

Dr. Torsten Held

Zur Strukturellen und Funktionellen Analyse der Murinen Gene der *Hsp110* Familie



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

Zur Strukturellen und Funktionellen Analyse der Murinen Gene der *Hsp110* Familie

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen**



vorgelegt von
T o r s t e n H e l d
aus Hameln

Göttingen, 2008

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2010

Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2008

978-3-86955-565-2

D 7

Referent: Prof. Dr. med. Dr. h. c. W. Engel

Korreferent: Prof. Dr. S. Hoyer-Fender

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Januar 2009

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2010

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2010

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86955-565-2

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
FACHWORTVERZEICHNIS	XIV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Identifizierung und Charakterisierung der <i>Hspa4l</i> cDNA	1
1.2 Die <i>Hsp110</i> Genfamilie	5
1.3 Ziele der Arbeit	8
2 MATERIAL UND METHODEN	9
2.1 Chemikalien und Reagenzien	9
2.2 Biochemikalien und Enzyme	11
2.3 Gebrauchswaren	12
2.4 Sterilisationsverfahren	13
2.5 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	13
2.6 Geräte	14
2.7 Lösungen	14
2.8 Medien, Antibiotika, Agarplatten	19
2.8.1 Medien für Bakterien	19
2.8.2 Agarplatten	19
2.8.3 Medien für eukaryontische Zellkulturen	19
2.8.4 Antibiotika	21
2.8.5 IPTG/X-Gal-Platten	21

2.9	Biologisches Material	22
2.9.1	Bakterienstämme	22
2.9.2	Eukaryontische Zelllinien	22
2.9.3	Mäusestämme	22
2.9.4	Synthetische Oligonukleotide	23
2.9.4.1	Synthetische DNA-Oligonukleotide	23
2.9.5	Antikörper	28
2.9.6	Plasmide und Vektoren	29
2.9.7	Verwendete Konstrukte und Plasmide	29
2.9.8	Datenbanken	29
2.10	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren	30
2.10.1	Minipräparation von Plasmid-DNA	30
2.10.1.1	Herstellung von Bakterien-Glycerin-Stocks	31
2.10.2	Midipräparation von Plasmid-DNA	31
2.10.3	Maxipräparation von Plasmid-DNA	31
2.10.4	Ethanol-fällung von DNA aus wässrigen Lösungen	31
2.10.5	Phenol / Chloroform-Aufreinigung von Nukleinsäuren	32
2.10.6	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit	32
2.10.7	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen mit Faltenfilter und Montage-Säulchen	32
2.10.8	Aufreinigung von DNA mit Montage Centrifugal Filter Devices	33
2.10.9	Isolierung genomischer DNA aus Geweben	33
2.10.10	Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellen	33
2.10.11	Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben	34
2.10.12	Isolierung von RNA durch Fällung	34
2.10.13	Isolierung von RNA über die Säule	34
2.10.14	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen	35
2.10.15	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	35
2.11	Klonierungstechniken	36
2.11.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	36
2.11.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	36
2.11.3	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	36
2.11.4	Ligation von DNA-Fragmenten	37
2.11.5	Annealing zweier Oligonukleotide	37
2.11.6	Subklonierung von PCR- und RT-PCR-Produkten	38
2.11.7	Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA	39
2.12	Gelelektrophorese	39
2.12.1	Gelelektrophorese von DNA	39

