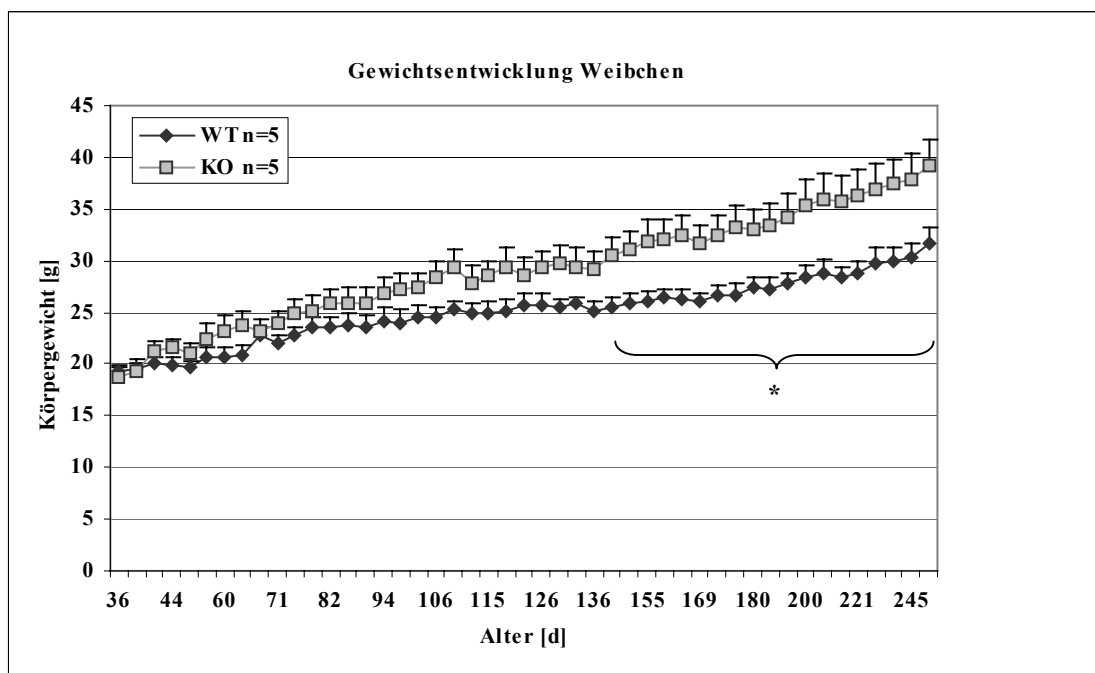


Abb. 3.24: Gewichtsentwicklung weiblicher Tiere im Vergleich.

Signifikante Unterschiede (* $p < 0,05$), SEM und Gruppengrößen (n) sind im Diagramm verzeichnet.

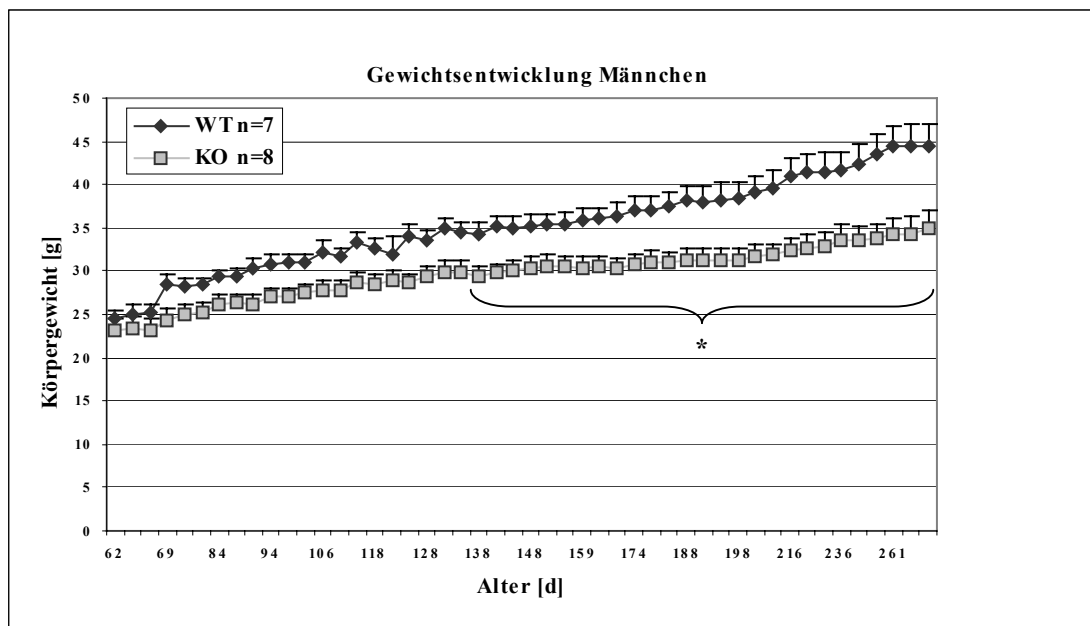


Abb. 3.25: Gewichtsentwicklung männlicher Tiere im Vergleich.

Signifikante Unterschiede (* $p < 0,05$), SEM und Gruppengrößen (n) sind im Diagramm verzeichnet.

Knockout-Männchen weisen ab einem Alter von circa 19 Wochen ein signifikant kleineres Körpergewicht auf als ihre männlichen Wildtyp-Geschwister. Bei weiblichen Tieren sind genau umgekehrte Verhältnisse erkennbar. Hier findet sich eine signifikante Erhöhung des Körpergewichtes bei Knockout-Tieren. Die Deletion des *Mvdp*-Gens hat daher in Abhängigkeit vom Geschlecht unterschiedliche Auswirkungen auf die Entwicklung des Körpergewichtes, so dass Veränderungen der Nebennierenfunktion hinsichtlich ihrer metabolischen Wirkungen anzunehmen sind.

3.2.2.5 Konzentrationsbestimmung verschiedener Steroidhormone

Das Expressionsmuster von MVDP in *Theca*-Zellen des *Ovars* und in der *Zona fasciculata* der Nebenniere und seine Substratspezifität für ein Nebenprodukt der Steroidbiosynthese weisen auf eine essentielle Bedeutung des Enzyms bei Steroidhormon-Synthesen der genannten Organe hin. Um eventuell vorhandene Veränderungen der Hormonwerte zu identifizieren, wurde aus der *Vena cava* final Blut abgenommen. Das gewonnene Serum diente mittels Radioimmunoassay der Bestimmung der Hormone Corticosteron, Progesteron, Östradiol und Testosteron bei weiblichen Tieren und Corticosteron und Testosteron bei männlichen Tieren. Zur Vermeidung endogener Hormonschwankungen durch den murinen Östruszyklus wurden sämtliche weiblichen Tiere zuvor über mehrere Wochen einer Zyklusstadien-Bestimmung unterzogen. Zum Zeitpunkt der Blutabnahme befanden sie sich im auf den Östrus folgenden Metöstrus. Die Meßwerte bei der Bestimmung von Estradiol

lagen für beide weiblichen Versuchsgruppen unterhalb des Nachweisbereichs und konnten nicht wiederholt bestimmt werden.

3.2.2.5.1 Corticosteron

Die murine Nebenniere produziert im Gegensatz zur humanen Nebenniere in der *Zona fasciculata* als das Haupt-Glukocorticoid nicht Cortisol sondern Corticosteron. Dieses Hormon vermittelt eine erhöhte Resistenz gegenüber Stresseinflüssen und bewahrt den Organismus so vor überschießenden Reaktionen. Es übt zudem Wirkungen, wie die Suppression der zellvermittelten Immunantwort oder die Induktion von Leberenzymen zur Gluconeogenese aus und begünstigt die Effekte von Katecholaminen zur Stressbewältigung. Die Bestimmung der Hormonpegel von Corticosteron bei Knockout-Mäusen war wegen der endogenen Expression des *Mvdp*-Gens in der *Zona fascioclata*, dem Produktionsort des Corticosterons, von besonderem Interesse.

Abbildung 3.26 veranschaulicht die Ergebnisse bei weiblichen bzw. männlichen Tieren. Die erhaltenen Messdaten dieses Stresshormons im Ruhezustand unterschieden sich sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Tieren sehr stark. So wiesen Weibchen im Vergleich zu Männchen rund 10-fach höhere Hormonwerte auf. In der Gegenüberstellung der Messwerte der beiden weiblichen Versuchsgruppen zeigten sich keine signifikanten Differenzen. Männliche Knockout-Tiere fallen hingegen durch signifikant erhöhte Corticosteronwerte im Vergleich zu Wildtyp-Männchen auf. Die mittleren Hormonwerte betragen bei Knockout- bzw. Wildtyp-Männchen 15,1 ng/ml bzw. 48,4 ng/ml. Die gemessene Basalwert-Erhöhung um den Faktor 3 könnte einerseits durch eine gesteigerte Stresssensibilität der Knockout-Männchen begründet sein, welche die Tiere auch im Ruhezustand zu verstärkter Stresshormon-Ausschüttung veranlasst.

Die Messung von Stresshormon-Pegeln gilt als anfälliges Verfahren, da bereits kleinste Veränderungen der Umweltbedingungen im Vorfeld, oder Verzögerungen bei der Blutabnahme selbst zu starken Erhöhungen führen können. Allerdings ist anzunehmen, dass solche Effekte bei Blindversuchen die Versuchsgruppen gleichermaßen treffen würde, so dass für die Ergebnisse bei männlichen Tieren ein echter Effekt anzunehmen ist. Auf die bereits angesprochenen, im Vergleich zu männlichen Tieren in beiden Versuchsgruppen 10-fach-erhöhten Corticosteronwerte der weiblichen Mäuse soll im Abschnitt Diskussion näher eingegangen werden.

