

4 DISKUSSION

Zur funktionellen Analyse unbekannter Genfunktionen schöpft die Wissenschaft heute aus einem experimentellen Spektrum, das von klassischen biochemischen Methoden über zellbiologische und molekularbiologische *in vitro* und *in vivo* Techniken der Zellkultur oder der transgenen Tiermodelle bis hin zu „*in silico*“ Simulationen und Recherchen der Bioinformatik reicht. Die jeweils erzielbaren Einzelergebnisse bilden dabei wertvolle Bestandteile der funktionellen Gesamthypothese. Jedoch bleibt zu beachten, dass diese Verfahren in unterschiedlich starkem Ausmaß die natürliche *in vivo* Situation manipulieren bzw. abstrahieren. Die Knockout-Technologie gilt in diesem Zusammenhang als experimentelle Möglichkeit, die eine funktionelle Untersuchung im Kontext des Gesamtorganismus erlaubt und Gelegenheit zur Überprüfung bzw. zur Erweiterung bislang erarbeiteter Hypothesen bietet. Die postulierte Funktion und die Bedeutung des MVDP-Proteins für den murinen Organismus sollten daher im Zuge der vorliegenden Arbeit durch Generierung eines Knockout-Modells verifiziert werden.

4.1 Strategische Überlegungen zum Knockout-Modell

Eine der ersten Entscheidungen, die im Vorfeld der Generierung eines Gen-Knockouts getroffen werden müssen, ist die Festlegung des zu deletierenden Bereiches. Die meisten eukaryontischen Gene weisen eine chromosomale Struktur auf, bei der mehrere kodierende Exons von nicht-kodierenden intronischen Sequenzen unterbrochen sind. Für den Fall, dass der gesamte genomische Bereich des interessierenden Gens deletiert werden soll, ergeben sich aus diesem Charakteristikum eine Reihe potentieller Nebeneffekte. So ist z.B. seit langem bekannt, dass intronische Sequenzbereiche Quellen nicht-kodierender RNA oder Träger transkriptionsregulatorischer Elemente sein können (Übersichtsartikel Fedorova und Fedorov 2003). Die Wirkung dieser intronischen Regulationselemente muß jedoch nicht auf die Expression des zugehörigen Gens begrenzt sein, sondern kann andere, weiter entferntere Gene betreffen. Im *Mvdp*-Gen enthält das circa 3000 bp lange Intron 1 z.B. zwei die Expression im *Vas deferens* verstärkende Motive (Martinez *et al.* 1999). Es ist daher bei der Festlegung der Größe des Deletionsbereiches von besonderer Bedeutung sorgfältig zwischen dem mindestens erforderlichen und dem unbedingt nötigen Eingriff in die chromosomale Region abzuwägen, um Nebeneffekte zu vermeiden.

Alternativ zur Exzision eines gesamten Gens unterscheidet man einerseits die Deletion der Exons, die für funktionell bedeutende Proteinregionen kodieren oder andererseits die Inaktivierung des Startkodons der Translation im Exon 1. Letzteres sollte die Proteinexpression vollständig verhindern. Allerdings wurden für viele Gene alternative Transkriptionsstartpunkte beschrieben, die besonders häufig im ersten Intron zu finden sind. Durch Zerstörung des ATG-Startkodons in Exon 1 kann daher eine mögliche alternative Translation nicht verhindert werden.

Wegen der beschriebenen Vor- bzw. Nachteile der verschiedenen Deletionsstrategien und der bekanntermaßen hohen Homologie zwischen dem *Mvdp*-Gen und anderen Aldo-Keto-Reduktasen erfolgte die Inaktivierung des Gens im Zuge der vorliegenden Arbeit durch die Deletion des chromosomalen Bereiches, der für einen Großteil der funktionell-essentiellen Aminosäure-Reste für die Substratbindung kodiert (Abbildung 3.1 im Ergebnisteil; Jez *et al.* 1997, Hyndman *et al.* 2003). Der direkte Sequenzvergleich zwischen verschiedenen Mitgliedern der Aldo-Keto-Reduktasen-Superfamilie (Tabellen 8.1 und 8.2 und Abbildung 8.2 im Anhang) verdeutlicht die starke Konservierung der funktionell bedeutenden Aminosäuren. Im Zuge der Gendeletion wurde die kodierende Sequenz für mehr als zwei Drittel dieser Aminosäuren entfernt. Eine zurückbleibende Restfunktionalität des Proteins ist daher unwahrscheinlich.

4.2 Das MVDP-Protein und seine hypothetische Wirkung

Mit der Entdeckung des MVDP-Proteins im Jahre 1986 als das am stärksten exprimierte Protein im *Vas deferens* der Maus (Taragnat *et al.* 1986) und der nachfolgenden Lokalisierung in der Nebenniere (Lau *et al.* 1995) und im *Ovar* (Brockstedt *et al.* 2000) entstand die Frage nach der physiologischen Bedeutung im murinen Organismus. Die Identifikation der genomischen Organisation und der DNA-Sequenz offenbarte enge strukturelle Homologien zu bereits besser charakterisierten Enzymen und begründeten die Zuordnung des Enzyms zur Superfamilie der Aldo-Keto-Reduktasen (Lau *et al.* 1995; Pailhoux *et al.* 1990; Daoudal *et al.* 1995, Gui *et al.* 1995), deren Funktion in der Umsetzung verschiedener Glukose-, Steroid- und Peroxidationsmetabolite liegt. Als Substrate des MVDP-Proteins konnten mittels *in vitro* Enzymaktivitäts-Assays dabei vor allem das als Nebenprodukt der Steroidbiosynthese entstehende Isocaproaldehyd (Burstein und Gut 1971) und das bei Lipidperoxidationen

gebildete 4-Hydroxynonenal (Poli *et al.* 1985; Esterbauer *et al.* 1991) identifiziert werden (Lefrancois-Martinez *et al.* 1999; Peters-Kottig 2001). Beide Metabolite sind als außerordentlich zytotoxische Verbindungen bekannt, zu deren Beseitigung in der Zelle verschiedene detoxifizierende Mechanismen Anwendung finden. Mitglieder der Aldo-Keto-Reduktasen-Superfamilie sind an diesen Mechanismen ebenso beteiligt wie Glutathion-S-Transferasen, Alkohol-Dehydrogenasen, Acetyl-Transferasen oder das Proteasom (Alary *et al.* 2003a, 2003b).

Die Analyse der Expressionsorte des MVDP-Proteins verdeutlichte einen engen Zusammenhang zwischen Steroidhormon-produzierenden Zelltypen und der Lokalisation bzw. dem zeitlichen Auftreten des Enzyms. Allerdings konnte eine *Mvdp*-Expression nicht für sämtliche steroidogenen Gewebe, z.B. *Granulosa*-Zellen des Ovars, *Corpora lutea* oder die Plazenta beschrieben werden. Das Expressionsmuster des Gens beschränkt sich hauptsächlich auf die Corticosteron-produzierenden Zellen der *Zona fasciculata* der Nebenniere (Lau *et al.* 1995) und auf die Sexualhormone-synthetisierenden *Theca*- und Stromazellen des Ovars (Brockstedt *et al.* 2000). Die Entdeckung des Enzyms erfolgte jedoch vor allem wegen seines außerordentlich großen Anteils am Proteingehalt des Samenleiter-Lumens der Maus. Das *Vas deferens* wird jedoch im Gegensatz zu den anderen Expressionsorten des MVDP-Proteins nicht mit Steroidsynthesen in Zusammenhang gebracht.

