

Validierung von Vps54 als ursächliches Gen der
Neurodegeneration, Wobbler der Maus, und
Charakterisierung seiner Aufgabe innerhalb der
Embryonalentwicklung

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (rer. nat.)**

**Fakultät für Biologie
Universität Bielefeld**

**vorgelegt von
Anke Mußmann**

Mai 2006

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| ZUSAMMENFASSUNG | 1 |
| 1 EINLEITUNG..... | 2 |
| 1.1 Neurodegenerative Erkrankungen..... | 2 |
| 1.1.1 Motoneuronenerkrankungen | 4 |
| 1.1.1.1 Spinale Muskelatrophie | 5 |
| 1.1.1.2 Amyotrophe Lateralsklerose..... | 7 |
| 1.2 Spermatogenese und Globozoospermien | 9 |
| 1.1.1 Ausgewählte Mausmodelle der Globozoospermie..... | 12 |
| 1.3 Der GARP-Komplex..... | 13 |
| 1.4 Wobbler-Maus..... | 14 |
| 1.1.1 Quantitative Trait Loci der Wobbler-Maus | 19 |
| 1.5 Ziele der Arbeit | 20 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN..... | 21 |
| 2.1 Material | 21 |
| 2.1.1 Mausstämme..... | 21 |
| 2.1.2 Bakterienstämme | 21 |
| 2.1.3 Verwendete Vektoren..... | 21 |
| 2.1.4 Oligonukleotide | 22 |
| 2.1.5 Enzyme | 22 |
| 2.1.6 Längenstandart | 23 |
| 2.1.7 DNA-Extraktionspuffer zur Isolierung aus Schwanzspitzen..... | 23 |
| 2.1.8 15,72 Glucose, Phosphate buffered saline (PBS) | 23 |
| 2.1.9 Bakterienkulturmedien | 23 |
| 2.1.9.1 Luria-Bertani (LB) | 23 |
| 2.1.9.2 SOC | 24 |
| 2.1.10 Antibiotika..... | 24 |
| 2.1.11 Verwendete Kits | 24 |
| 2.1.12 Färbelösungen | 24 |
| 2.1.13 Verwendete Erstantikörper..... | 25 |
| 2.1.14 Verwendete Zweitantikörper | 25 |
| 2.1.15 Verwendete Datenbanken..... | 25 |
| 2.2 Methoden..... | 26 |
| 2.2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR) | 26 |
| 2.2.1.1 Standart PCR-Reaktion | 26 |
| 2.2.1.2 Standart PCR mit Q-Solution | 27 |
| 2.2.1.3 Gradienten-PCR | 27 |
| 2.2.1.4 Kolonie-PCR..... | 28 |
| 2.2.1.5 Proofreading Polymerasen..... | 28 |
| 2.2.2 Gelelektrophorese | 29 |
| 2.2.3 Bakterien-Methoden..... | 30 |
| 2.2.3.1 Anzucht von Bakterien | 30 |
| 2.2.3.2 Kryokulturen | 30 |
| 2.2.3.3 Easy-Präp..... | 31 |
| 2.2.3.4 Alkalische Lyse..... | 32 |
| 2.2.3.5 Säulen-Aufreinigung | 33 |
| 2.2.3.6 Ligation | 34 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.2.4 | DNA-Methoden | 35 |
| 2.2.4.1 | DNA-Isolierung aus Gewebe | 35 |
| 2.2.4.2 | DNA-Extraktion aus Agarosegelen | 36 |
| 2.2.4.3 | Restriktionsenzymsspaltungen | 36 |
| 2.2.4.4 | Fällung von DNA | 37 |
| 2.2.4.5 | Southern Blotts | 37 |
| 2.2.4.6 | Generierung von Sonden | 38 |
| 2.2.4.7 | Hybridisierung und Nachweis | 39 |
| 2.2.5 | Konzentrationsmessungen von Nukleinsäuren | 39 |
| 2.2.6 | Diagnostik und Genotypisierung der Mäuse | 40 |
| 2.2.6.1 | Isolierung von DNA aus Schwanzspitzen | 40 |
| 2.2.6.2 | Isolierung von DNA aus Haarproben | 40 |
| 2.2.6.3 | CcT4-Diagnostik | 41 |
| 2.2.6.4 | <i>Vps54</i> ^{β-geo} -Diagnostik | 42 |
| 2.2.6.5 | BAC-transgenen Diagnostik | 42 |
| 2.2.7 | RNA-Methoden | 43 |