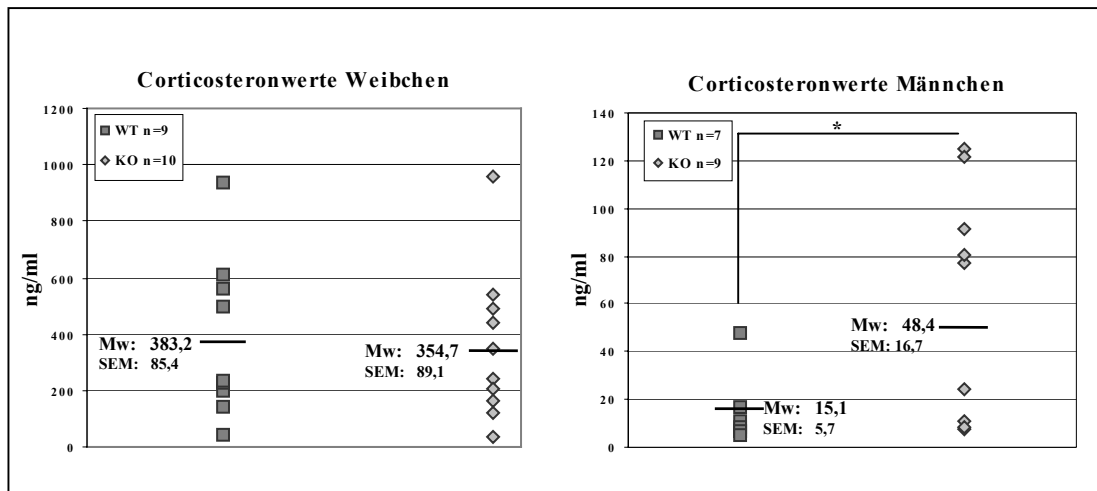


Abb. 3.26: Corticosteronwerte im Ruhezustand

Das linke Diagramm zeigt die Werte weiblicher Wildtyp- bzw. Knockout-Tiere im Vergleich ($p > 0,05$, Mittelwerte (Mw) als schwarze Balken gekennzeichnet). Signifikante Unterschiede treten bei den Corticosteronwerten männlicher Wildtyp- bzw. Knockout-Tiere auf (rechtes Diagramm, $p < 0,05$; SEM, (n) siehe Legende; Mittelwerte (Mw) als schwarze Balken gekennzeichnet).

3.2.2.5.2 Testosteron

Testosteron gilt als das wichtigste Androgen und wird sowohl vom weiblichen als auch vom männlichen Organismus produziert. Die Bildung erfolgt in den *Leydig*-Zellen des Hodens, in den *Theca*-Zellen des *Ovars* und in der *Zona reticularis* der Nebennierenrinde. Es erfüllt unter anderem wichtige Funktionen bei der Spermatogenese und bei anabolen Prozessen. *Theca*-Zellen und *Leydig*-Zellen sind die Produktionsorte des MVDP-Proteins im *Ovar* bzw. im Hoden. Als Testosteron-Produzenten stellen diese Zellen bei MVDP-Knockout-Tieren potentielle Verursacher von Hormonpegel-Veränderungen dar. Denkbar ist auch, dass, obwohl Testosteron in einer Nebennierenschicht gebildet wird, die MVDP endogen nicht exprimiert, über systemische Wechselwirkungen der Steroidhormone und ihrer Rückkopplungs-Mechanismen Veränderungen des Testosteronspiegels auftreten könnten.

Die gemessenen Werte sind in Abbildung 3.27 graphisch dargestellt und wiesen im Vergleich zwischen Knockout- und Wildtyp-Männchen keine signifikanten Unterschiede auf. Sie unterlagen in beiden Versuchsgruppen jedoch starken Schwankungen. Die Hormonkonzentrationen im Serum weiblicher Tiere sind naturgemäß wesentlich geringer als bei Männchen. Signifikante Differenzen konnten auch zwischen den Versuchsgruppen der Weibchen nicht festgestellt werden.

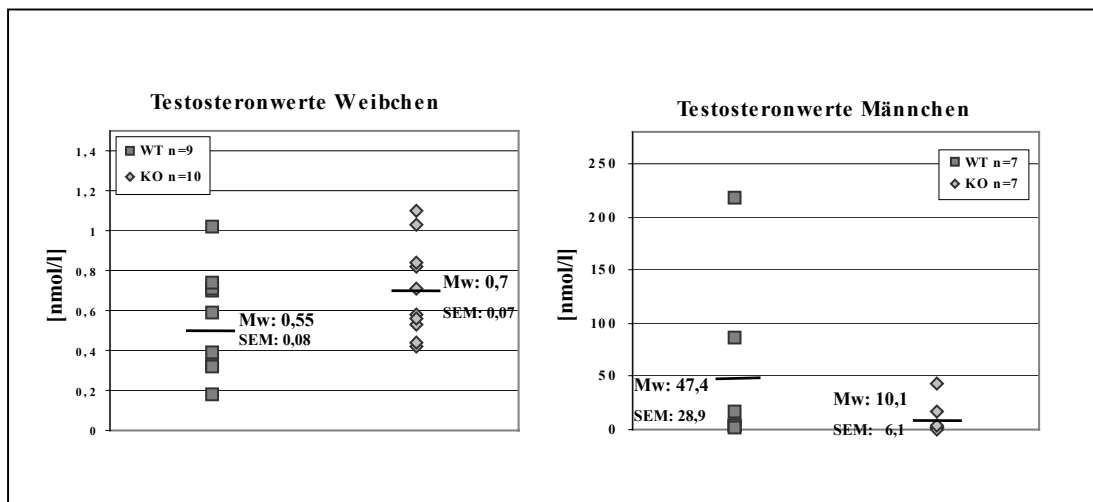


Abb. 3.27: Testosteronwerte

Das linke Diagramm zeigt den Vergleich der Testosteronwerte zwischen weiblichen Wildtyp- bzw. Knockout-Tieren. Der Vergleich bei männlichen Tieren ist im rechten Diagramm abgebildet. Es existieren jeweils keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$; SEM, (n) siehe Legende).

Die Deletion des MVDP-Proteins in Knockout-Tieren hat somit weder bei weiblichen noch bei männlichen Mäusen eine im Serum messbare Auswirkung auf die Bildung des Steroidhormons Testosteron.

3.2.2.5.3 Progesteron

Progesteron stellt als physiologisches Gelbkörperhormon das wichtigste natürliche Gestagen dar. Es wird vor allem in der Plazenta, in den *Theca*-Zellen früher Follikelstadien, in der *Zona fasciculata* und der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde und im *Corpus luteum* gebildet. Zusammen mit bzw. nach vorheriger Wirkung von Östrogenen ist Progesteron an der Regulation nahezu aller weiblichen Reproduktionsfunktionen beteiligt. Es bestimmt die Lutealphase des Östruszyklus, bereitet den Organismus auf eine bevorstehende Schwangerschaft vor und schafft wichtige Voraussetzungen für die Konzeption und Nidation des Embryos (Cross *et al.* 1994, Petrides 1998). Zudem sorgt dieses Hormon für die Erhaltung der Schwangerschaft. Die Hormonwert-Bestimmung im Serum der Knockout-Mäuse sollte daher Auskunft darüber geben, ob die zum Teil aus *Theca interna*-Zellen hervorgegangenen Gelbkörper bzw. die Nebennierenrinde in der Lage sind, dieses Hormon in physiologischer Konzentration zu bilden.

Sämtliche weiblichen Tiere befanden sich zum Zeitpunkt der Blutabnahme im Zyklusstadium des Metöstrus, um einen Vergleich der physiologisch schwankenden Sexualhormone zu ermöglichen. Die Progesteronkonzentration im Serum von Knockout-Weibchen zeigt, wie in Abbildung 3.28 dargestellt, im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern einen signifikanten Anstieg, wobei die gemessenen Werte bei Wildtyp-Weibchen Literaturangaben (Freeman 1988) entsprechen. Im Vergleich der Mittelwerte weisen Knockout-Weibchen zweifach erhöhte Progesteronkonzentrationen auf.

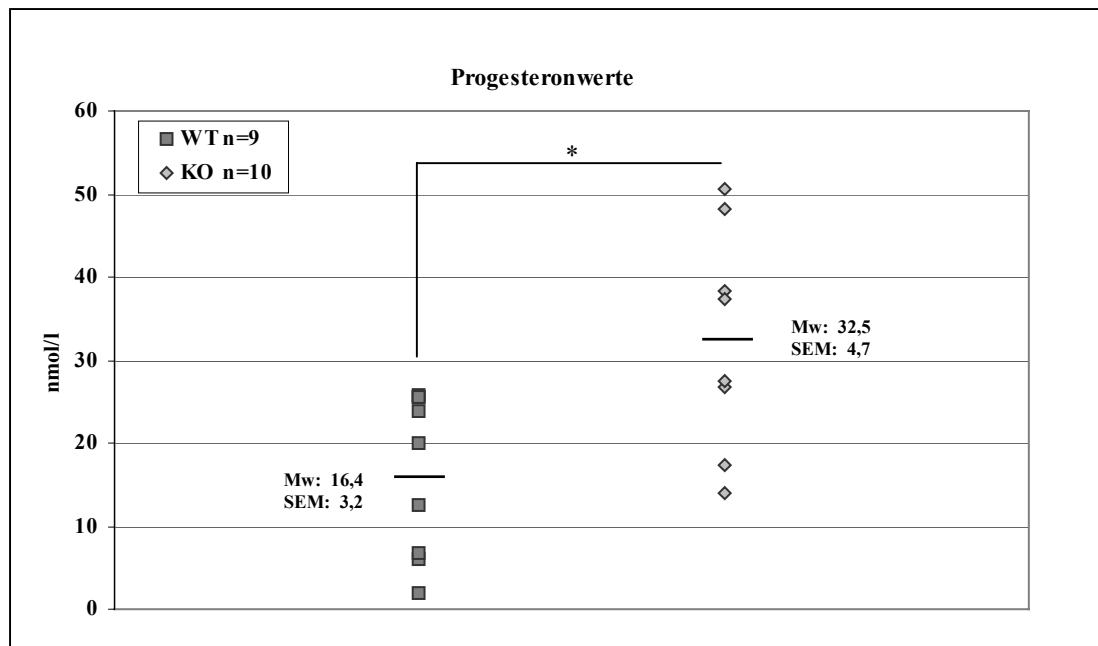


Abb. 3.28: Progesteronwerte

Das Diagramm zeigt den Vergleich der Progesteronwerte zwischen weiblichen Wildtyp- bzw. Knockout-Tieren. Es existieren signifikante Unterschiede (* $p < 0,05$; (n) siehe Legende), SEM und Mittelwerte (Mw) sind im Diagramm angegeben, bzw. als schwarzer Balken dargestellt.

3.2.2.6 Kaplan-Meier-Überlebenskurve

Auf Grund der zu Beginn dieses Kapitels beschriebenen Genotyp-Verteilungshäufigkeiten unter den Jungtieren der heterozygoten F1-Verpaarungen, existierte zunächst keinerlei Hinweis auf eine eventuell durch den MVDP-Knockout provozierte Letalität oder erhöhte Mortalität. Im Verlauf der Experimentalphase ereigneten sich jedoch gelegentlich unerwartet eintretende Todesfälle. Tabelle 3.4 führt die Verhältnisse von Todesfällen zu überlebenden Tieren auf. Erkennbar ist, dass für beide Geschlechter häufiger Knockout-Tiere betroffen waren als Wildtyp-Geschwister.

	Wildtyp	Heterozygot- Knockout	Homozygot- Knockout
Weibchen	0 / 46	4 / 64	6 / 86
Männchen	0 / 28	1 / 72	13 / 69

Tab. 3.4: Todesfälle im Vergleich

Die Tabelle verdeutlicht die Verhältnisse zwischen ungeklärten Todesfällen / und der jeweiligen Gesamtzahl des Genotyps bzw. des jeweiligen Geschlechts.