Zellkulturexperimente (Manin *et al.* 2000, Aigueperse *et al.* 2001, Martinez *et al.* 2001; Val *et al.* 2002a) und transgene Tiermodelle (Martinez *et al.* 1999; Sahut-Barnola *et al.* 2000; Val *et al.* 2002b) dienen der Identifizierung der Expressions-Kontrollmechanismen, denen das *Mvdp*-Gen unterliegt. Seine Promotorelemente erlauben die Regulation durch Faktoren, die auch die Expression der Steroidbiosynthese-Enzyme steuern.

Die Expression des *Mvdp*-Gens in steroidogenen Geweben, seine Substratspezifität für Steroidsynthese-Nebenprodukte und seine postulierte regulatorische Verknüpfung mit Steroidbiosynthesen weisen auf eine enge Kopplung an diesen Prozess hin. Die Substratspezifität für 4-HNE legt zudem eine Rolle des Enzyms bei Lipidperoxidationen nahe. Die Resultate dieser experimentellen Bestrebungen führten daher zu der Vermutung, dass das Protein wichtigen Anteil an detoxifizierenden Vorgängen haben könnte (Lau *et al.* 1995, Lefrancois-Martinez *et al.* 1999, Martinez *et al.* 2001). Im *Vas deferens* scheint das Protein eine von Steroidbiosynthesen unab-

hängige Funktion zu erfüllen. Dennoch sind das *Vas deferens* und die darin befindlichen Spermien einer Vielzahl zytotoxischer Verbindungen ausgesetzt. Immunfluoreszenz-Untersuchungen des Samenleiters zeigten, dass das MVDP-Protein die Oberfläche der Spermien bedeckt (Taragnat *et al.* 1990) und daher auch im Samenleiter oder nach der Kopulation im weiblichen Genitaltrakt zur Beseitigung zytotoxischer Verbindungen beitragen könnte (Peters-Kottig 2001). Diese Erkenntnisse legten eine bedeutende Rolle des Enzyms in den exprimierenden Organen nahe (Brockstedt *et al.* 2000).

4.3 MVDP-Knockout-Mäuse als Modelle der *in vivo*-Genfunktion

Zur Untersuchung der Proteinfunktion *in vivo* wurden im Zuge der vorliegenden Arbeit erstmals Knockout-Modelle des MVDP-Proteins generiert. Durch Einsatz der Cre/*loxP*-Technologie konnte zum einen ein Maus-Modell mit ubiquitärer Deletion des MVDP-Proteins, das heißt ein konventioneller Knockout, erzeugt werden. Das zweite Maus-Modell ermöglicht die gewebe- und entwicklungsspezifische Deletion des Gens durch Verpaarung der Tiere mit spezifischen transgenen Stämmen (konditionelles Modell). Geeignete transgene Mauslinien zur Beschränkung der Gendeletion auf *Theca interna*-Zellen des *Ovars* (konditioneller Knockout) standen zum Zeitpunkt der Fertigstellung der Knockout-Modelle nicht zur Verfügung. Die durchgeführten Analysen zur Beschreibung des Phänotyps konzentrierten sich daher auf das konventionelle Knockout-Modell, welches keiner weiteren Verpaarung unterzogen werden mußte.

Die postulierte detoxifizierende Funktion des MVDP-Proteins bildete neben der Bestimmung verschiedener Parameter die maßgebliche Grundlage zur Auswahl der Phänotypisierungsexperimente. Besondere Aufmerksamkeit galt daher zunächst der Lebensfähigkeit der generierten konventionellen Knockout-Tiere. Diesem Modell haftete wegen der starken Expression des MVDP-Proteins in der für steroidogene Vorgänge essenziellen Nebenniere die Vermutung an, dass das Fehlen des Proteins während der Embryonalentwicklung eventuell nicht mit dem Leben vereinbar sein könnte.

Die statistische Auswertung der Häufigkeiten, mit denen die drei verschiedenen Genotypen Wildtyp, heterozygot und homozygot Knockout unter den Nachkommen

heterozygoter Eltern vorkommen, ergab keine Abweichungen vom erwarteten Mendel'schen Vererbungsmuster (Abschnitt 3.2.2). Untersucht wurde dies für die Nachkommenschaften aller drei zur Herstellung chimärer Tiere verwendeten Zelllinien, um auszuschließen, dass unerkannte chromosomale Veränderungen, oder Doppelintegrationen das Erscheinungsbild der charakterisierten Linie veränderten. Zudem schienen die Tiere keine äußerlichen, pathologischen Veränderungen aufzuweisen. Ein Einfluss des MVDP-Proteins bzw. seines Fehlens auf die Embryonalentwicklung oder eine essentielle Rolle während der ersten Lebensphase ist jedoch beim konventionellen Modell dennoch nicht ausgeschlossen. Könnten doch kompensatorische Proteine die Funktion des Proteins im Verlauf der Embryonalentwicklung oder auch erst nach der Geburt übernommen haben. Aus diesem Grund erscheint die weitere Bemühung, selbst geeignete transgene Mäuse zur gewebespezifischen Deletion von MVDP im adulten Tier zu generieren, sehr lohnenswert.

4.4 MVDP-Knockout-Tiere zeigen geschlechtsspezifisch eine erhöhte Mortalität und Veränderungen der Steroidhormonwerte

Trotz des Ausbleibens erkennbarer pathologischer Prozesse und der scheinbar normalen Entwicklung der Tiere bis in das Erwachsenenalter hinein zeigten männliche Tiere eine signifikant erhöhte Mortalitätsrate (Abschnitt 3.2.2.6), wobei die betroffenen Tiere jeweils ohne äußerliche Krankheitszeichen und daher gänzlich unerwartet starben. Die Todesfälle beschränkten sich zudem weder auf bestimmte Altersgruppen noch auf die Nachkommen nur einer der drei verwendeten Linien. Initiale histologische Untersuchungen an überlebenden und verstorbenen Tieren ergaben keine pathologischen Veränderungen der MVDP-exprimierenden Organe. Auf Grund der Signifikanz der Mortalitätsrate muss jedoch geschlossen werden, dass die Deletion des MVDP-Proteins eine geschlechtsabhängige Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit verursacht, die jedoch nicht jedes Tier betrifft und daher offenbar an bisher unbekannte Faktoren gekoppelt ist.

Die zur Charakterisierung herangezogenen Nachkommen der F1-Generation sind hinsichtlich des genetischen Hintergrundes auf Grund des 1:1 Mischungsverhältnisses der Elterngeneration zwischen den Stämmen 129 und C57Bl6 sehr heterogen. Diese Heterogenität könnte für abweichende Erscheinungsbilder bei vergleichenden Analysen von Geschwistertieren verantwortlich sein. Konsequente Rückkreuzung

der Tiere in einen der beiden Stämme über 8 bis 9 Generationen (1-2 Jahre) hinweg wird diese Effekte in zukünftigen Untersuchungen vermindern helfen.