| 2.2.7.1 | TotalRNA-Isolierung aus Gewebe | 43 |
| 2.2.7.2 | mRNA-Isolierung | 43 |
| 2.2.7.3 | RNA-Gelelektrophorese | 44 |
| 2.2.7.4 | Reverse Transkription (RT) | 44 |
| 2.2.7.5 | Realtime PCR | 45 |
| 2.2.8 | Bestimmung des Blutglukosegehaltes | 46 |
| 2.2.9 | Zyklusuntersuchung, Superovulation und Zygotentransfer | 46 |
| 2.2.10 | Gewichtsmessungen | 47 |
| 2.2.11 | Kraftmessungen | 47 |
| 2.2.12 | Histologische Methoden | 48 |
| 2.2.12.1 | Paraffineinbettung | 48 |
| 2.2.12.2 | Parafinschnitte | 48 |
| 2.2.12.3 | Entparafinierung | 48 |
| 2.2.12.4 | Gefrierblöcke | 49 |
| 2.2.12.5 | Gefrierschnitte | 49 |
| 2.2.12.6 | Antikörperfärbung | 49 |
| 2.2.12.7 | Hoechstfärbung | 50 |
| 2.2.12.8 | Nisslfärbung | 51 |
| 2.2.12.9 | Hämatoxylin-Eosin-Färbung | 51 |
| 2.2.12.10 | β -Galaktosidase-Färbung | 52 |
| 2.2.12.11 | Confokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM) | 52 |
| 3 | ERGEBNISSE | 54 |
| 3.1 | Neue Phänotypen der Wobbler-Maus | 54 |
| 3.1.1 | Oogenese der Wobbler-Weibchen | 54 |
| 3.1.2 | Futterakkumulationen im Magen | 57 |
| 3.2 | Metabolomuntersuchungen | 59 |
| 3.2.1 | Schwankender Blutglukosegehalt | 59 |
| 3.2.2 | Metabolomanalyse des Testis | 61 |
| 3.3 | Vimentinablagerung in den Motoneuronen | 63 |
| 3.4 | BAC-Kompensation des Wobbler-Phänotyps | 66 |
| 3.4.1 | Etablierung von BAC-transgenen Zuchtlinien | 66 |
| 3.4.2 | Gewichts- und Kraftmessung | 67 |
| 3.4.3 | Histologische Untersuchung des zervikalen Rückenmarks | 72 |
| 3.4.4 | Spermatogenese und Fertilität | 74 |
| 3.5 | <i>Vps54</i>^{β-geo}-Allel | 77 |
| 3.5.1 | Expression von <i>Vps54</i> und des <i>Vps54</i> ^{β-geo} -Allels | 78 |
| 3.5.1.1 | Analyse der <i>Vps54</i> Expression in <i>Vps54</i> ^{β-geo} -Tieren | 78 |
| 3.5.1.2 | Expression der β -geo-LacZ-Kassette | 78 |
| 3.5.2 | Komplex-heterozygote Tiere | 81 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.5.3 | Heterozygote <i>Vps54</i> ^{β-geo} Tiere | 83 |
| 3.5.4 | Homozygote <i>Vps54</i> ^{β-geo} -Tiere | 86 |
| 3.5.5 | Geplanter konditionaler Knockout von <i>Vps54</i> :..... | 91 |
| 4 | DISKUSSION | 95 |
| 4.1 | Charakterisierung der Wobbler-Mäuse | 95 |
| 4.1.1 | Die Gametogenese | 95 |
| 4.1.2 | Futterakkumulation im Magen..... | 96 |
| 4.1.3 | Metabolomanalyse | 97 |
| 4.1.4 | Vimentinablagerungen | 101 |
| 4.2 | BAC-Kompensation und komplex-heterozygote Tiere..... | 102 |
| 4.3 | <i>Vps54</i>^{β-geo}-Allel..... | 103 |
| 4.6.1 | Auffällig heterozygote Tiere | 103 |
| 4.6.2 | Das homozygote <i>Vps54</i> ^{β-geo} -Allel..... | 105 |
| 4.4 | Motoneuronendegenerationen und Vesikeltransport..... | 109 |
| 4.5 | Globozoospermien und Vesikeltransport | 112 |
| 5 | AUSBLICK..... | 114 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNISS..... | 116 |
| 7 | ANHANG..... | 124 |
| 7.1 | Abkürzungsverzeichnis | 124 |
| 7.2 | Messdaten | 125 |
| 7.2.1 | Futterakkumulation | 125 |
| 7.2.2 | Glukosegehalt | 125 |
| 7.3 | Erklärung..... | 126 |