Zudem schien kein Zusammenhang zwischen den Todesfällen und einem bestimmten Lebensalter zu bestehen (Daten nicht gezeigt). Zur Überprüfung der Signifikanz wurden Mortalitätsanalysen mit Hilfe von Kaplan-Meier-Überlebenskurven durchgeführt, deren Ergebnisse in den Abbildungen 3.29 und 3.30 dargestellt sind. Anhand der Überlebenskurve der männlichen Tiere lässt sich erkennen, in welchem Ausmaß homozygote Knockout-Tiere verstarben. Der Unterschied zu Wildtyp- und heterozygoten Geschwistern ist hier hoch-signifikant ($p < 0,01$). Für weibliche Tiere konnte hingegen ein signifikanter Unterschied nicht festgestellt werden ($p > 0,05$).

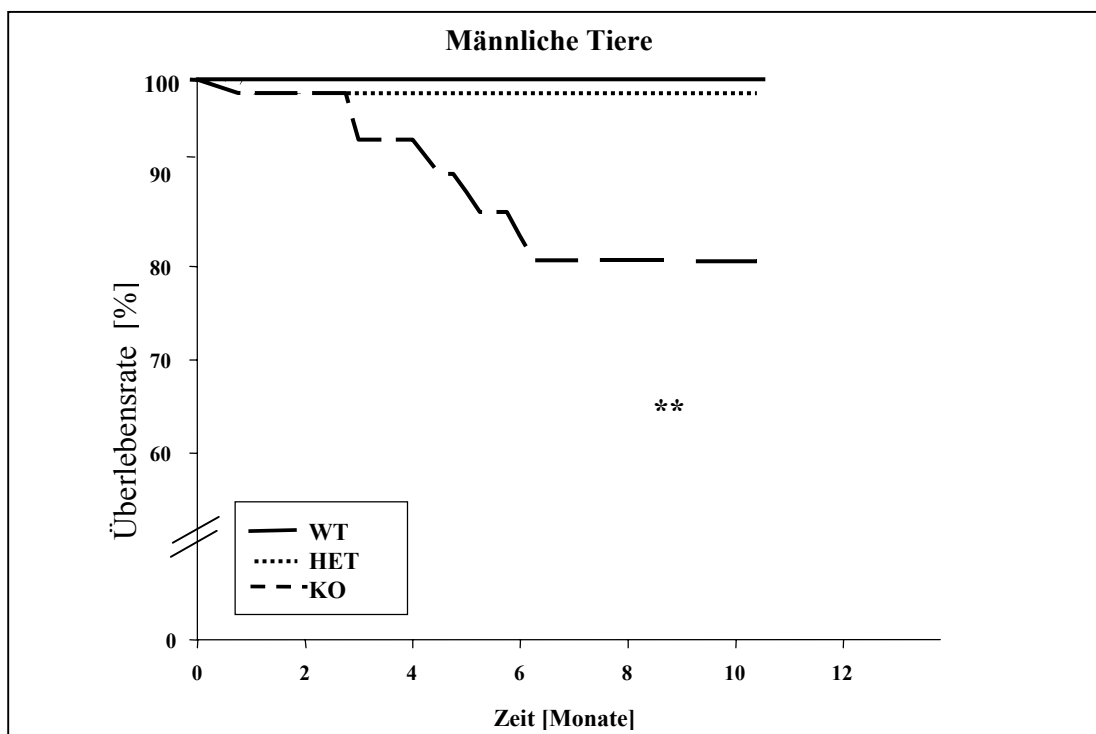


Abb. 3.29: Kaplan-Meier-Überlebenskurve männlicher Tiere

Dargestellt ist die Überlebensrate der Tiere in % der Gesamtzahl. Logrank-Test zur statistischen Auswertung. Ein signifikanter Unterschied (** $p < 0,01$) wird zwischen Knockout-Männchen und ihren Wildtyp und heterozygoten Geschwistern deutlich.

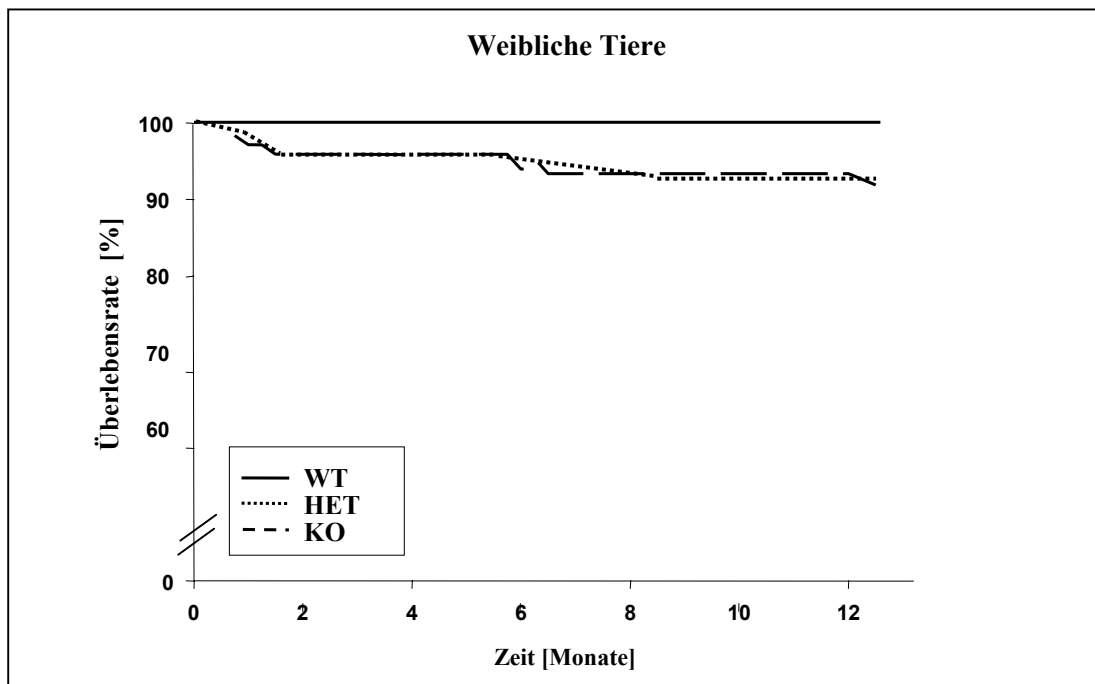


Abb. 3.30: Kaplan-Meier-Überlebenskurve weiblicher Tiere

Dargestellt ist die Überlebensrate der Tiere in % der Gesamtzahl. Logrank-Test zur statistischen Auswertung ($p > 0,05$).

Bei einigen plötzlich verstorbenen Tieren gelang die Entnahme und Fixierung der Nebennieren bevor Zerfallsprozesse zu starke Veränderungen bewirken konnten. Gewebsschnitte dieser Tiere wurden ebenfalls von Dr. Rainer Ernst (Pathologe, Schering AG) begutachtet. Der Befund ergab, dass diese Tiere ohne ersichtlichen pathologischen Nebennieren-Befund verstorben waren.

Die Deletion des *Mvdp*-Gens scheint daher bei männlichen Knockout-Tieren unter bestimmten Umständen zu letalen Effekten zu führen, wobei die Charakteristika dieser Umstände bisher ungeklärt blieben.

3.2.2.7 Apoptosefärbung

Auf Grund seiner Substratspezifität für toxische und nachgewiesenermaßen Apoptose-induzierende Verbindungen (Kalinich *et al.* 2000; Herbst *et al.* 1999; Kruman *et al.* 1997) wird ein Zusammenhang zwischen der Wirkung des MVDP-Proteins und anti-apoptotischen Prozessen nicht ausgeschlossen. Daher wurden die endogen MVDP-exprimierenden Nebennieren und Ovarien hinsichtlich verstärkter Apoptoseraten untersucht. Verwendet wurde hierfür die „Terminale Desoxyribosyl-Transferase vermittelte dUTP Nick End Labeling“ (TUNEL)-Technologie, die als Indikator der DNA-Fragmentierung einen Marker später Apoptoseprozesse darstellt.

Abbildung 3.31 zeigt beispielhaft Apoptosefärbungen von Nebennierenschnitten verschiedener Tiere. Unter normalen Haltungsbedingungen konnten zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen keine Unterschiede festgestellt werden.

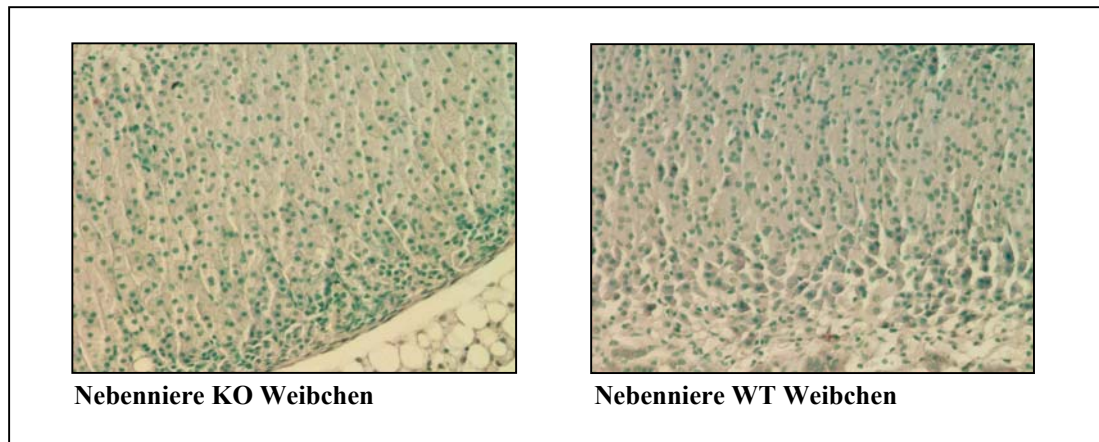


Abb. 3.31: Apoptosefärbung

Abgebildet sind TUNEL-gefärbte Paraffinschnitte der Nebenniere (5µm) von Weibchen beispielhaft für beide Geschlechter. (keine signifikanten Unterschiede)

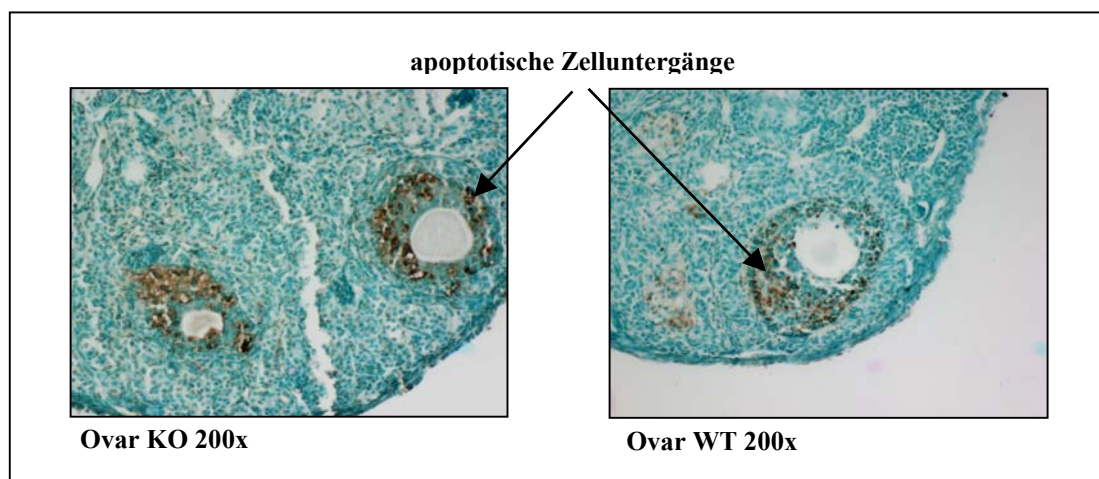


Abb. 3.32: Apoptosefärbung der Ovarien weiblicher Wildtyp- bzw. Knockout-Tiere

Dargestellt ist die TUNEL-Färbung von Paraffinschnitten des Ovars mit atretischen (apoptotischen) Follikeln, die sowohl bei Wildtyp- als auch bei Knockout-Weibchen auftreten.