Des Weiteren wurden, veranlasst durch die vermutete Bedeutung des Proteins bei Steroidbiosynthese-Prozessen, Serumkonzentrationen verschiedener Steroidhormone bestimmt (Abschnitt 3.2.2.5). Der Basalpegel des murinen Hauptcorticoids Corticosteron zeigte bei männlichen Tieren eine signifikante Erhöhung, wohingegen sich die Basalwerte weiblicher Tiere nicht von denen der Wildtyp-Kontrollgruppe, jedoch durch zehnfache Erhöhung von den Werten der Männchen, unterschieden. Bekannt ist, dass die Corticosteronpegel weiblicher Tiere Schwankungen unterliegen, die im Zusammenhang mit dem Östruszyklus stehen (Nichols und Chevins 1981). Aus diesem Grund wurden Zyklusphasenbestimmungen täglich über mehrere Wochen durchgeführt, um sicherzustellen, dass die verwendeten Tiere regelmäßige Östruszyklen aufwiesen und damit Verfälschungen durch Hormonwerte azyklischer Tiere vermieden wurden. Im Stadium Metöstrus erfolgte die Blutabnahme zur Serumgewinnung. Verfälschungen durch Hormonwerte unsynchronisierter Tiere sind daher ausgeschlossen.

Nach Induktion eines starken Stresszustandes durch 40-minütige Immobilisierung konnten Serumkonzentrationen dieses Hormons gemessen werden, die sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Tieren mit den Kontrollgruppen vergleichbar waren (Abschnitt 3.2.3.2). Die Vermutung, unerwartete, plötzliche Todesfälle könnten in einer Unfähigkeit der männlichen Knockout-Tiere auf akute Stresssituationen zu reagieren begründet sein, konnten durch diesen externen Stimulus nicht bestätigt werden.

Auf Grund der postulierten Funktion des MVDP-Proteins als detoxifizierendes Enzym überraschten die beobachteten Serumkonzentrationen. Das Fehlen eines bedeutenden Bestandteils eines Entgiftungsmechanismus würde vermutlich zu Funktionsstörungen des betroffenen Organs oder mit ihm in Verbindung stehenden Organen führen. Erwartet waren aus diesem Grund keineswegs erhöhte, sondern vielmehr erniedrigte Hormonwerte. Basalwert-Bestimmungen von Stresshormonen unterliegen der Gefahr, das Ergebnis durch die Manipulation am Tier bzw. durch störende Einflüsse im Vorfeld der Probennahme zu verfälschen. Die Reaktion auf Stressoren der Umwelt erfolgt dabei innerhalb kürzester Zeit und resultiert in starker Stresshormonausschüttung (Cohen 1992, James *et al.* 1995, Young 1995).

Zur Vermeidung solcher Effekte wurden die Tiere per Blindanalyse zügig ihrer gewohnten Umgebung entnommen, mittels zervikaler Dislokation getötet und zur finalen Blutentnahme präpariert. Das Zeitintervall zwischen erstem Kontakt und Beendigung der Blutgewinnung wurde auf höchstens 45 Sekunden begrenzt. Es ist daher anzunehmen, dass die beobachteten Hormonkonzentrations-Veränderungen bei männlichen Knockout-Tieren echte Auswirkungen der Gendeletion des MVDP-Proteins darstellen. Legt man die bei Wildtyp-Tieren gemessenen Werte im Ruhezustand und nach Stressinduktion zu Grunde, führt die Aktivierung der Stressachse zu einer rund zehnfachen Erhöhung der Hormonkonzentration. Die Basalwerte der Knockout-Männchen weisen in der Gegenüberstellung zum Wildtyp eine etwa dreifache Erhöhung auf, die im Vergleich zum akuten Stresszustand durchaus als chronischer Stresszustand bezeichnet werden könnte. Eventuell könnte die Ursache dieser erhöhten basalen Corticosteronkonzentration mit einer vermehrten ACTH-Ausschüttung, mit veränderten Rückkopplungsmechanismen oder mit Störungen der zirkadianen Rhythmik bei Knockout-Männchen in Zusammenhang stehen. ACTH-Stimulations- oder Dexamethason-Suppressionstests könnten helfen Funktionsstörungen des Nebennieren-Cortex weiter aufzuklären.

Stellt man bei Weibchen die gemessenen basalen Corticosteronwerte denen nach Induktion des akuten Stresszustandes gegenüber, wird deutlich, dass keine weitere Erhöhung stattfindet. Beide Werte liegen in etwa gleich hoch und sind zudem mit den Messwerten der Männchen nach Immobilisierungsstress vergleichbar. Daher ist anzunehmen, dass weibliche Tiere trotz mehrwöchiger Gewöhnung an die tägliche Zyklusbestimmung auf diese Untersuchung mit einer sehr starken Stresshormon-Ausschüttung im Vorfeld der Blutabnahme reagieren. Es kann folglich nicht ausgeschlossen werden, dass bei weiblichen Tieren ähnliche Basalwert-Erhöhen des Corticosterons vorliegen, wie sie bei Männchen beobachtet werden konnten. Durch die Bestimmung der Hormonwerte ohne vorherige Zyklusbestimmung könnte der Einfluß dieses Stressors vermieden werden, allerdings wären dann sehr große Tierzahlen erforderlich, um durch postmortale Zyklusbestimmung ausreichend große Versuchsgruppen einheitlicher Östrusstadien zu gewährleisten.

Die charakteristischen Konzentrationsschwankungen der Geschlechtshormone während des Östruszyklus weiblicher Tiere wurden, wie bereits erwähnt, durch Bestimmung der Zyklusstadien vermieden. Östradiol und Progesteron erfahren starke Konzentrationserhöhungen während bzw. im Anschluss an die Ovulation im

Östrusstadium. Der Metöstrus schließt sich an die Zyklusphase des Östrus an und ist im Vergleich zu dieser durch relativ niedrige Hormonwerte gekennzeichnet. Die Ergebnisse der Testosteron-Bestimmung bei weiblichen und männlichen Tieren zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die Werte des Geschlechtshormons Östradiol lagen für beide Versuchsgruppen unterhalb der Nachweisgrenze. Progesteronmessungen bei weiblichen Tieren machten hingegen signifikant erhöhte Werte bei Knockout-Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern deutlich.

Die gemessene zweifache Erhöhung der Progesteronkonzentration im Serum weiblicher Knockout-Mäuse scheint wie der basale Corticosteronwert der Knockout-Männchen in der Deletion des MVDP-Proteins begründet zu sein.

Progesteron wird hauptsächlich nach der Ruptur des Graaf'schen Follikels vom sich bildenden *Corpus luteum* sezerniert. Weitere Progesteron-bildende Gewebe sind die Plazenta und in geringerem Maß der *Testis*, *Theca*-Zellen früher Follikelstadien und die Nebennieren weiblicher und männlicher Tiere. Daher kommen als verursachende Gewebe für die gesteigerte Progesteronkonzentration sowohl *Theca*-Zellen früher Follikelstadien, *Corpora lutea* des Ovars als auch die *Zona fasciculata* und die *Zona glomerulosa* der Nebenniere in Frage. Östradiol hingegen wird vor allem vor der Ovulation von den *Granulosa*-Zellen der wachsenden und reifenden Follikel gebildet wohingegen das *Corpus luteum* Östradiol nur in geringen Mengen synthetisiert. Das Verhältnis zwischen Östradiol und Progesteron verändert sich daher während des Zyklus auf charakteristische Weise. Es steigt an solange der Follikel wächst, fällt während der Ovulation abrupt ab und steigt erneut an, wenn durch das Ausbleiben der Schwangerschaft der Gelbkörper durch Luteolyse zurückgebildet wird. Von großem Interesse ist daher, wie sich der Serumspiegel des Östradiols im Vergleich zum erhöhten Progesteronwert bei MVDP-Knockout-Weibchen verhält. Die Bestimmung der Östradiolkonzentration führte jedoch nicht zu einem verwertbaren Ergebnis, was die Interpretation des erhöhten Progesteronspiegels erschwert. Zudem könnte die Konzentrationsbestimmung beider Hormone in verschiedenen Zyklusstadien Aufschluss darüber geben, ob die Progesteronpegel-Erhöhungen allein im Metöstrus oder in sämtlichen Phasen vorliegen. Als physiologische Folgen der Progesteronwirkung gelten u.a. die Vorbereitung des Organismus auf die Schwangerschaft und die Erhaltung dieser. Die Steigerung der Wasser- und Salzausscheidung und eine trägere Verdauung sind zusätzliche Merkmale, die zur weitergehenden Charakterisierung der weiblichen Knockout-Tiere herangezogen werden könnten