2.12.2	Gelelektrophorese von RNA	39
2.12.3	Längenstandards	40
2.13	Transfertechniken von Nukleinsäuren	40
2.13.1	Southern Blot-Analysen	40
2.13.2	Northern Blot-Analysen	41
2.14	Radioaktive Markierung von DNA und Hybridisierung membrangebundener RNA	41
2.14.1	Random Prime-Markierung	41
2.14.2	Hybridisierung membrangebundener DNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	42
2.14.3	Hybridisierung der genomischen Cosmid-Bibliothek 129/Ola und PACs-Macroarrays	42
2.14.4	Koloniehybridisierung	43
2.14.5	„Strippen“ von Filtern	43
2.15	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
2.15.1	PCR an Plasmid-DNA	43
2.15.2	Reverse Transkription	44
2.16	Sequenzanalyse	45
2.17	Proteinchemische Techniken	45
2.17.1	Isolierung von Gesamtprotein aus Zellkulturen	45
2.17.2	Isolierung von Gesamt-Protein aus Organen der Maus	46
2.17.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	46
2.17.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
2.17.5	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membrane	47
2.17.6	Färbung von Polyacrylamidgelen	48
2.17.7	Inkubation von membrangebundenen Proteinen mit Antikörpern	48
2.18	Zellbiologische Methoden	49
2.18.1	Isolierung von Leydig-Zellen	49
2.18.2	Zellkultur eukaryontischer Zellen	49
2.18.3	Kryokonservierung und Revitalisierung von eukaryontischen Zellen	50
2.18.4	Transfektion eukaryontischer Zellen	50
2.18.5	Stabile Transfektion von eukaryontischen Zellen	51
2.19	Analysen von Zelltod und Apoptose	51
2.19.1	<i>In situ</i> -Nachweis von Apoptose durch TUNEL	51
2.20	Histologische Techniken	52
2.20.1	Methoden der Fixierung	52
2.20.1.1	Fixierung des Gewebes	52

2.20.1.2	Fixierung für die Elektronenmikroskopie	52
2.20.2	Vorbehandlung der Objektträger	52
2.20.3	Herstellung der Paraffinschnitte	53
2.20.4	Methoden der Färbung	53
2.20.4.1	Färbung der histologischen Schnitte mit alkalischer Phosphatase	53
2.20.4.2	Färbung der histologischen Schnitte mit Fluoreszenzfarbstoffen	54
2.20.4.3	HE-Färbung	54
2.20.4.4	Oil-Red-O-Färbung zum Nachweis von Lipiden	55
2.20.5	Fotografische Auswertungen	55
2.21	Spermienanalyse	55
2.21.1	Spermienanzahl und Motilitätsanalyse von Spermien	55
2.21.2	Motilitätsanalyse von Spermien	56
2.21.3	Akrosomenreaktion	57
2.22	Herstellung von Knock out-Mäusen	57
2.22.1	Routinekultur von ES-Zellen	57
2.22.2	Elektroporation und Selektion von ES-Zellen	58
2.22.3	Isolierung und Kryokonservierung von ES-Zellklonen	59
2.22.4	DNA-Extraktion aus ES-Zellen	59
2.22.5	Herstellung und Identifizierung von Chimären	60
3	ERGEBNISSE	61
3.1	<i>Hspa4l</i>	61
3.1.1	Expressionsanalysen für das murine HSPA4L Protein	61
3.1.1.1	Expressionsanalyse für das HSPA4L Protein in verschiedenen Organen	61
3.1.1.2	Expressionsanalyse für das HSPA4L Protein in postnatalen Testes	61
3.1.1.3	Expressionsanalyse für das HSPA4L Protein in Testes verschiedener Mausmutanten mit Keimzelldefekten	62
3.1.2	Expressionsanalyse für das HSPA4L Protein in Testes mittels immunhistologischer Untersuchungen	63
3.1.3	Inaktivierung des <i>Hspa4l</i> Gens	65
3.1.4	Reproduktive Defekte in männlichen <i>Hspa4l</i> ^{-/-} Mäusen	67
3.1.5	Beeinträchtigung der Spermatogenese und Anstieg der Apoptose in den testikulären Keimzellen infertiler <i>Hspa4l</i> ^{-/-} Mäuse	69
3.1.6	Expressionsanalyse verschiedener Hitzeschockproteine in <i>Hspa4l</i> ^{-/-} Testis	71
3.1.7	Spezifische Expression des HSPA4L Proteins in den kortikalen Segmenten der Nephronen	72
3.1.8	Entwicklung der Hydronephrose und der Verlust der Osmotoleranz bei <i>Hspa4l</i> ^{-/-} Mäusen	74