Zusammenfassung

Für die Aufklärung und zum besseren Verständnis von humanen Erbkrankheiten, aber auch von grundlegenden Prozessen, werden häufig Tiermodelle in der Forschung eingesetzt. Bei Erkrankungen des ersten oder zweiten Motorneurons liegt in den meisten Fällen keine familiäre Ätiologie vor und die Identifizierung von ursächlichen Mutationen ist daher schwierig. Ziel dieser Arbeit ist die Aufklärung und Charakterisierung der ursächlichen Mutation für die Wobbler-Maus, ein etabliertes Tiermodell für Spinale Muskelatrophie und Amyotrophe Lateralsklerose.

Die Wobbler-Maus (Phänotyp WR, Genotyp *wr*) ist erstmals 1956 beschrieben worden und konnte als rezessive und autosomale Mutation charakterisiert werden. In unserer Arbeitsgruppe konnte 1992 der Ort der Mutation auf Chromosome 11 der Maus lokalisiert werden und in den folgenden Jahren ein Kandidatenintervall eingegrenzt werden. Charakteristisch für die Wobbler-Mutation ist eine Degeneration der Motorneuronen, die zwischen der dritten und vierten Lebenswoche zu einer Atrophie der Vorderbeine führt und progressiv fortschreitet. Begleitet wird die Muskelatrophie von einem Tremor des Kopf- und Schulterbereiches. Wobbler-Männchen weisen eine gestörte Spermatogenese auf. Die Spermien dieser Tiere zeigen Akrosom- und Kopfdefekte, die dem Krankheitsbild der Globozoospermie entsprechen. Wobbler Männchen sind steril, eine Fertilisation von Oozyten ist nicht möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bislang unbekannte Aspekte der Wobbler-Pathologie charakterisiert. Die Oogenese der Wobbler-Weibchen wurde untersucht, aber im Gegensatz zur Spermatogenese konnten keine Defekte nachgewiesen werden. Eine Metabolomanalyse des Testis zeigte quantitative Unterschiede bei verschiedenen Metaboliten aus dem Aminosäurestoffwechsel und in den Mägen von Wobbler-Tieren wurde eine starke Überfüllung mit Futter festgestellt. Des Weiteren wurde eine Akkumulation des Intermediärfilamentes Vimentin in den degenerierenden Motorneuronen nachgewiesen, ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung von Intermediärfilamenten für die Wobbler-Pathologie. Nach der Identifizierung einer Punktmutation in *Vps54*, einem Gen im wobbler-kritischen Bereich, wurde die Einkreuzung eines *Vps54*-tragenden BAC-Transgens für ein Komplementations-Experiment in die Wobbler-Zucht vorgenommen. Der Wobbler-Phänotyp wurde von dem *Vps54*-Transgen vollständig kompensiert. Zur funktionellen Charakterisierung von *Vps54* wurde eine Mauslinie etabliert, die eine "β-geo-Gene-Trap-Insertion" zwischen dem fünften und sechsten Exon trägt, was zu einer Inaktivierung von *Vps54* führt. Die heterozygote *Vps54*^{β-geo} Tiere wurden mit der Wobbler-Linie gekreuzt. Komplex-heterozygoten Tiere (*Vps54*^{β-geo}/*wr*) weisen den typischen Wobbler Phänotyp auf, da sich die Wobbler-Mutation und *Vps54*^{β-geo} allelisch zu einander verhalten. Durch die Kompensation des Wobbler Phänotyps durch das *Vps54*-BAC-Transgen und die komplex-heterozygoten Tiere konnte bewiesen werden, dass es sich bei der Punktmutation in *Vps54* um die gesuchte Wobbler-Mutation der Maus handelt. Homozygot ist das *Vps54*^{β-geo}-Allel embryonal letal und führt zum Absterben der Embryonen an Tag 10-11,5 der Embryonalentwicklung.

Die Identifizierung und Charakterisierung von *Vps54*, welches für einen Vesikel-Transportfaktor kodiert, als Wobbler-Mutation zeigt, dass zelluläre Transportprozesse bei neurodegenerativen Erkrankungen, der Spermienbildung und der Embryonalentwicklung eine entscheidene Rolle spielen.

1 Einleitung

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Die neurodegenerativen Erkrankungen umfassen eine große Gruppe verschiedener Krankheiten. Ein typisches Merkmal während des Krankheitsverlaufes ist ein selektives Absterben von einzelnen oder mehreren Neuronen. Die Progression verläuft häufig über Jahre und verschiedene Beeinträchtigungen kommen zum Tragen, je nachdem welche Neuronen von der Degeneration betroffen sind. Die Symptome treten meist erst im fortgeschrittenen Alter auf, so dass durch die steigende Lebenserwartung die Zahl der neurodegenerativen Erkrankungen in den letzten Jahrzehnten stark angestiegen ist. Die Häufigkeiten mit der die verschiedenen Erkrankungen in der Bevölkerung auftreten sind sehr unterschiedlich (Abb.1.1). So belaufen sich z.B. die Schätzungen für Morbus Alzheimer für das Jahr 2004 auf ca. 15 Millionen betroffene Menschen weltweit (Forman et al. 2004). Durch die weiterhin gesteigerte Lebenserwartung wird sich diese Zahl in den nächsten Jahren noch deutlich erhöhen, so dass in Europa mit einer Verdreifachung der Alzheimerpatienten auf ca. 16,2 Millionen im Jahr 2050 gerechnet wird (Wancata et al., 2003).