(Cross *et al.* 1994, Petrides 1998). Der bereits erwähnte Einfluss des Östruszyklus auf die Corticosteronsekretion in der Nebenniere wirft zudem die Frage auf, ob durch Konzentrationsbestimmungen dieses Stresshormons in verschiedenen Zyklusphasen Unterschiede zwischen weiblichen Knockout- und Wildtyp-Tieren zu Tage treten könnten.

Zum Zeitpunkt der Hormonbestimmungen wiesen die Tiere ein Alter von 3 bis 4 (Weibchen) bzw. 5-6 (Männchen) Monaten auf. Denkbar ist, dass sich die beobachteten Effekte mit zunehmendem Alter weiter verstärken oder verschwinden könnten. Konzentrationsvergleiche unterschiedlicher Altersgruppen könnten daher in zukünftigen Experimenten nähere Einblicke gewähren.

4.5 MVDP-Knockout-Tiere sind fertil und zeigen keine Veränderungen im Paarungsverhalten

Auf Grund der Expression des MVDP-Proteins im Epithel des *Vas deferens* und in *Theca*-Zellen des Ovars wurde postuliert, dass das Fehlen des Enzyms in diesen Organen Störungen der Reproduktionsfunktionen zur Folge haben könnte. Knockout-Tiere beider Geschlechter wurden daher mit Wildtypmäusen verpaart und die Frequenz der Schwangerschaften, der Würfe und weiterhin die Wurfgrößen überwacht (Abschnitt 3.2.2.8). Weder männliche noch weibliche Knockout-Tiere zeigten eine verminderte Fertilität. Die Wurfhäufigkeit und die Zahl der Jungtiere pro Wurf waren mit den Ergebnissen der Verpaarungen von Wildtyp-Geschwistern vergleichbar. Die Überprüfung der Kopulationen erfolgte zu Beginn durch die Beobachtung von Vaginalpfröpfen, die sich aus Ejakulat und Vaginalflüssigkeit bilden. Dabei konnten jedoch bei Knockout-Tieren keinerlei Abweichungen hinsichtlich der Kopulationsfrequenz festgestellt werden. Verhaltensabnormalitäten wurden daher ausgeschlossen.

Der Östruszyklus der Maus wiederholt sich circa alle 4 Tage. Da das MVDP-Protein in *Theca*-Zellen nur während weniger Stunden im Verlauf eines Zyklus exprimiert wird, stellte sich die Frage, ob sich eventuell Fertilitätseffekte abzeichnen könnten, wenn die Tiere vor der ersten Verpaarung vielfache Östruszyklen durchlaufen haben. Die sofortige Verpaarung der Tiere nach Erreichen der Geschlechtsreife hätte durch die Dauer der Schwangerschaften langfristige Effekte der Gendelektion maskieren können. Getestet werden sollte daher, ob das ständige Durchlaufen von Östruszyklen

alle vier Tage im Gegensatz zur nur alle drei Wochen stattfindenden Ovulation bei Dauerverpaarungen einen Langzeiteffekt des MVDP-Knockouts offenbaren könnte. Die Beobachtung des Reproduktionserfolgs von Weibchen nach Verpaarungen im Alter von 5 Monaten widersprechen jedoch dieser Theorie (Daten nicht gezeigt). Das Fehlen des MVDP-Proteins hatte daher weder bei weiblichen Tieren im *Ovar* noch bei männlichen Tieren im *Vas deferens* Einschränkungen der Fertilität zur Folge. Im Zusammenhang mit den Hormonbestimmungen kann somit geschlussfolgert werden, dass die Erhöhung des Progesteronspiegels der Knockout-Weibchen keinen Einfluss auf das Reproduktionsvermögen zu haben scheint.

Die murine Reproduktionsfähigkeit gilt im Vergleich zu anderen Spezies, z.B. dem Menschen, als „super-fertil“ (Übersichtsartikel Christian 1971). Das heißt, dass ungeachtet möglicherweise vorhandener leichter Fertilitätsstörungen durch die große Zahl ovulierter Eizellen bzw. ejakulierter Spermien der Reproduktionserfolg trotzdem unverändert erscheint. Zur Identifizierung eventueller, leichter Funktionsstörungen wurden männliche Tiere einer Spermienanalyse und weibliche Tiere einer Zyklusverlaufs-Überwachung und einer Follikelstadien-Bestimmung unterzogen (Abschnitte 3.2.2.10 und 3.2.2.11). Weibliche Knockout-Tiere zeigten in ihrer Mehrzahl unauffällige Östruszyklen, die sich von den bei Wildtyp-Geschwistern Beobachteten nicht unterschieden. Auch die Verteilung und Häufigkeit der einzelnen Follikelstadien gab keinen Anlass zu vermuten, dass bei weiblichen Tieren das Fehlen des MVDP-Proteins nach dem ovulatorischen LH-Anstieg zu veränderten Reproduktionsfunktionen führt und widerlegt somit die Hypothese der essenziellen Bedeutung des Enzyms bei Ovulationsprozessen.

Die Untersuchung der aus dem Nebenhoden und dem *Vas deferens* präparierten Spermatozoen hinsichtlich ihrer Zahl und Beweglichkeit resultierte in einem weitgehend unauffälligen Erscheinungsbild bei Knockout-Männchen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Lediglich der Prozentsatz beweglicher Spermien, weniger jedoch ihre anhand einer Skala von 0 (nicht beweglich) bis 3 (sehr beweglich) bewertete Gesamtmotilität im *Vas deferens* zeigte sich leicht vermindert. Allerdings könnten weitergehende Untersuchungen an einer eventuell größeren Versuchsgruppe signifikante Motilitätsstörungen deutlich machen. Es kann daher zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass das Fehlen des MVDP-Proteins im *Vas deferens* zu subtilen Funktionsstörungen führt, die jedoch durch die große Anzahl intakter Spermatozoen keine Auswirkung auf die Fertilität der Tiere hat. Durch Rückkreuzung der

Knockout-Tiere in den genetischen Hintergrund eines Mausstammes mit natürlicherweise geringerer Fertilität, z.B. 129 Ola, könnte die beobachtete leichte Motilitätsreduktion eventuell auch durch einen verminderten Reproduktionserfolg Ausdruck erlangen (Threadgill *et al.* 1995, Silver 1995).