3.2	<i>Hspa4</i>	78
3.2.1	Expressionsanalyse für das murine <i>Hspa4</i> Gen	78
3.2.1.1	Expressionsanalyse für das <i>Hspa4</i> Gen in verschiedenen Organen	78
3.2.1.2	Expressionsanalyse für das <i>Hspa4</i> Gen im postnatalen Testis	79
3.2.1.3	Expressionsanalyse für das <i>Hspa4</i> Gen im Testis verschiedener Mausmutanten mit Keimzelldefekten	81
3.2.1.4	Expressionsanalyse für das HSPA4 in verschiedenen Zelllinien	82
3.2.1.5	Expressionsanalyse für das HSPA4 Protein in Testes mittels immunhistologischer Untersuchungen	83
3.2.1.6	Expressionsanalyse für das HSPA4 Protein in ES- und SSC-Zellen mittels immunzytologischer Untersuchungen	85
3.2.1.7	Expressionsanalyse für das HSPA4 Protein in Ovarien mittels immunhistologischer Untersuchungen	86
3.2.1.8	Expressionsanalyse für das HSPA4 Protein während der präimplantativen Embryonalentwicklung mittels immunzytologischer Untersuchungen	88
3.2.1.9	Expressionsanalyse für das <i>Hspa4</i> Gen während der präimplantativen Embryonalentwicklung mittels RT-PCR	89
3.2.1.10	Analysen zur maternalen oder embryonalen <i>Hspa4</i> Genexpression	89
3.2.2	Zur Funktion des <i>Hspa4</i> Gens	91
3.2.2.1	Strategie zur Inaktivierung des <i>Hspa4</i> Gens	91
3.2.2.2	Screening einer murinen PAC-Bibliothek	91
3.2.2.3	Isolierung und Klonierung der 5'- und 3'-flankierenden Regionen	92
3.2.2.4	Elektroporation der ES-Zellen mit dem Targeting Vektor <i>Hspa4</i> und Selektion homolog rekombinierter <i>Hspa4</i> ^{+/-} ES-Zellen	94
3.2.2.5	Herstellung und Charakterisierung der chimären Mäuse	95
3.2.3	Analyse <i>Hspa4</i> defizienter Mäuse	95
3.2.3.1	Genotypisierung <i>Hspa4</i> defizienter Mäuse	95
3.2.3.2	Genotyp-Analyse der Nachkommen in der F ₂ -Generation	96
3.2.3.3	Expressionsanalysen zur Bestätigung der erfolgreichen Inaktivierung des <i>Hspa4</i> Gens	97
3.2.4	Phänotyp-Analyse der <i>Hspa4</i> ^{-/-} Mäuse des C57Bl/6J x 129/Sv-Hintergrundes	98
3.2.4.1	Analyse der Fertilität der <i>Hspa4</i> ^{-/-} Mäuse	98
3.2.4.2	Beeinträchtigung der Spermatogenese bei infertilen <i>Hspa4</i> ^{-/-} Mäusen	99
3.2.4.3	Expressionsanalysen für verschiedene Hitzeschockproteine im <i>Hspa4</i> ^{-/-} Testis	102
3.2.4.4	Expressionsanalyse von keimzellspezifischen Genen in Testes infertiler <i>Hspa4</i> ^{-/-} Mäuse	103
3.2.5	Phänotyp-Analyse der <i>Hspa4</i> ^{-/-} Mäuse des 129/Sv-Hintergrundes	105
3.2.5.1	<i>Hspa4</i> ^{-/-} Mäuse des 129/Sv-Hintergrundes	105
3.2.5.2	Phänotyp der überlebenden <i>Hspa4</i> ^{-/-} Mäuse	106
3.2.5.3	Wachstumsretardierung bei Mäusen des Hintergrundes 129/Sv	107