Im ovariellen Zyklus gehören apoptotische Zelluntergänge zu permanenten physiologischen Ereignissen. Sie garantieren, dass unter den rekrutierten Follikeln all jene atretisch werden, die nicht zur Ovulation gelangen können. Atresien werden dabei von apoptotischen Zelluntergängen begleitet, die durch die TUNEL-Färbung sowohl bei Wildtyp- als auch bei Knockout -Tieren (Abbildung 3.32) beobachtbar waren. Unterschiedliche Apoptoseraten konnten jedoch nicht festgestellt werden.

3.2.2.8 Fertilitätsanalyse

Zur Bedeutung des MVDP-Proteins im Ovar wird auf Grund des spezifischen Expressionsmusters postuliert, dass die Beschränkung der Proteinpräsenz auf *Theca interna*- und interstitielle Zellen ausschließlich im Zeitraum unmittelbar vor der Ovulation eine bedeutende Rolle des MVDP-Proteins beim Eisprung nahe legt. Die gezielte Ausschaltung des Enzyms könnte daher zu Störungen dieses komplexen Prozesses und damit zu verminderter Fertilität der Tiere führen.

Im *Vas deferens* männlicher Tiere stellt MVDP mit 42 % der löslichen Gesamt-Proteinmenge das Hauptprotein dar. Seine Funktion in diesem, vor allem dem Spermientransport dienenden, Organ ist unbekannt. Es könnte jedoch die außerordentlich sensiblen Spermatozoen vor angreifenden toxischen Verbindungen schützen. Daher wird vermutet, dass das Fehlen dieses Proteins im Samenleiter von Knockout-Tieren solche Schutzmechanismen außer Kraft setzt und die Fruchtbarkeit der Tiere dadurch vermindert ist.

Zur Klärung dieser Fragen wurden Tiere beider Geschlechter einer Reihe von Untersuchungen zur Fertilitätsanalyse unterzogen, deren Resultate im Folgenden beschrieben sind.

3.2.2.8.1 Testverpaarung

Zur Überprüfung eines eventuell vorhandenen Reproduktionsphänotyps wurden Knockout-Tiere und Wildtyp-Geschwister mit Wildtyp-Tieren des jeweils anderen Geschlechts verpaart. Die Pärchen wurden einzeln in Typ III Makrolonkäfigen gehalten und die Würfe nach 20 Tagen abgesetzt. Der Vergleich der Wurfgrößen und der Wurfhäufigkeiten zwischen Wildtyp-Tieren und Knockout-Tieren ist in Abbildung 3.33 dargestellt. Weder weibliche noch männliche Knockout-Mäuse zeigten veränderte Reproduktionsfunktionen. Das Paarungsverhalten erschien normal, und die Frequenz beobachtbarer Vaginalpfropfe als Indikatoren erfolgter Kopulationen blieb ohne Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren.

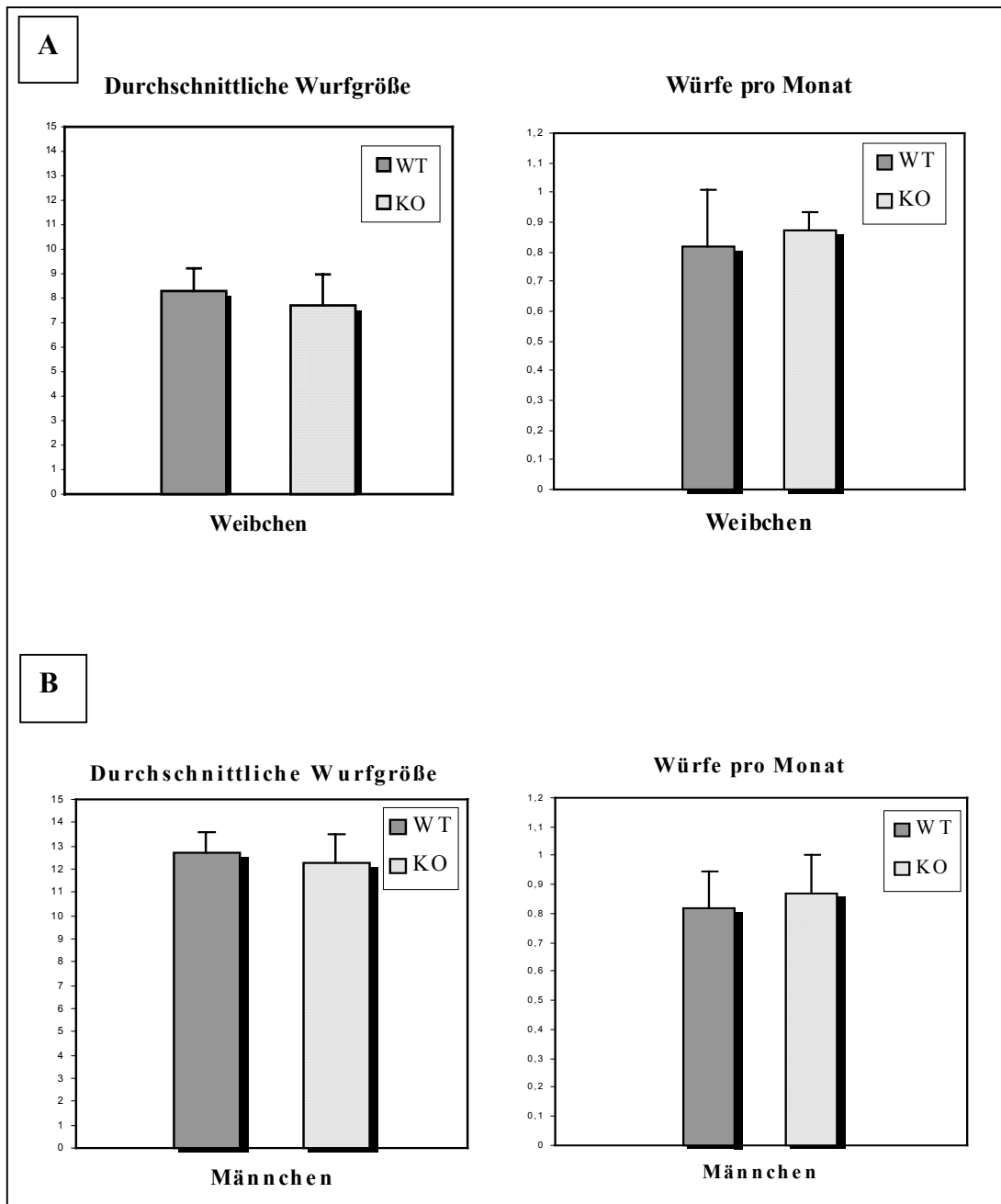


Abb. 3.33: Durchschnittliche Wurfgröße und Würfe pro Monat

Die Diagramme verdeutlichen, dass zwischen Wildtyp- (dunkelgrau) und MVDP-Knockout-Tieren (hellgrau) keine Unterschiede hinsichtlich der Wurfhäufigkeiten und der durchschnittlichen Wurfgröße bestehen ($p > 0,05$; SEM). **A**) Weibliche Tiere der Testgruppe ($n=21$ (KO); $n=17$ (WT)) wurden mit Männchen des Stammes C57Bl6 und **B**) männliche Tiere der Testgruppe ($n=13$ (KO); $n=10$ (WT)) mit Weibchen des Stammes NMRi über einen Zeitraum von 8 Monaten verpaart.

3.2.2.8.2 Zyklusverlauf

Reproduktionsstörungen weiblicher Tiere können neben einer Vielzahl weiterer pathologischer Ursachen auch durch Anomalien des Östruszyklus hervorgerufen werden. Eine Möglichkeit solche Störungen zu identifizieren, ist die Überwachung des Zyklusverlaufs durch Inspektion der Zervix und Vaginalspülungen über einen längeren Zeitraum. Der regelrechte Zyklusverlauf von jeweils 12 Knockout- bzw. Wildtyp-Tieren ab einem Alter von 6 Wochen wurde über mehrere Wochen hinweg täglich kontrolliert. In beiden Versuchsgruppen fanden sich Tiere, bei denen kein oder zumindest kein regelmäßiger Zyklus feststellbar war. Die Mehrzahl der Tiere beider Gruppen wies Zyklusverläufe auf, die im Rahmen der physiologischen Schwankungen als „normal“ zu bezeichnen sind. Über einen 15-tägigen Beobachtungszeitraum wurde täglich die jeweilige Zyklusphase bestimmt. Abbildung 3.34 verdeutlicht die akkumulierte Verweildauer der Tiere je Zyklusstadium. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Knockout- und Wildtyp-Weibchen registriert werden. Azyklische Tiere wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