4.6 MVDP-Knockout-Tiere zeigen geschlechtsabhängige Veränderungen der Körpergewichtsentwicklung

Im Zuge der allgemeinphysiologischen Charakterisierung der Tiere konnten Unterschiede in den Körpergewichtsentwicklungen ab einem Alter von circa vier Monaten festgestellt werden (Abschnitt 3.2.2.4). Die Gewichte der Tiere der jeweiligen Versuchsgruppen unterschieden sich zu Beginn der Messungen nicht. Weibliche Knockout-Tiere zeigten im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern signifikant erhöhte Körpergewichte, die nicht durch unterschiedliche Körpergrößen verursacht wurden. Die unveränderte Körpergröße stellt einen Hinweis auf eine Gewichtszunahme durch Erhöhung des Körperfett-Anteils dar. Letztendlich kann diese Frage jedoch nur durch spezifischere Untersuchungen, wie z.B. durch Magnet-Resonanz-Imaging (Majdic *et al.* 2002) beantwortet werden. Männliche Knockout-Tiere wiesen im Gegensatz dazu ein signifikant erniedrigtes Körpergewicht auf. Die Bestimmung der Organgewichte hingegen ergab in diesem Zusammenhang bei MVDP-Knockout-Tieren keine signifikante Abweichung der Organgewichte im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Abschnitt 3.2.2.3).

Da die Nebenniere als sekretorisches Organ von Steroidhormonen unter anderem an metabolischen Vorgängen beteiligt ist, wurde vermutet, dass den beobachteten Gewichtsveränderungen Funktionsstörungen der Nebenniere zu Grunde liegen. Nähere Einblicke sollten durch exogene Einflussnahme auf die Nahrungszufuhr gewonnen werden (Saito und Bray 1984, Dubuc und Carlisle 1988, Babu *et al.* 2002). Die Stimulation von Stoffwechselprozessen durch 24-stündigen Nahrungsentzug und ihre Wirkung auf die Körpergewichts-Veränderung zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Knockout- und Wildtyp-Tieren beider Geschlechter.

Die Kontrollmechanismen, die die Entwicklung des Körpergewichts regulieren sind vielgestaltig und bis heute wenig verstanden. Grundsätzlich werfen Abweichungen des Körpergewichts Fragen auf, die sich auf physische Aktivitätsveränderungen

beziehen. Fraglich ist dabei nach wie vor, ob Aktivitätsschwankungen zu Körpergewichtsveränderungen führen oder *vice versa* die Dysregulation des Körpergewichts schließlich die erhöhte bzw. verminderte Aktivität begründet. Unstrittig scheint zu sein, dass das Verhältnis von Gewicht und Aktivität gegensätzlich gerichtet ist (Tou und Wade 2002).

Geschlechtsdimorphismen der Körpergewichtsentwicklung werden u.a. durch Geschlechtshormone hervorgerufen. Östrogene z.B. wirken auf den Stoffwechsel anabol (Petrides 1998). Die höheren Körpergewichte bei weiblichen Knockout-Tieren könnten daher einen Hinweis auf eine parallel zum Progesteron gesteigerte Östrogensynthese darstellen. Glukocorticoid-Homone stehen ebenfalls im Zusammenhang mit dem Körpergewicht. Die geschlechtsspezifisch inverse Entwicklung der Körpergewichte könnte daher auch in Verbindung mit den erhöhten Corticosteronwerten der männlichen Knockout-Tiere stehen. Diese könnten eventuell Aktivitätssteigerungen verursachen, die durch vermehrte Lipolyse und Gluconeogenese die Gewichtsreduktion im Vergleich zu Wildtyp-Tieren bewirkt.

Die Wirkung der Glukocorticoide auf die Nahrungsaufnahme und metabolische Vorgänge ist bidirektional in Abhängigkeit von der Glukocorticoidkonzentration. So wirken hohe pharmakologische Dosen auf den Organismus stark katabol, wohingegen physiologische Konzentrationen vielmehr anabole Effekte zeigen (Devenport *et al.* 1989). Dieses duale Wirkprinzip entsteht durch Einbeziehung unterschiedlicher Kontrollparameter. Für hohe Dosen an Glukocorticoiden ist bekannt, dass sie über einen molekularen Mechanismus mit dem Promotor des Leptingens, eines Sensorhormons des Fettstoffwechsels, interagieren können (Licinio *et al.* 1997, Leal-Cerro *et al.* 2002), bei dem der eigentliche Glukocorticoidrezeptor nicht involviert ist. Glukocorticoide selbst entfernen dabei einen Repressor der Leptinexpression vom Promotor und stimulieren so die Synthese des Hormons, welches im allgemeinen in katabole Vorgänge involviert ist (de Vos *et al.* 1998).

Voraussetzung dafür ist, dass die Hormonsekretion hoch genug ist, um den nicht-klassischen Wirkmechanismus am Leptin-Gen zu ermöglichen. Inwiefern die dreifache Erhöhung der Corticosteronwerte bei männlichen Knockout-Tieren ausreicht, um eine Aktivierung dieses alternativen Wirkmechanismus zu erreichen, ist fraglich und könnte die Grundlage weitergehender Experimente darstellen.

An Hand der vorliegenden Messdaten kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass unter Umständen die Glukocorticoidwerte der Knockout-Tiere z.B. zu anderen Tageszeiten inverse Verhältnisse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren aufweisen. Die diurnale Rhythmik der Glukocorticoid-Sekretionsleistung ist hinlänglich bekannt (Aschoff 1963, Hawkins *et al.* 1975). Die Probennahme für die Hormonbestimmungen erfolgte zwischen 8 und 9 Uhr morgens. Da Nagetiere nachtaktive Säuger sind, fiel damit dieser Zeitpunkt in eine Ruhephase mit eventuell erniedrigten Hormonpegeln im Vergleich zu aktiveren Phasen. Interessant wären daher in diesem Zusammenhang Hormonmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten im Tages- bzw. Nachtverlauf. Eine Untersuchung der metabolischen Leistungen im Stoffwechselkäfig bzw. des Aktivitätsverhaltens könnte darüber hinaus näheren Einblick in den Energiehaushalt der Knockout-Tiere gewähren. Da die metabolischen Effekte bei MVDP-Knockout-Tieren beiderlei Geschlechts erst im Alter von vier Monaten zu Tage traten, sind für zukünftige Untersuchungen weitere Hormonkonzentrationsmessungen vor allem bei älteren Tieren angeraten. Glucosetoleranztests, die durch die Überwachung des Blut-Glucosespiegels nach Verabreichung einer hochprozentigen Zuckerlösung gekennzeichnet sind, könnten u.a. dazu beitragen, metabolische Dysfunktionen bei MVDP-Knockout-Tieren festzustellen.

4.7 Weibliche Knockout-Mäuse weisen verbreiterte *Zonae fasciculatae* auf

Auf Grund des bei allgemein-histologischen Untersuchungen aufgetretenen Verdachts, die Gewebearchitektur der Nebennieren der Knockout-Tiere könnte verändert sein, wurden morphometrische Messungen der Schichtdicken durchgeführt. Im Ergebnis dieser konnte bei weiblichen Knockout-Tieren eine signifikante Verbreiterung sowohl der *Zona fasciculata* als auch der *Zona glomerulosa* festgestellt werden (Abschnitt 3.2.2.2). Bei männlichen Tieren wiesen diese Zonen der Nebenniere hingegen keine Veränderungen auf. Das Fehlen des MVDP-Gens scheint daher wiederum geschlechtsabhängig zu einem Zuwachs von rund 30 % bzw. 10% der beiden äußeren Nebennieren-Schichten ohne Veränderung der Gesamtorgan-Größe zu führen, wobei die Unterscheidung zwischen hypertrophem und hyperplastischem Wachstum bei solch relativ geringen Veränderungen mit Hilfe molekularer Marker wie z.B. Pref-1 (preadipocyte factor-1) für adrenokortikale Vorläuferzellen oder

mittels PCNA (proliferating cell nuclear antigen)-Färbung für proliferative Prozesse erfolgen sollte und daher Ziel zukünftiger Experimente sein könnte.