3.2.5.4	Analyse zur Detektion von Lipiden in Dünndarm und Leber der <i>Hspa4</i> ^{-/-} Mäuse	111
3.2.5.5	Histologische Untersuchungen des Dünndarms und der Leber von <i>Hspa4</i> ^{-/-} Mäusen mittels HE-Färbung	114
3.2.5.6	Hypoglykämie bei <i>Hspa4</i> ^{-/-} Mäusen	115
3.2.5.7	Histologische Untersuchungen der Muskeln von <i>Hspa4</i> ^{-/-} Mäusen mittels HE-Färbung	117
3.2.5.8	Expressionsanalyse für das HSPA4 Protein im Gehirn mittels immunhistologischer Untersuchungen	119
3.3	<i>Hspa4l Hspa4</i>	120
3.4	<i>Hsph1</i>	122
3.4.1	Expressionsanalyse für das murine HSPH1 Protein	122
3.4.1.1	Expressionsanalyse für das HSPH1 Protein in verschiedenen Organen	122
3.4.1.2	Expressionsanalyse für das HSPH1 Protein im Testis	123
3.4.1.3	Expressionsanalyse für das HSPH1 Protein in verschiedenen Zelllinien	124
3.4.1.4	Expressionsanalyse für das HSPH1 Protein in Testes mittels immunhistologischer Untersuchungen	125
3.4.1.5	Expressionsanalyse für das HSPH1 Protein in SSC und ES-Zellen mittels immunzytologischer Untersuchungen	127
3.4.1.6	Expressionsanalyse für das HSPH1 Protein in Ovarien mittels immunhistologischer Untersuchungen	128
3.4.1.7	Expressionsanalyse für das HSPH1 Protein während der präimplantativen Embryonalentwicklung mittels immunzytologischer Untersuchungen	130
3.4.2	Zur Funktion des <i>Hsph1</i> Gens	131
3.4.2.1	Strategie zur Inaktivierung des <i>Hsph1</i> Gens	131
3.4.2.2	Screening einer murinen PAC-Bibliothek	131
3.4.2.3	Isolierung und Klonierung der 5'- und 3'-flankierenden Region in den „Targeting“-Vektor pPNT	132
3.4.2.4	Elektroporation der ES-Zellen mit dem Targeting Vektor pPNT- <i>Hsph1</i> und Selektion homolog rekombinierter <i>Hsph1</i> ^{+/-} ES-Zellen	136
4	DISKUSSION	138
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	138
4.1.1	<i>Hspa4l</i>	138
4.1.2	<i>Hspa4</i>	139
4.1.3	<i>Hspa4l Hspa4</i>	140
4.1.4	<i>Hsph1</i>	140

4.2	Hitzeschockproteine	141
4.2.1	Klassifizierung und Struktur der Hitzeschockproteine	141
4.2.2	Regulation der Hitzeschockproteine	144
4.2.3	Die zelluläre Rolle der Hitzeschockproteine	144
4.3	<i>Hspa4l</i>	148
4.3.1	Funktionsanalyse des <i>Hspa4l</i> Gens	148
4.4	<i>Hspa4</i>	152
4.4.1	Molekularer Ursprung der beiden <i>Hspa4</i> Transkripte	152
4.4.2	Funktionsanalyse des <i>Hspa4</i>	153
4.4.2.1	Zur Analyse der Infertilität der <i>Hspa4</i> ^{-/-} Mäuse des Hybrid-Hintergrunds	153
4.4.2.2	Zur Analyse der Wachstumsretardierung und postnatalen Letalität der <i>Hspa4</i> ^{-/-} Mäuse des Inzucht-Hintergrunds	154
4.5	<i>Hspa4l Hspa4</i>	161
4.6	<i>Hsph1</i>	163
4.6.1	Genomische Strukturanalyse des <i>Hsph1</i>	163
4.6.2	Funktionsanalyse des <i>Hsph1</i>	164
5	ZUSAMMENFASSUNG	165
6	LITERATURVERZEICHNIS	168
7	ANHANG	181
	LEBENS LAUF	182
	DANKSAGUNG	183

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
Ampuwa	steriles pyrogenfreies Aqua ad iniectabilia
As	Aminosäure
bp	Basenpaar
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa (ungefähr)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CIAP	Calf Intestinal Phosphatase
d. h.	das heißt
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTP	didesoxy-Nukleosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
dpc	Tage nach Befruchtung (<i>days post coitum</i>)
dpp	Tage nach der Gebären (<i>days post partum</i>)
ds	doppelsträngig
DTT	1,4-Dithiothreitol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EmFi	Embryonale Fibroblasten
ES	Embryonale Stammzellen
EST	Expressed Sequence Tags
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)