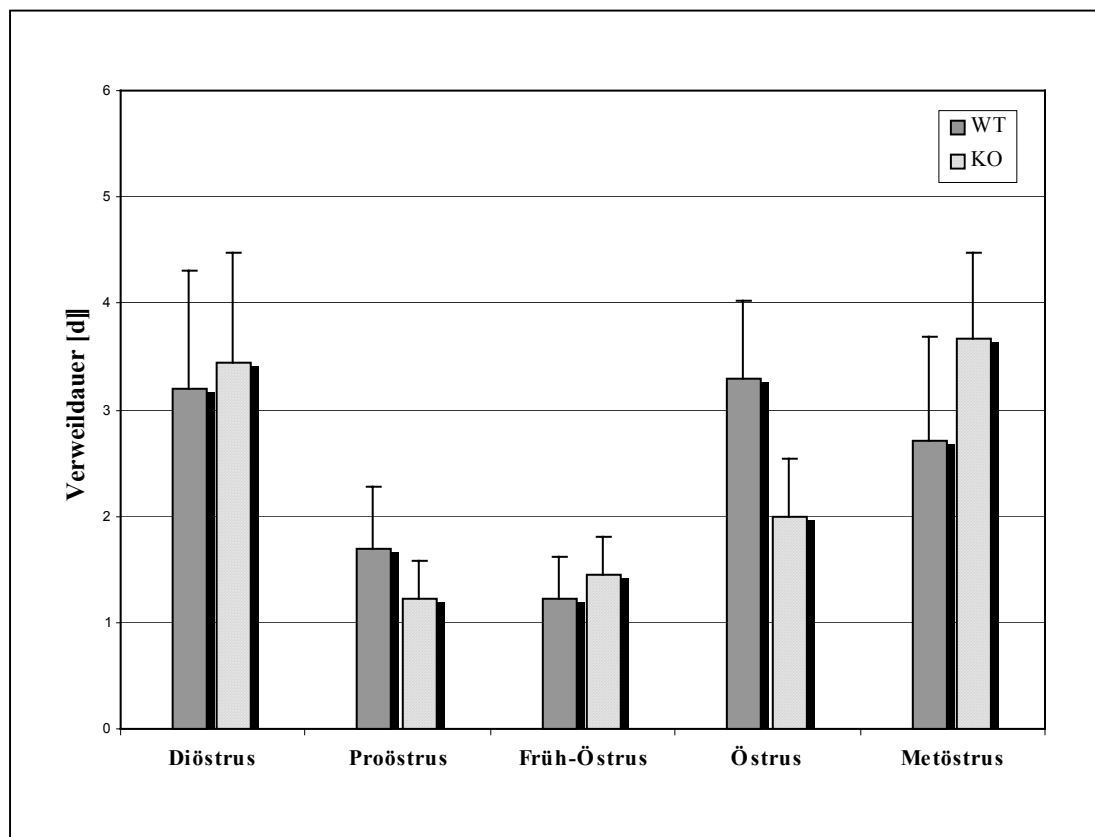


Abb. 3.34: Zyklusbestimmung

Dargestellt ist die akkumulierte Verweildauer der Weibchen im jeweiligen Zyklusstadium über einen 15-tägigen Beobachtungs-Zeitraum. Je 9 Wildtyp- bzw. Knockout-Weibchen wurden zur Bestimmung des jeweiligen Zyklusstadiums herangezogen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt werden ($p > 0,05$, SEM).

3.2.2.8.3 Bestimmung der Follikelstadien-Verteilung

Im Verlauf des Lebens eines Mausweibchens entwickeln sich mehrere hundert Follikel in zyklischen Intervallen vom Primordialstatus zum sprungreifen Stadium. Im geschlechtsreifen Tier sind daher in Abhängigkeit vom Alter unterschiedliche Follikel-Reifungsstadien vorhanden. Abbildung 2.3 im Abschnitt Material und Methoden gibt einen Überblick über die Follikulogenese. Die Beurteilung der follikulären Reifungsphase und der Verhältnisse der einzelnen Follikelpopulationen untereinander erlaubt Rückschlüsse auf pathologische Störungen der Fertilität.

Zur eingehenderen Untersuchung der weiblichen Reproduktionsorgane wurden daher im Rahmen der Fertilitätsanalyse Serienschnitte der Ovarien angefertigt und HE gefärbt. Der Klassifizierung der einzelnen Follikelstadien wurden die Gliederungen von Pedersen und Peters (1968) zu Grunde gelegt. Die graphische Darstellung (Abbildung 3.35) verdeutlicht die Verhältnisse in den beiden Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung ergab, dass zwischen beiden Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede feststellbar sind.

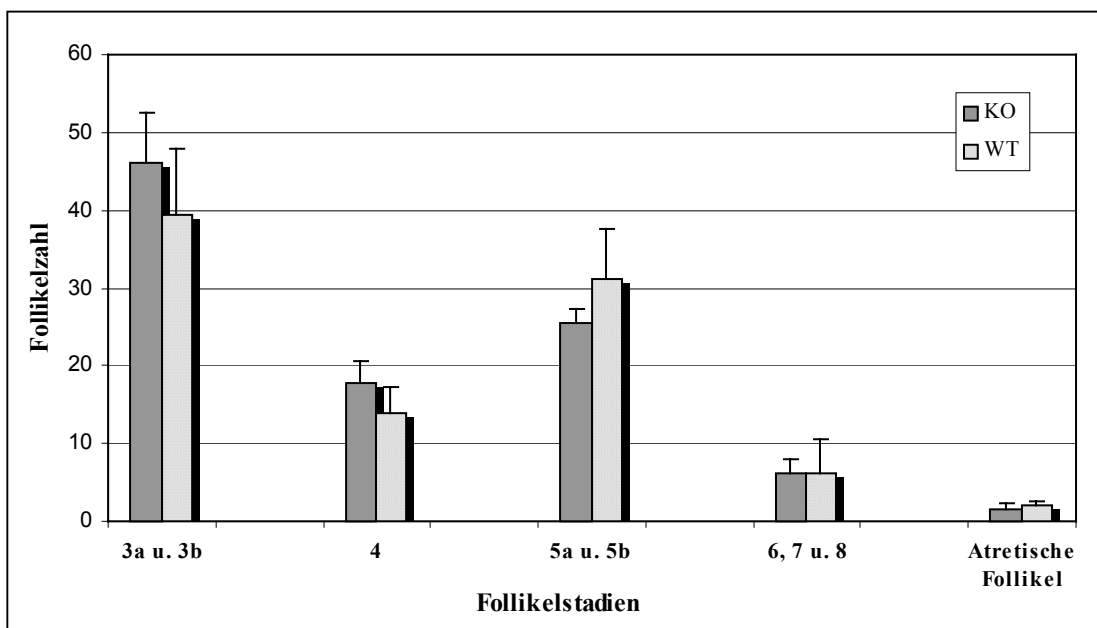


Abb. 3.35: Follikelstadienverteilung

Dargestellt ist die Verteilung der Follikelpopulationen von Wildtyp- (n=4) und Knockout-Tieren (n=4) auf verschiedene Stadien der Follikelentwicklung (SEM). Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

3.2.2.8.4 Spermienanalyse

Das Maus-Vas-Deferens-Protein ist das Hauptprotein des Samenleiters. Auf Grund dieser starken Präsenz und der damit potentiell verbundenen Bedeutung des Proteins für die Spermatozoen, wurden morphologische, quantitative und qualitative Analysen von Spermatozoen aus der *Cauda epididymis* des Nebenhodens und aus dem *Vas deferens* durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 3.36 dargestellt. Die Spermienzahl pro μl war in den Proben aus der *Cauda epididymis* in beiden Versuchsgruppen höher als in Proben aus dem *Vas deferens*. Im Vergleich der Spermienzahlen zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren konnten weder in der *Cauda epididymis* noch im *Vas deferens* signifikante Unterschiede festgestellt werden.

Die Motilität der Spermien wurde einerseits qualitativ, d.h. anhand einer Skala von 0 (insgesamt nicht beweglich) bis 3 (insgesamt sehr beweglich), beurteilt. Dabei konnte festgestellt werden, dass Spermien aus der *Cauda epididymis* beider Gruppen wesentlich weniger Motilität zeigten als die aus dem *Vas deferens* (Abbildung 3.37 A). Da Spermien ihre volle Beweglichkeit erst während der Durchwanderung des Nebenhodens erlangen, ist dieser Befund physiologisch begründet. Der Vergleich von Wildtyp- bzw. Knockout-Spermien innerhalb der Organe ergab keine signifikanten Unterschiede.

Zum anderen wurde die Motilität der Spermien auch quantitativ, d.h. als Prozentsatz beweglicher Spermien an der Gesamtmenge, beurteilt. Abbildung 3.37 B zeigt, dass der Anteil beweglicher Spermien zwischen den einzelnen Tieren stark schwankt. Für Wildtyp-Männchen gilt, dass dieser Prozentsatz im *Vas deferens* bei deutlich mehr Tieren hoch ist als in der *Cauda epididymis*. Bei Knockout Männchen hingegen bleibt die starke Streuung der Ergebnisse der Einzeltiere im *Vas deferens* erhalten. Der Prozentsatz beweglicher Spermien ist hier im Samenleiter nicht höher als im Nebenhoden. Der t-Test ergibt einen Wert von $p=0,056$ (U-Test v. Mann, Withney, Wilcoxon $p=0,095$), d.h. der Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren ist nicht signifikant. Die Wahl einer größeren Versuchsgruppe hätte die Ergebnisse dieser Analyse eventuell klarer ausfallen lassen. Eine potentielle Auswirkung der *Mvdp*-Gen-Deletion im *Vas deferens* auf die Beweglichkeit der Spermien soll deshalb nicht völlig ausgeschlossen werden.

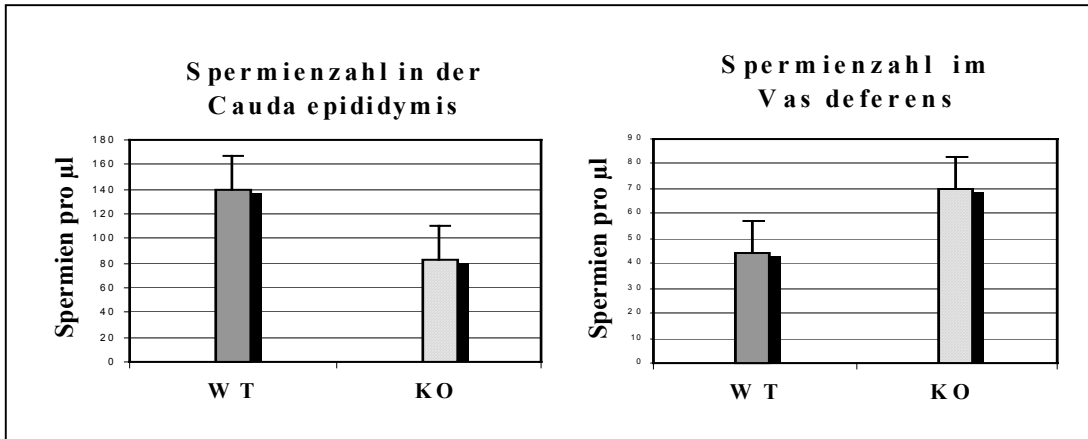


Abb. 3.36: Spermienanalyse

Die Anzahl der Spermatozoen pro μl wurde bestimmt und zwischen den Versuchsgruppen Wildtyp- (n=10) und Knockout-Männchen (n=8) verglichen. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen konnten nicht festgestellt werden ($p > 0,05$, SEM).