Die Regulation des Nebennierenwachstums unterliegt einer komplexen und multifaktoriellen Kontrolle, die sowohl hormonelle als auch neurale Funktionsprinzipien einschließt. Mindestens zwei mögliche Mechanismen könnten der hier beobachteten Größenveränderung zu Grunde liegen. Denkbar ist zum einen ein kompensatorisches Wachstum als Resultat defekter Rückkopplungsmechanismen (Schmid *et al.* 1995) oder zum Ausgleich mangelnder Organfunktion, wie es z.B. nach unilateraler Adrenalectomie durch einsetzende Hypertrophie und Hyperplasie beschrieben wurde (Beuschlein *et al.* 2002). Gleichwohl könnte hingegen auch die eingeschränkte Funktionstüchtigkeit eines wachstumshemmenden bzw. eines wachstumsstimulierenden Mechanismus während der Entwicklung des Organs für die Vergrößerung der Schichten verantwortlich sein (Sadovsky *et al.* 1995).

Die gesteigerte Progesteron-Sekretion bei weiblichen Knockout-Tieren könnte daher Ausdruck einer hyperkompensatorischen Nebennieren-Funktion sein, die allerdings nicht an erhöhte Corticosteron-Werte gekoppelt ist. Männliche Tiere weisen im Gegensatz dazu erhöhte Stresshormon-Konzentrationen ohne erkennbare Verbreiterungen der Kortexschichten auf. Eine durch gesteigertes Wachstum begründete Überfunktion des Organs scheint daher unwahrscheinlich.

Wachstums- und Differenzierungsprozesse der Nebenniere schließen multiple Faktoren ein, deren Wirkungen zum Teil auch das *Mvdp*-Gen zu betreffen scheinen. So wurden durch Promotoranalysen des Gens verschiedene Sequenzelemente gefunden, die Bindungsstellen solcher Proliferations- und Differenzierungsfaktoren darstellen (Aigueperse *et al.* 2001, Val *et al.* 2002a). Einer dieser Faktoren ist das *Dax-1*-Gen. Es kodiert für ein ungewöhnliches Mitglied der Nukleären Rezeptorfamilie und spielt eine entscheidende Rolle bei adrenalen und gonadalen Differenzierungsprozessen (Zanaria *et al.* 1994). Koexpressionsstudien zeigten, dass DAX-1 durch die Interaktion mit Ribonukleinsäuren suppressive Effekte auf die Genexpression ausüben kann (Zanaria *et al.* 1994, Ito *et al.* 1997, Zazopoulos *et al.* 1997, Crawford *et al.* 1998, Zhang *et al.* 2000). Aigueperse und Kollegen zeigten im Jahre 2001, dass in einer stabil DAX-1-exprimierenden adrenocorticalen Zelllinie im Gegensatz zu untransfizierten Zellen eine *Mvdp*-Expression kaum induziert werden kann.

Neben den Regionen, die cAMP-Induktion vermitteln, wurden Sequenzmotive im *Mvdp*-Promotor gefunden, die nach Bindung des Steroidogenen Faktors (SF-1) zu verstärkter Genexpression führen (Val *et al.* 2002a). Der nukleäre „orphan“-Rezeptor SF-1 wurde als essentieller Faktor der Entwicklung des Nebennieren-Cortex beschrieben (Ikeda *et al.* 1994). Mäuse mit einer Deletion des *Sf-1*-Gens zeigen korrespondierend dazu ein Ausbleiben der Nebennieren-Entwicklung und sterben kurz nach der Geburt (Sadovsky *et al.* 1995). Unilaterale Adrenalectomie an heterozygoten SF-1-Knockout-Mäusen führt darüber hinaus nicht wie unter normalen Umständen zu kompensatorischem Wachstum der verbleibenden Nebenniere (Beuschlein *et al.* 2002). SF-1-Bindestellen wurden auch in den Promotoren verschiedener an Steroidsynthese-Prozessen beteiligter Gene gefunden. So wirkt SF-1 sowohl regulativ auf entwicklungsbiologische Vorgänge als auch auf Stoffwechselprozesse. Die stimulatorische Wirkung von SF-1 und das inhibitorische Verhalten von DAX-1, zweier in die Nebennieren-Differenzierung involvierter Transkriptionsregulatoren, auf die MVDP-Expression veranlasste kürzlich Aigueperse und Kollegen zu der Hypothese, dass Mitglieder der Aldo-Keto-Reduktasen-Superfamilie neben ihren postulierten detoxifizierenden Funktionen bisher unbekannte Angriffspunkte von Regulatoren der Nebennieren-Entwicklung darstellen könnten (Aigueperse *et al.* 2001).

Eine solche Funktion des *Mvdp*-Gens bei Differenzierungsvorgängen ließe sich mit dem beobachteten Phänotyp der Schichtverbreiterung bei weiblichen Knockout-Tieren stützen. Eventuell könnten bei der Deletion des Gens Feedback-Mechanismen ausfallen, deren Funktion in der Regulation von Proliferation oder Differenzierung der Nebennierenschichten liegt. Das Fehlen des beschriebenen Effekts bei männlichen Tieren lässt sich möglicherweise durch die geschlechtsdimorphe DAX-1-Expression in der Nebenniere erklären. Der geschlechtsspezifische Unterschied entsteht durch die inhibitorische Wirkung von Androgenen (Mukai *et al.* 2002) und könnte weitere regulatorische Mechanismen der Nebennieren-Entwicklung betreffen.

Differenzierungsvorgänge der Gonaden sind von SF-1 und DAX-1 ebenso beeinflusst wie die Nebenniere (Sadovsky *et al.* 1995, Yu *et al.* 1998). Bei MVDP-Knockout-Tieren konnten jedoch Veränderungen in der Morphologie der Geschlechtsorgane nicht beobachtet werden. Funktionelle Promotoranalysen der drei im *Mvdp*-Gen gefundenen SF-1-Bindungsstellen deuten darauf hin, dass diese in unterschiedlicher Weise von antagonistischen Repressorkomplexen besetzt werden

können. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass die Regulation des Gens in unterschiedlichen Zelltypen in Abhängigkeit von der Anwesenheit oder der Konzentration eines Repressorkomplexes variiert (Val *et al.* 2002b). Es bleibt daher ein interessanter Aspekt zukünftiger Experimente, zu untersuchen, ob proliferative Dysregulationen auf Grund der MVDP-Gendeletion für die geschlechtsabhängige Ausbildung des Phänotyps verantwortlich sind und ob diese Effekte nur auf die Nebenniere beschränkt sind, oder ob ähnliche, eventuell schwächere Charakteristika auch in den Gonaden auftreten. Denkbar wäre, dass z.B. durch unilaterale Adrenalectomie auch bei MVDP-Knockout-Tieren Veränderungen des kompensatorischen Nebennierenwachstums auftreten.