EtBr	Ethidiumbromid
etc.	et cetera
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm, Erdbeschleunigungskonstante
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
H ₂ O	Wasser
HSF	Hitzeschockfaktor
HSP	Hitzeschockprotein
HSE	Hitzeschockelement
Hrsg	Herausgeber
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
K	Kontrolle
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	<i>Luria Bertani</i>
LIF	Recombinant Leukaemia Inhibitory Factor
Luc	Luciferase
µg	Microgramm
µl	Microliter
µm	Micrometer
µM	Micromolar
M	Molar
mA	Milliampere
MCS	<i>multiple cloning site</i> (Polylinker)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA = Boten-RNA
NaAc	Natriumacetat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
o.	oder
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pg	Picogramm
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur; reverse Transkription
RZPD	Resource Center/Primary Database (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung in Berlin)
s.	siehe
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sog.	sogenannt
ss	einzelsträngig
SSC	Spermatogoniale Stammzellen
STR	Straightness (Gradlinigkeit)
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA (-Puffer)
TE	Tris-EDTA (-Puffer)
Tfm	Testikuläre Feminisierung
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
u.	und
U	Unit = definierte Enzymeinheit
UV	ultraviolettes Licht
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
UTR	Untranslated Region
UV	Ultraviolet
V	Volt
VAP	Average Path Velocity (Weggeschwindigkeit)
VCL	Curvilinear Vlocity (Bahngeschwindigkeit)
vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
VP	Vaginalpfropf
VSL	Straight Line Velocity (progressive Geschwindigkeit)
v/v	Volumen pro Volumen

Wt	Wildtyp
w/v	weight (Gewicht) pro Volumen
X-GAL	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
z. T.	zum Teil
z. B.	zum Beispiel

Symbole für Nukleoside (1-Buchstaben-Code):

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymidin

Symbole für Aminosäuren:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Dekadische Vorsilben:

X =	1	2	3	6	9	12
10^{-x}	dezi	centi	milli	mikro	nano	piko
	(d)	(c)	(m)	(μ)	(n)	(p)

SI-Einheiten:

A	Ampere	Stromstärke
°C	Grad Celsius	Temperatur
Ci	Curie	Einheit für Radioaktivität, 1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Becquerel
Cm	Zentimeter	Länge
d	Tag	Zeit
F	Farad	Kapazität eines Kondensators
g	Gramm	Masse
h	Stunde	Zeit
Hz	Hertz	Frequenz
J	Joule	Energie
l	Liter	Volumen
m	Meter	Länge
M	molar	Konzentration, M = Mol/Liter
min	Minute	Zeit
mol	Mol	Stoffmenge, 1 Mol = $6,022 \times 10^{23}$ Teilchen eines Stoffes
s	Sekunde	Zeit
V	Volt	Spannung

Fachwortverzeichnis

Englische Fachbegriffe der Molekularbiologie werden, soweit sinnvoll, auch als solche verwendet und nicht ins Deutsche übersetzt, da deutsche Ersatzwörter oftmals unwissenschaftlich klingen und nur eine Umschreibung dessen sind, was im Englischen mit einem Wort ausgedrückt werden kann. Die Bedeutung dieser Fachbegriffe wird hier nochmals aufgeführt, sofern dies nicht im Text geschieht.