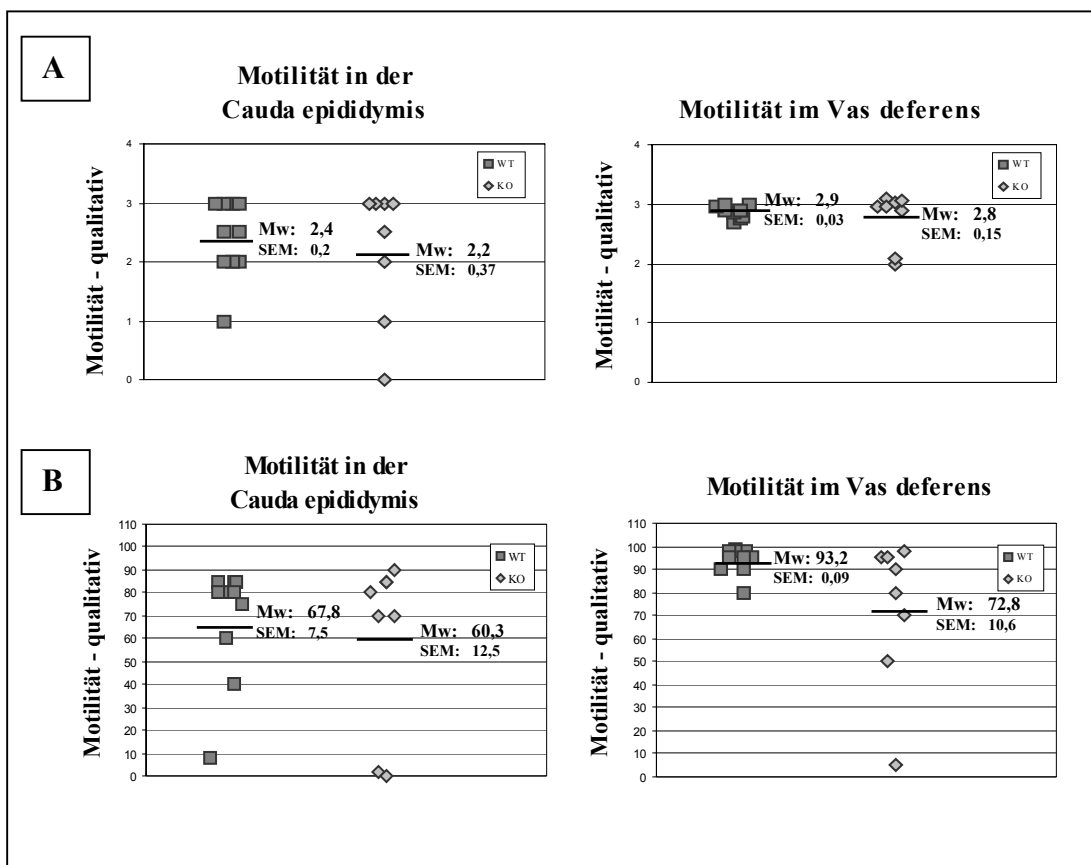


Abb. 3.37: Spermienanalyse

Die qualitative Motilität (A) der Spermienpopulation mit der Wertung 0 (nicht beweglich) bis 3 (sehr beweglich) und der Prozentsatz motiler Spermien an der Gesamtpopulation (B) im Vergleich zwischen Wildtyp- (n=10) und Knockout-Männchen (n=8) sind graphisch dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen konnten nicht festgestellt werden ($p > 0,05$, SEM, Mittelwert (Mw) als schwarzer Balken gekennzeichnet).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl weibliche als auch männliche Knockout-Tiere durch Testverpaarungen uneingeschränkte Fertilität bewiesen. Auch durch gezieltere geschlechtsspezifische Untersuchungen der Reproduktionsfunktionen, z.B. durch die Bestimmung der Follikelpopulationen oder durch die Spermienanalyse, konnten keinerlei signifikante Abweichungen festgestellt werden.

3.2.3 Charakterisierung unter Einwirkung exogener Stimuli

Das MVDP-Protein wird in der Nebenniere ausschließlich in der *Zona fasciculata* gebildet. Diese Cortexregion fungiert als Produktionsort der Glukocorticoide, deren vielfältige Wirkungen bei inflammatorischen, metabolischen und stressbedingten Prozessen bereits Erwähnung fanden. Untersucht werden sollte daher, inwieweit das Reaktionsvermögen der MVDP-Knockout-Tiere auf Glukocorticoidwirkungs-induzierende Stimuli eingeschränkt sein könnte.

3.2.3.1 Lipopolysaccharide

Inflammatorische Reize lassen sich sehr gut durch Applikation sogenannter Lipopolysaccharide hervorrufen. Lipopolysaccharide sind Bestandteile der bakteriellen Zellwand, die erst bei Zellyse freigesetzt werden und ihre toxische Wirkungen entfalten. Zu diesen Wirkungen gehören bei Mensch und Versuchstier Fieber, Leukopenie, entzündliche Gefäßveränderungen, die Aktivierung der Blutgerinnung und des Komplement- u. Immunsystems und die Induktion oxidativen Stresses. Versuchstiere beider Geschlechter der Genotypen Knockout und Wildtyp wurden mit 4 mg/kg Lipopolysaccharid behandelt und im Verlauf von 20 bis 26 Stunden beobachtet. Die Tiere befanden sich über diesen Zeitraum in recht unterschiedlichem gesundheitlichen Zustand. Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen den LPS-iduzierten allgemeinen Krankheitszeichen und dem Genotyp der Tiere festgestellt werden. Alle endogen MVDP-exprimierenden Organe wurden mit Hilfe der TUNEL-Technologie auf Apoptose hin untersucht. Im Ergebnis, das durch Abbildung 3.38 verdeutlicht ist, konnten bei einigen Knockout-Tieren apoptotische Zelluntergänge in der *Zona fasciculata* der Nebenniere in dramatischem Ausmaß beobachtet werden. Die Gesamt-Apoptoserate war bei Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu Knockout-Tieren deutlich niedriger ($p < 0,05$). Auch das Samenleiter-Epithel der Knockout-Tiere wies verglichen mit Wildtyp-Tieren eine höhere Zahl apoptotischer Zellen auf ($p < 0,05$). Die

Ovarien zeigten bei beiden weiblichen Versuchsgruppen vereinzelt atretische Follikel mit charakteristischen, apoptotischen Zelluntergängen, deren Zahl das physiologische Normalmaß nicht überstieg. Als Kontrollgruppe dienten mit Vehikel (PBS) behandelte Knockout-Tiere.

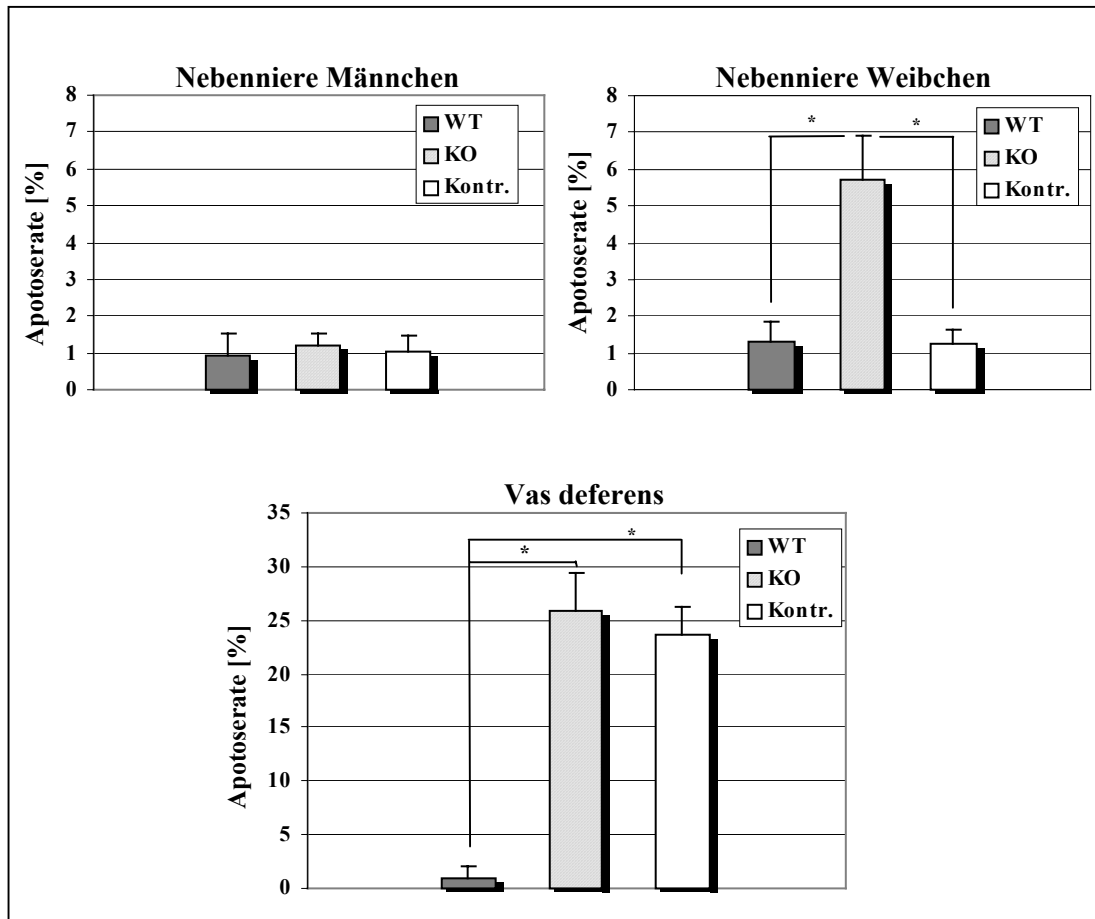


Abb. 3.38: Apotoseraten nach Applikation von 4 mg/kg Lipopolysaccharid

Die Diagramme zeigen jeweils den Vergleich zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren nach LPS-Behandlung und als Kontrolle Vehikel(PBS)-behandelte Knockout-Tiere. Apoptoseraten in der Nebenniere zeigen signifikante Unterschiede nur bei weiblichen Tieren (Diagramm oben rechts, WT n=6, KO n=6, Kontr. n=6; p < 0,05, SEM). Bei männlichen Tieren findet sich eine erhöhte Apoptoserate im Vas deferens (unteres Diagramm, WT n=6, KO n=7, Kontrolle n=6; p < 0,05, SEM).