4.8 Die Induktion inflammatorischer Stresszustände führt bei weiblichen MVDP-Knockout-Tieren zu verstärkter Apoptose in der *Zona fasciculata*

Neben ihren Funktionen bei metabolischen und physischen Stresszuständen ist die Nebenniere wesentlich an der Bewältigung inflammatorischer Prozesse beteiligt (Baxter und Tyrell 1981). Experimentelle Untersuchungen von Immunreaktionen bedienen sich u.a. Induktoren wie Lipopolysaccharide (LPS). Als Bestandteile der äußeren Zellwand gramnegativer Bakterien greifen sie an verschiedenen Punkten des Immunsystems an und modulieren einzelne Parameter in charakteristischer Weise. In ausreichend hoher Dosis gehören LPS zu den Hauptauslösern einer Kaskade pathophysiologischer Reaktionen, die man als endotoxischen Schock bezeichnet (Medzhitov 2001; Underhill und Ozinsky 2002).

Als Antwort auf diese bakteriellen Toxine erfolgt eine Modulation der HPA-Achse durch gesteigerte Ausschüttung von Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) und Expression des CRH-Rezeptors (Radulovic *et al.* 1999). Dies resultiert sowohl in der konsequenten Steigerung der ACTH- und Glukocorticoidkonzentration als auch in der Aktivierung von Makrophagen, Monozyten u.a. Leukozyten (Elkenov und Chrousos 1999). Vor allem Makrophagen sorgen im Weiteren für die massive Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie TNF α , IL-1 β und IL-6 (Tracey *et al.* 1986; Ulich *et al.* 1991; Medzhitov 2001; Underhill und Ozinsky 2002). Glukocorticoide wirken im Vergleich zu den genannten Entzündungsmediatoren hingegen immunsuppressiv, u.a. durch Beeinflussung der nukleären Transkriptionsfaktoren

NF- κ B und AP-1, wobei sowohl durch Inhibition der Expression pro-inflammatorischer Gene als auch über Feedback-Mechanismen auf die HPA-Achse überschießende Immunreaktionen vermieden werden (Zhao *et al.* 2002, Barazzone-Argiroffo *et al.* 2003).

Lipopolysaccharide induzieren überdies die gesteigerte Bildung von Leukotrienen durch β -Oxidation von Arachidonsäure (Schade 1987). Die Leukotriensynthese bewirkt in der Leber, eventuell aber auch in anderen Organen, einen transienten Vasospasmus (Lefer 1986) nach dessen Abklingen die Reperfusion des Gewebes von einer Sauerstoffradikal-Bildung begleitet ist (Übersichtsartikel Grisham und Granger 1989). LPS gelten daher als Induktoren oxidativen Stresses, in dessen Folge es zu weiteren Lipidperoxidationen unter Bildung von z.B. 4-Hydroxynonenal (Davis *et al.* 1997) kommt. 4-HNE gilt als ein bevorzugtes Substrat des MVDP-Proteins (Lefrancois-Martinez *et al.* 1999, Peters-Kottig 2001). Die Detoxifizierung der entstehenden radikalischen Moleküle stellt einen Schlüsselprozess zur Vermeidung apoptotischer oder irreversibler nekrotischer Gewebsschädigungen dar. Beantwortet werden sollte daher die Frage nach der Nebennieren-Funktion der MVDP-Knockout-Tiere hinsichtlich ihrer Fähigkeit, immunreaktiv inflammatorische Reize und induzierten oxidativen Stress zu bewältigen. Die Stimulation des Immunsystems sollte dabei durch eine LPS-Dosis erzielt werden, die nicht zu endotoxischem Schock und dem Tod der Tiere führt. Die Präparation der Organe nach Ablauf von 20 Stunden und die nachfolgende Detektion apoptotischer Zelluntergänge in der Nebenniere, dem *Ovar* und dem Samenleiter ergab, dass vor allem die Nebenniere und insbesondere die *Zona fasciculata* weiblicher Knockout-Tiere Apoptose in größerem Umfang aufwies als die Kontrollgruppe bzw. die männlichen Tiere (Abschnitt 3.2.3.1).

Auf Grund der signifikanten Erhöhung der Apoptoserate bei weiblichen Knockout-Tieren, gestützt durch die Lokalisation der apoptotischen Zelluntergänge in der *Zona fasciculata*, muss geschlussfolgert werden, dass das Fehlen des MVDP-Proteins bei weiblichen Tieren im Gegensatz zu männlichen Tieren für diesen Befund ursächlich ist. Die Wirkung von LPS als Auslöser oxidativen Stresses wurde bereits erwähnt. Es erscheint daher nahe liegend zu postulieren, dass exogene Induktoren einer verstärkten Substratbildung (4-HNE) des MVDP-Enzyms bei Knockout-Tieren leichter zum Untergang der Zellen führen als dies bei Wildtyp-Geschwistern der Fall ist. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Beantwortung der Frage, ob eine LPS-

Dosissteigerung bei Knockout-Weibchen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren zum Einsetzen endotoxischer Schockzustände bereits bei geringeren Dosen führen würde.

Männliche Knockout-Tiere unterschieden sich in ihrer Fähigkeit den LPS-Stimulus zu bewältigen von ihren Kontrolltieren nicht. Ursachen hierfür könnten z.B. in einer höheren Toleranzgrenze für Lipopolysaccharid-induzierte Inflammationen liegen. Gründe für geschlechtsdimorphe Unterschiede der Immunantwort sind über Speziesgrenzen hinweg relativ gut untersucht (Frederic *et al.* 1993, Suescun *et al.* 1994, Spinedi *et al.* 1997, Zellweger *et al.* 1997, Angele *et al.* 2000, Schröder *et al.* 2000). Eine spezifische Dosisoptimierung für Männchen könnte daher in zukünftigen Experimenten eventuell auch bei diesen Tieren Effekte stimulieren.

Im *Vas deferens* der Männchen konnte eine signifikant erhöhte Apotoserate im Vergleich zu Wildtyp-Tieren festgestellt werden; ein Befund, der sowohl nach LPS-Applikation als auch ohne exogene Induktion oxidativen Stresses beobachtbar war.

Die Spermienmembran von Säugetieren ist außerordentlich reich an ungesättigten Fettsäuren, die zum Teil bis zu sechs Doppelbindungen aufweisen (Aveldano *et al.* 1992, Suresh 1996). Sie gewährleisten die hohe Fluidität der Membran und ermöglichen so die Zellfusion zwischen Eizelle und Spermium bei der Befruchtung. Diese mehrfach ungesättigten Fettsäuren werden besonders leicht durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) attackiert, wie sie bei Lipid-Peroxidationen entstehen (Sharma und Agarwal 1996). Oxidativer Stress bewirkt daher die Akkumulation verschiedener Metabolite, z.B. 4-HNE, die einerseits reaktive Verbindungen darstellen und andererseits als second Messenger agieren können und so direkten Einfluss auf Signaltransduktions-Kaskaden ausüben. Die physiologische Funktion der kontrolliert produzierten ROS als Signalmoleküle und second Messenger besteht in männlichen Reproduktionsorganen in ihrer essentiellen Rolle bei der Regulation der Akrosomen-Reaktion durch Stimulation der Phospholipase A2 via Lipidperoxidations-Produkte und Kalzium. Dadurch steigern sie letztendlich die Fusogenität der Membran. ROS sind auch an der Aktivierung von Tyrosin-Phosphorylierungen beteiligt und könnten eine physiologische Bedeutung für der Spermien-Oozyten-Anlagerung haben (Aitken *et al.* 1989, Aitken und Fisher 1994).