alignment	<p>Wörtlich übersetzt: anordnen, abgleichen</p> <p>Zwei oder mehrere Sequenzen werden so angeordnet, dass sie bestmöglich übereinstimmen. Auf diese Weise können gleiche oder komplementäre Sequenzen oder Sequenz-bereiche ermittelt werden.</p>
annealing	<p>Wörtlich übersetzt: abkühlen, härten</p> <p>Primer-Anlagerung während der PCR</p>
antisense	<p>Komplementär zum kodierenden Nukleinsäurestrang</p>
Assay	<p>Wörtlich übersetzt: untersuchen, Untersuchung</p> <p>Test, Versuchsreihe</p>
Cluster	<p>Wörtlich übersetzt: Anhäufung</p> <p>Hier: Bei Kontakt mit der ECM sammeln sich viele Integrine an der Kontaktstelle und bilden Integrin-„Anhäufungen“.</p>
downstream	<p>Wörtlich übersetzt: stromabwärts</p> <p>In einer Kaskade: unterhalb, als nachgeschalteter Faktor</p> <p>Bei einem Gen: weiter 3'-gelegen</p>
Elongation	<p>Wörtlich übersetzt: Verlängerung</p> <p>Hier: DNA-Strang-Verlängerung während der PCR</p>
feedback	<p>Wörtlich übersetzt: Resonanz, Rückmeldung; Rückkopplung</p> <p>Hier: regulierende Wechselwirkung zwischen Transkripten und Proteinen</p>

full length	<p>Wörtlich übersetzt: Volle Länge</p> <p>Hier: das gesamte Protein oder den kompletten kodierenden Bereich einer cDNA betreffend</p>
housekeeping	<p>Wörtlich übersetzt: Haushalt</p> <p>Ein housekeeping-Gen ist ein konstitutiv exprimiertes Gen.</p>
in frame	<p>Wörtlich übersetzt: im Rahmen</p> <p>Bei der Herstellung eines Fusionsproteins muss darauf geachtet werden, dass bei der Klonierung der nachgeschalteten cDNA der Leserahmen der vorgeschalteten cDNA eingehalten wird.</p>
inside-out	<p>Wörtlich übersetzt: innen-außen</p> <p>Hier: die Übertragung von Signalen vom Zellkern zur Membran der Zelle</p>
knock out	<p>Wörtlich übersetzt: niederschlagen, ausschalten</p> <p>Hier: Inaktivierung der Expression eines Gens</p>
linker	<p>Wörtlich übersetzt: Verknüpfer</p> <p>18-30 bp langes DNA-Fragment, welches zur Verbindung zweier Nukleotidsequenzen dient.</p>
outside-in	<p>Wörtlich übersetzt: außen-innen</p> <p>Hier: die Übertragung von Signalen von der Membran einer Zelle in den Zellkern</p>
Primer	<p>Oligonukleotid von 20-35 Basenpaaren, welches von Polymerasen als Starthilfe zum Ansynthetisieren weiterer Nukleotide genutzt wird.</p>
proofreading	<p>Wörtlich übersetzt: Korrekturlesen</p> <p>Polymerasen mit einer proofreading-Aktivität sind in der Lage, falsch eingebaute Nukleotide über ihre 3'-5'-Exonuklease-Aktivität zu entfernen.</p>
sandwich	<p>Wörtlich übersetzt: belegtes Brot</p> <p>Hier: Art des Aufbaus beim Western und Northern Blot-Transfer. Die Membran wird zwischen Whatman-Papier + Gel und Whatman-Papier gelegt.</p>

screening	<p>Wörtlich übersetzt: (durch)sieben, untersuchen</p> <p>Hier: Durchsuchen einer Bibliothek nach bestimmten Proteinen und Genen</p>
second messenger	<p>Botenstoff, der in Reaktion auf extrazelluläre Signale in der Zelle gebildet wird und die Signalkaskade verstärkt fortsetzt</p>
sense	<p>Entspricht dem kodierenden Nukleinsäurestrang</p>
silencing	<p>Wörtlich übersetzt: zum Schweigen bringen</p> <p>Bei der Transkription: Umstände, die die Transkription eines Gens unterdrücken</p>
targeting-vector	<p>Wörtlich übersetzt: Ziel-Vektor</p> <p>Der Vektor (hier: pPNT-Vektor), der die 5'- und 3'-flankierenden Regionen des Ziel-Gens mit der Neomycin-Kassette beinhaltet und das Knock out-Konstrukt darstellt.</p>
template	<p>Wörtlich übersetzt: Schablone, Vorlage, Matrize</p> <p>Hier: RNA oder DNA, die während einer PCR amplifiziert werden soll</p>
upstream	<p>Wörtlich übersetzt: stromaufwärts</p> <p>In einer Kaskade: oberhalb, als vorgeschalteter Faktor</p> <p>Bei einem Gen: weiter 5'-gelegen</p>
vaginal plug	<p>Wörtlich übersetzt: vaginaler Pfropfen</p> <p>Bei Mäusen: nach der Kopulation in der Vagina der weiblichen Mäusen entstehender Pfropfen zur Verhinderung weiterer Befruchtung.</p>