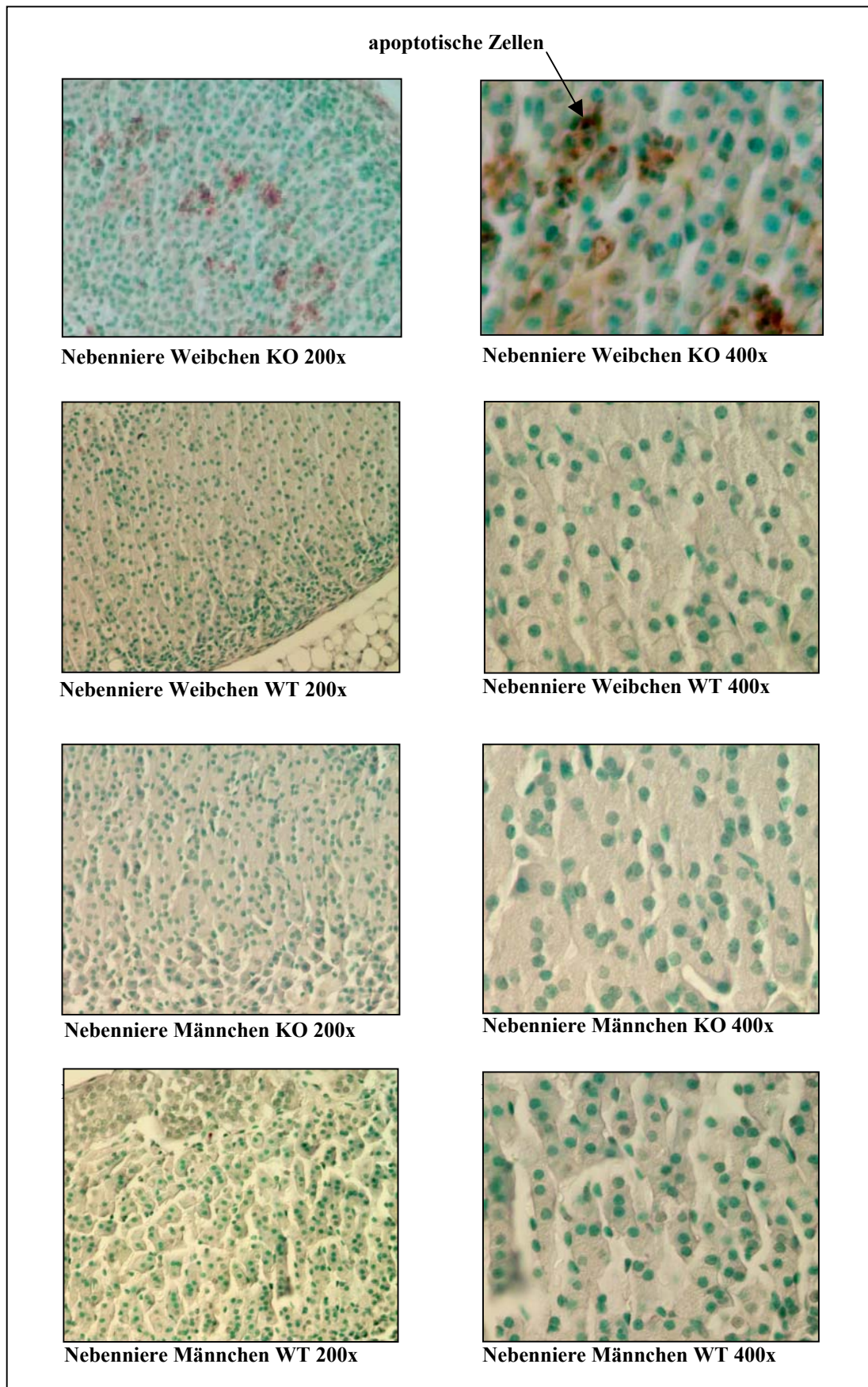


Abb. 3.39: Apoptosefärbung nach Induktion oxidativen Stresses

Dargestellt sind TUNEL-gefärbte Nebennierenpräparate (5µm) weiblicher (oben) und männlicher (unten) Tiere 20-26 Stunden nach LPS-Applikation (4mg/kg). Apoptotische Zelluntergänge sind exemplarisch Markiert (Pfeil)

Die Apoptosefärbung der Samenleiter von behandelten Knockout- bzw. Wildtyp-Tieren und unbehandelten Knockout-Kontrolltieren deutete auf eine generalisierte erhöhte Apoptoseneigung bei Knockout-Tieren hin (Abbildungen 3.38 und 3.40). Das *Vas deferens* fungiert als Transport- und Speicherorgan der gegenüber toxischen Radikalen außerordentlich empfindlichen *Spermatozoen*. Es wird daher eine protektive Rolle des *Vas deferens*-Epithels diskutiert. MVDP stellt das Hauptprotein dieses Gewebes dar und wird von den Epithelzellen in das Lumen des Samenleiters sezerniert. Der Nachweis des MVDP-Proteins auf der Spermienoberfläche (Taragnat *et al.* 1995) ist ein weiterer Hinweis darauf, dass dieses Protein eine protektive Aufgabe erfüllen könnte. Die Deletion von MVDP im *Vas deferens* könnte daher für die erhöhte Apoptoserate im Samenleiter behandelter und unbehandelter Knockout-Tiere ursächlich sein.

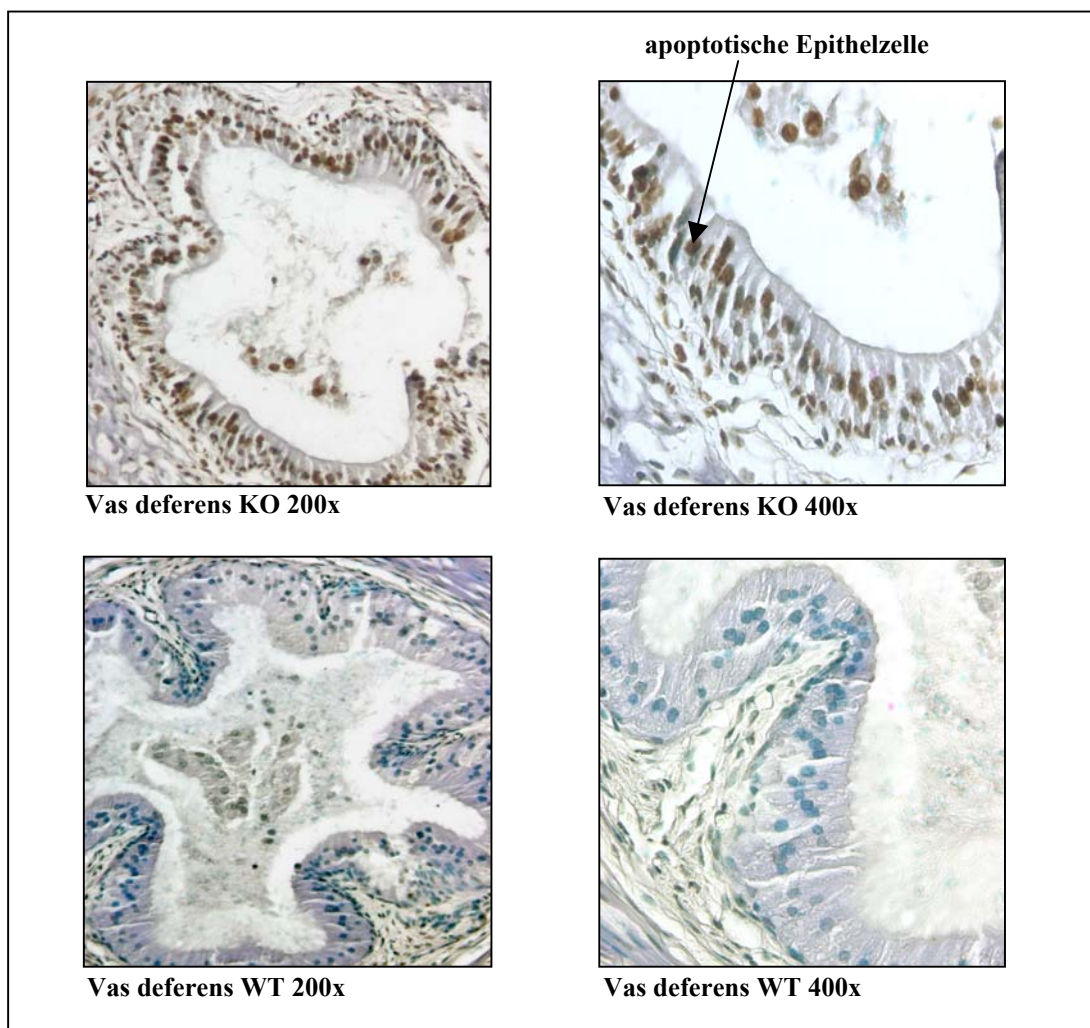


Abb. 3.40: Apoptosenachweis nach Induktion oxidativen Stresses

Dargestellt sind TUNEL-gefärbte *Vas deferens*-Paraffinschnitte (5 μ m) 20 Stunden nach LPS-Stimulation. Positiv gefärbte Zellen sind exemplarisch markiert (Pfeil).

3.2.3.2 Stressinduktion durch Immobilisierung

Die Behandlung der Versuchstiere mit Lipopolysacchariden diente der Induktion inflammatorischer und oxidativer Stresszustände. Die Ausübung eines akuten Stresszustandes durch Immobilisierung der Tiere diente als weitere Möglichkeit, die Reaktionsfähigkeit des Nebennierencortex und damit eventuell die Ursache der erhöhten Mortalität aufzuklären. Dazu wurden die Tiere für einen Zeitraum von 40 Minuten in engen Röhren fixiert („restraint stress“). Nach Beendigung der Immobilisierung erfolgte zur Bestimmung der Corticoidkonzentration im Serum eine Blutabnahme aus der Schwanzvene. Die Hormonpegel gestresster Tiere sind in Abbildung 3.41 dargestellt. Eine erhöhte Mortalitätsrate männlicher Knockout-Tiere konnte im Zuge dieser Untersuchungen nicht beobachtet werden.

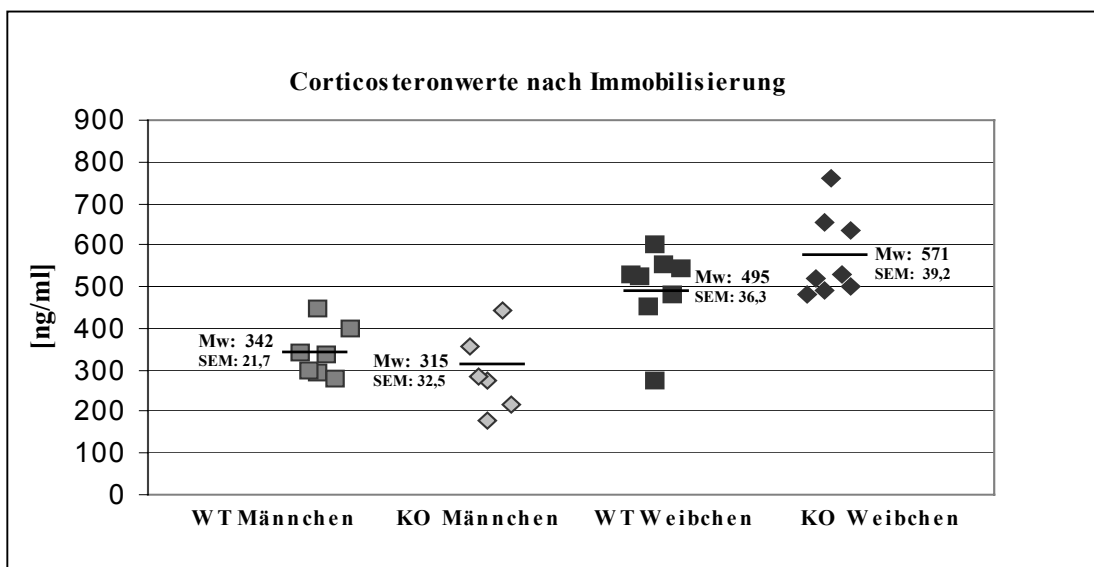


Abb. 3.41: Corticosteronkonzentrationen im Serum der Tiere nach Immobilisierung

Dargestellt sind die Hormonwerte für Wildtyp- (WT) und Knockout-(KO)Tiere beider Geschlechter nach 40minütiger Immobilisierung. Es sind keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen ($p > 0,05$).