Die Auslösung oxidativen Stresses durch eine überschießende ROS-Bildung wurde für unreife Spermatozoen und kontaminierende Leukozyten beschrieben (Balhorn *et al.* 1988, Plante *et al.* 1994, Bianchi *et al.* 1996) und in Zusammenhang mit männ-

licher Infertilität gebracht (Evenson *et al.* 2000). Wird also die durch ROS ausgelöste Kettenreaktion nicht durch anti-oxidative Prozesse in einem physiologischen Gleichgewicht gehalten, verliert die Spermienmembran ihre Fluidität, der intrazelluläre ATP-Spiegel fällt ab und Axonem-Schädigungen entstehen, die die Motilität einschränken oder verhindern und zu apoptotischen Zelluntergängen führen können (Aitken und Fisher 1994, Hemachand *et al.* 2003, Moustafa *et al.* 2004).

In Kombination der unter Abschnitt 3.2.2.12 beschriebenen leichten Motilitäts-einschränkung der Spermatozoen männlicher Knockout-Tiere könnte die erhöhte Apotoseneigung im *Vas deferens* den Schluss zulassen, dass das Fehlen des MVDP-Proteins auf der Spermienoberfläche (Taragnat *et al.* 1990) bei Knockout-Tieren zu einer Imbalance zwischen Lipidperoxidationen und anti-oxidativen, detoxifizierenden Prozessen führt, die im Weiteren erhöhte Zelluntergänge verursacht.

Die Ovarien weiblicher Knockout-Tiere zeigten in Folge des LPS-Stimulus keine erhöhten Apotoseraten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Deletion des MVDP-Gens hat daher entweder keinen Effekt auf die Überlebensfähigkeit der Zellen, oder die inflammatorischen und apoptotischen Reize der Lipopolysaccharid-Wirkung erreichen das *Ovar* bei intraperitonealer Applikation nicht.

4.9 Die Bedeutung des MVDP-Proteins für den Organismus: Ein Ausblick

Das Maus-Vas-Deferens-Protein wird sowohl bei der Maus als auch bei der Ratte im Nebennieren-Cortex ACTH-reguliert exprimiert. Im Gegensatz dazu ist die starke Präsenz des Proteins im *Vas deferens* und die Assoziation mit der Spermienoberfläche spezifisch für die Spezies Maus. Promotorstudien des *Mvdp*-Gens identifizierten kürzlich das hierfür verantwortliche regulatorische Element: Eine 77 Basenpaare lange „LINE-like“-Sequenz, die einen Bereich sehr starker Homologie zum Promotor des Ratten-Gens unterbricht. Einer Hypothese zu Folge resultiert die Androgen-vermittelte MVDP-Expression im Samenleiter aus der Insertion dieser, ein „Androgen-Response-Element“-enthaltenden, funktionell aktiven Region (Val *et al.* 2002b). Dies begründete die Frage, worin der selektive Vorteil der ausgesprochen starken MVDP-Expression im murinen *Vas deferens* gegenüber Spezies, die keine solche Expression aufweisen, bestehen könnte. Isocaproaldehyd, eines der Hauptsubstrate des Enzyms, wird im *Vas deferens* nicht gebildet. 4-Hydroxynonenal entsteht

zwar in Folge Lipidperoxidations-Prozessen, könnte jedoch von alternativen Detoxifizierungsmechanismen abgebaut werden, wie das Fehlen der MVDP-Expression im Samenleiter anderer Spezies zeigt. Daher wäre für zukünftige Arbeiten am MVDP-Knockout-Modell von größtem Interesse zu untersuchen, ob sich die 4-HNE-Konzentration in den endogen MVDP-exprimierenden Organen der Knockout-Mäuse verändert.

Möglicherweise kann die detoxifizierende Funktion des MVDP-Proteins unter physiologisch-normalen Bedingungen von anderen Enzymen übernommen werden. Schwillt jedoch die Konzentration an Substraten pathophysiologisch an, versagen weitere Steigerungen der Kompensationsleistung anderer detoxifizierender Mechanismen. Konventionelle Knockout-Modelle bergen die Eventualität, dass der Phänotyp der Tiere durch kompensatorische Aktivitäten anderer Genprodukte verfälscht und abgeschwächt sein könnte. Für das zum MVDP-Protein am stärksten homologe Enzym FR-1 konnte im Zuge der Expressionsanalyse in Knockout-Tieren gezeigt werden, dass das Fehlen von MVDP keine Expressionssteigerung dieses Enzyms bewirkt. Damit kann zumindest für das *Vas deferens* ausgeschlossen werden, dass FR-1 die Funktion des MVDP-Proteins übernimmt, weil sowohl bei Wildtyp- als auch bei Knockout-Tieren keine FR-1-Expression nachgewiesen werden konnte. Die Genfunktion im *Ovar* und in der Nebenniere könnte allerdings auch ohne Expressionsveränderung teilweise kompensiert werden. In Frage kommen hierfür neben FR-1, andere Mitglieder der Aldo-Keto-Reduktasen-Superfamilie oder Enzyme anderer Superfamilien. Schließlich existieren insbesondere für Detoxifizierungsprozesse verschiedene parallele Mechanismen, die Genprodukte völlig unterschiedlicher Abstammung einschließen (Übersichtsartikel Melov 2000). Kreuzungen zwischen Maus-Modellen mit Deletionen zweier unterschiedlicher Proteine (Doppel-Knockout), die im Verdacht stehen, ähnliche Funktionen zu erfüllen oder die in sonstigem funktionellen Zusammenhang stehen, könnte hier nähere Einblicke verschaffen.

Die Substrate des Enzyms Isocaproaldehyd und 4-HNE wurden aus einer Reihe getesteter Verbindungen mittels *in vitro* Enzymaktivitäts-Assays identifiziert. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass das MVDP-Protein noch weitere, bislang unidentifizierte, Substrate umsetzen könnte. Möglich wäre, dass die Bedeutung des Proteins für den Organismus auch abseits klassischer Detoxifizierungsprozesse in einer derzeit noch unbekanntem Funktion bestehen könnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bieten erste Einblicke in die physiologische Relevanz des detoxifizierenden MVDP-Proteins *in vivo*. Sie widerlegen die These, dass das MVDP-Protein auf Grund seiner außerordentlich starken Expression im *Vas deferens* und im *Ovar* essenzielle Funktionen bei Reproduktionsvorgängen erfüllt und beweisen, dass das Fehlen des Proteins für den Organismus nur unter bestimmten, noch zu identifizierenden Umständen, nicht mit dem Leben vereinbar ist. Eine mögliche Ursache könnten z.B. die erhöhten Corticosteron-Konzentrationen in Verbindung mit immunsuppressiven Effekten darstellen. Die bisher erarbeiteten Erscheinungsbilder des Knockout-Modells sind auffällig geschlechtsspezifisch ausgeprägt und betreffen verschiedenste Mechanismen. Sie deuten auf hoch-komplexe pathophysiologische und endokrinologische Veränderung hin, die vielfältige Ansatzpunkte zur weitergehenden Analyse der Tiere bieten.