1 Einleitung

1.1 Identifizierung und Charakterisierung der *Hspa4l* cDNA

Das INSL3 Hormon gehört zur Familie der insulinähnlichen Hormone und wird ausschließlich in den Leydigzellen des Testis und in den Thekazellen des Ovars gebildet. Die „Deletion“ des *Ins13* Gens bei männlichen Mäusen führt zum Fehlen der scrotalen Strukturen und zur Lokalisation beider Testes im Abdomen. Die abdominale Lage der Testes in *Ins13* defizienten Mäusen ist auf die ausbleibende Entwicklung des Gubernakulums während der embryonalen Entwicklung zurückzuführen (Zimmermann *et al.*, 1999).

In unserer Gruppe wurde die Regulation des *Ins13* Gens untersucht. Durch Promotor-Analysen konnte die Promotorregion des murinen *Ins13* Gens auf ein 160 bp Fragment „upstream“ des Startcodons eingegrenzt werden. Dieses Fragment reicht für eine spezifische Expression in Leydigzellen aus (Thamm, 2002).

Durch den Vergleich der Sequenzen der *Ins13* Gene von Maus, Mensch und Schwein konnten innerhalb der 5'-untranslatierten Region zwei hoch konservierte Sequenzabschnitte (Box M1 und Box M2) identifiziert werden (Zimmermann *et al.*, 1997). Der Box M1-Sequenzbereich wurde als Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor SF-1 („steroidogener Faktor 1“) identifiziert. Darüber hinaus konnten zwei weitere Bindungsstellen für den Faktor SF-1 im Promotorbereich lokalisiert werden (Abb. 1). Diese Sequenzelemente (SF-1/1, SF-1/2 und SF-1/3) wurden zusätzlich als *cis*-ständige Elemente nachgewiesen, an denen der Transkriptionsfaktor SF-1 bindet (Zimmermann *et al.*, 1998).

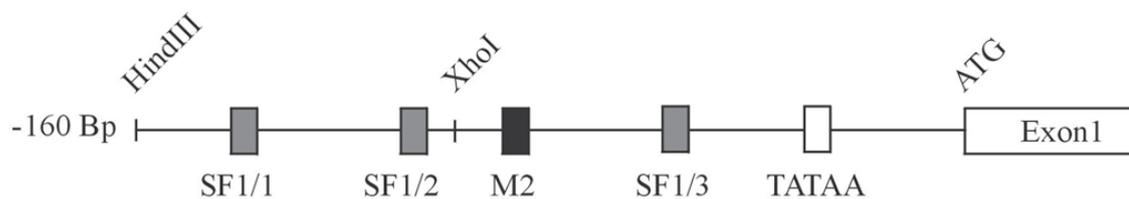


Abb. 1: Darstellung der *cis*-agierenden Elemente innerhalb der 160 Bp Promotorregion des murinen *Ins13* Gens.

An die grau unterlegten Sequenzen bindet der Transkriptionsfaktor SF-1. Schwarz unterlegt ist der Sequenzabschnitt M2 und weiß unterlegt ist die TATA-Box. Positionen der *cis*-ständigen Elemente: SF-1/1 (-145 bis -138), SF-1/2 (-115 bis -108), SF-1/3 (-65 bis -57) und M2 (-100 bis -87). Es sind ferner angegeben: TATA-Box (-36 bis -32), GC-Box (-53 bis -48) und der Transkriptionsstartpunkt ATG.