Die Bestimmung der Stresshormonkonzentration nach Immobilisierung ergab hohe Corticoidwerte für alle Versuchsgruppen. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht beobachtet werden. Knockout-Tiere sind in gleichem Maße in der Lage Stresshormone zu produzieren und auszuschütten wie ihre Wildtyp-Geschwister.

42 Stunden nach Beendigung der Stressinduktion wurden die Nebennieren der Tiere zur Untersuchung möglicher apoptotischer Zelluntergänge präpariert. Die Apoptosefärbung (TUNEL-Technologie) ergab, dass die Induktion der Nebennieren-Rindenaktivität durch Immobilisierung im Gegensatz zur Aktivierung durch

Induktion einer Entzündungsreaktion nicht zu erhöhten Apoptoseraten führt. Die Mortalitätsrate scheint daher nicht durch diesen akut induzierten Stress verursacht zu sein. Ausgeschlossen werden soll jedoch nicht, dass langfristige, d.h. chronische Stresszustände dafür verantwortlich sein könnten.

3.2.3.3 Nahrungsentzug

Die Glukocorticoide der *Zona fasciculata* erfüllen unter anderem auch metabolische Funktionen. Sie bewirken die Erhöhung der Glukosekonzentration im Blut und den verstärkten Eiweißkatabolismus zur Bereitstellung von Energie, z.B. auch in Stress-situationen. Auf Grund der beobachteten Gewichts-differenzen zwischen Knockout- und Wildtyp-Tieren unter normalen Haltungsbedingungen sollte untersucht werden, ob die Gewichtsentwicklung der Versuchstiere bei Futterentzug voneinander ab- weicht. Dazu wurde den Versuchsgruppen für 24 Stunden die Nahrungsquelle entzo- gen und das Körpergewicht zuvor, danach und nach Ablauf weiterer 24 und 48 Stun- den bestimmt. Abbildung 3.42 veranschaulicht die Ergebnisse. Der durchschnittliche Gewichtsverlust nach 24 Stunden Futterentzug betrug ohne signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen circa 8% des Körpergewichts bei weiblichen bzw. 10% bei männlichen Tieren. Im Verlauf der folgenden 24 Stunden steigerten sich die Körpergewichte der Tiere auf durchschnittlich 97 % des ursprünglichen Gewichts. Die Gewichtsentwicklung stagnierte über weitere 24 Stunden ohne dass signifikante Unterschiede zwischen Knockout- bzw. Wildtyp-Tieren auftraten.

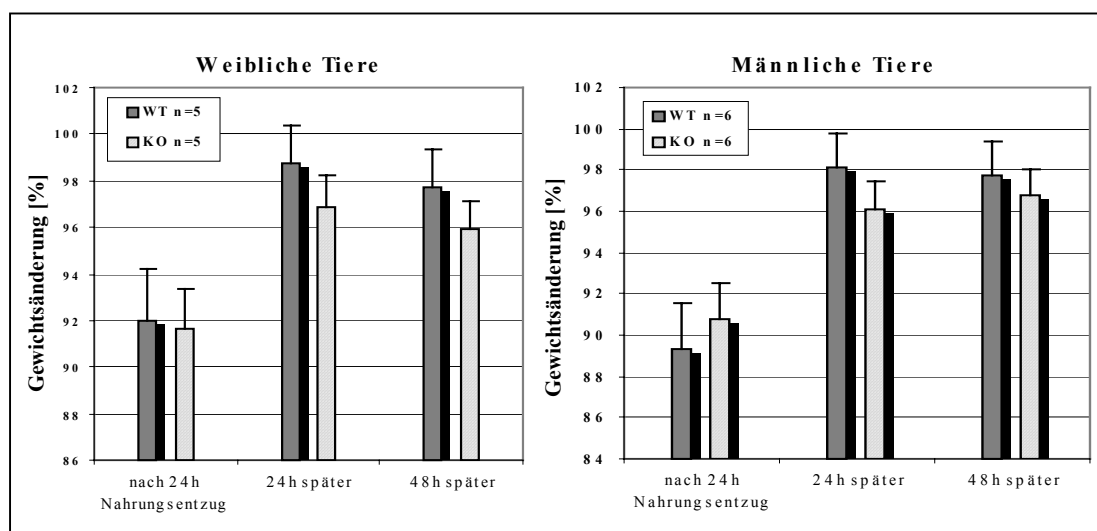


Abb. 3.42: Prozentuale Gewichtsentwicklung nach Nahrungsentzug

Die Gewichtsentwicklung über 48 Stunden nach 24-stündigem Nahrungsentzug wurde gemessen. Verglichen wurden jeweils Wildtyp- und Knockout-Tiere eines Geschlechts. Signifikante Unterschiede konnten nicht festgestellt werden ($p > 0,05$, SEM und (n) im Diagramm).

Die experimentelle Induktion verschiedener Stressformen diente dem Versuch pathophysiologische Zustände zu provozieren, die mit Funktionen der von der *Zona fasciculata* gebildeten Glukocorticoide im Zusammenhang stehen. Durch Analyse des Reaktionsvermögens von MVDP-Knockout-Tieren sollten Rückschlüsse auf potentielle Beteiligungen des MVDP-Proteins an der Bewältigung dieser Stresszustände im intakten Organismus gezogen werden. Die Induktion von körperlichen Stresszuständen durch Immobilisierung und durch Nahrungsentzug ergab, dass sich die Deletion von MVDP unter den gewählten Bedingungen für Knockout-Tiere nicht nachteilig auswirkt. Die Applikation von Lipopolysacchariden und die damit verbundene inflammatorische Immunreaktion hingegen deuteten darauf hin, dass das MVDP-Protein in diesen Prozess involviert ist und eventuell anti-apoptotische Wirkungen besitzt.

3.2.4 Untersuchung möglicher Kompensationseffekte

Obwohl durch die Entwicklung der Knockout-Technologie ein Verfahren geschaffen wurde, mit dem Genfunktionen im Vergleich zu anderen Methoden sehr viel genauer und schärfer abgrenzbar bestimmt werden können, birgt diese Methode eine Reihe problematischer Begleiterscheinungen. Beispielsweise besteht grundsätzlich die Möglichkeit, dass die Funktion des deletierten Gens von einem Gen sehr ähnlicher Funktion übernommen wird. Zur Überprüfung eines solchen Effektes beim MVDP-Knockout wurde das funktionell und strukturell am stärksten verwandte Protein hinsichtlich seiner Expressionsstärke untersucht. Das FR-1 Protein hat, wie bereits beschrieben, auf Proteinebene eine Aminosäure-Sequenzhomologie zu MVDP von 82 % (Seery *et al.* 1998). Es gehört ebenfalls zu den Aldo-Keto-Reduktasen und unterscheidet sich vom MVDP-Protein am wesentlichsten im Expressionsmuster. Es wird vor allem im Testis, im *Ovar* auch ohne LH-Induktion und wie MVDP in der Nebenniere produziert und scheint auf Grund identischer Substratspezifität eine ähnliche Funktion wie MVDP zu erfüllen. Im *Vas deferens* wird jedoch FR-1 Protein nicht gebildet.

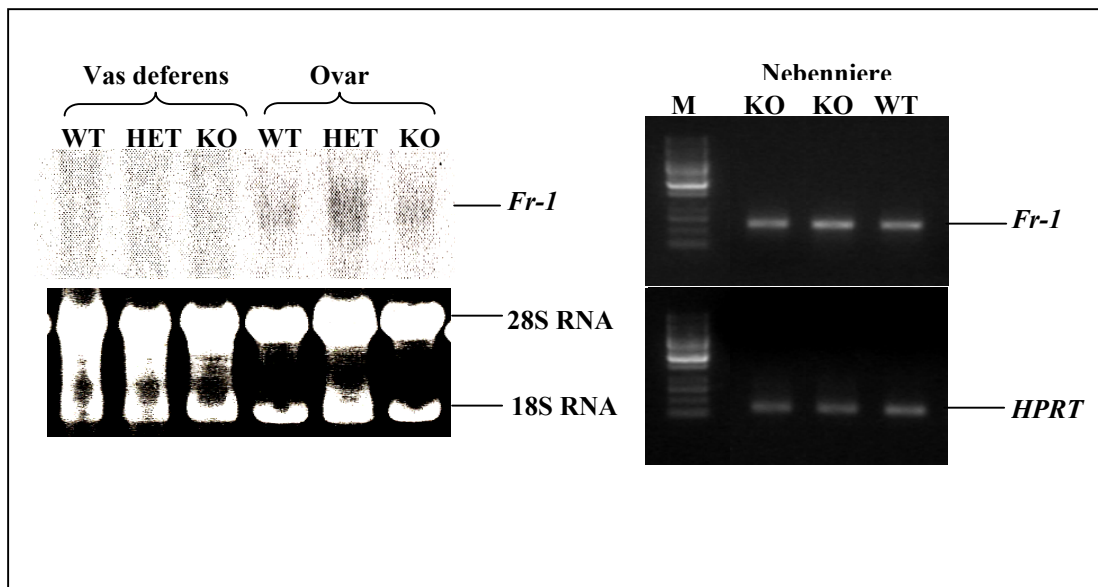


Abb. 3.43: Northern Blot bzw. RT-PCR spezifisch für *Fr-1*

RNA-Präparationen aus Wildtyp- (WT), heterozygoten (HET) und homozygoten (KO) Knockout-Tieren. Ladekontrollen : 18S/28S-RNA für Northern Blot und *HPRT* für RT-PCR.

Weder durch RT-PCR- noch durch Northern Blot-Analysen (Abbildung 3.43) konnte eine verstärkte *FR-1*-Expression bei MVDP-Knockout-Tieren gezeigt werden. Eine kompensatorische Ersatzfunktion von *FR-1* bleibt in Organen, die beide Proteine exprimieren und nach Induktion pathophysiologischer Stresszustände dennoch möglich. Bei Knockout-Tieren konnte jedoch keine *FR-1*-Expression im *Vas deferens* nachgewiesen werden, d.h., dass zumindest für dieses Organ kompensatorische *FR-1*-Wirkungen ausgeschlossen sind.