Die Gruppierungen der neurodegenerativen Erkrankungen erfolgt meist nach klinisch-pathologischen Gesichtspunkten, wobei die schwerpunktmäßig betroffene Neuronengruppen und der klinische Phänotyp zur Unterscheidung herangezogen werden. Man unterscheidet zwischen den Demenz-Erkrankungen wie Morbus Alzheimer (Alzheimer-Syndrom, engl. *Alzheimer's disease*, AD, Omim-Nummer: 104300), Prionen-Erkrankungen, wie Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (engl. *Creutzfeldt-Jakob-Disease*, CJD, Omim-Nummer: 123400) und Neurodegenerationen des motorischen Systems. Innerhalb der letzten Gruppe wird zudem noch unterteilt in Erkrankungen, die bevorzugt die Stammganglien betreffen, wie Morbus Parkinson (engl. *Parkinson's disease*, PD, Omim-Nummer: 168600) und Chorea Huntington (engl. *Huntington disease*, HD, Omim-Nummer: 143100) und Erkrankungen, die die Motoneurone betreffen wie die Amyotrophe Lateralsklerose (engl. *Amyotrophic lateral sclerosis*, ALS, Omim-Nummer: 105400) und die Spinale Muskelatrophie (engl. *spinal muscular atrophy*, SMA, Omim-Nummer: 253300).

In der Pathologie vieler neurodegenerativer Erkrankungen sind Proteinablagerungen und -aggregationen beschrieben und werden in einigen Fällen auch zur Klassifizierung herangezogen. Für die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit konnten Ablagerungen von Prionen (González et al., 2005) und für Morbus Alzheimer Amyloide-Ablagerungen beschrieben werden (Sennvik et al., 2000). Für Chorea Huntington konnten polyglutaminhaltige Ablagerungen nachgewiesen werden (Yang et al., 2002) und für Morbus Parkinson eine Ablagerungen von Alpha-Synuklein (Tofaris et al., 2005).

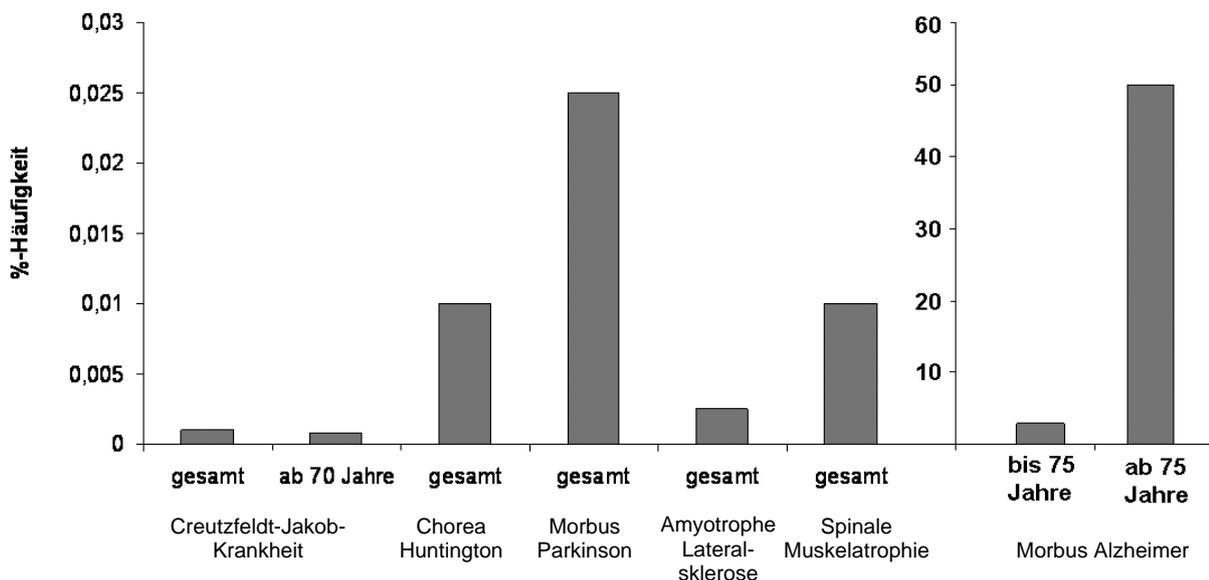


Abb1.1: Prozentualer Anteil ausgewählter neurodegenerativer Erkrankungen in der Bevölkerung (Quelle: OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>)

Neurodegenerative Erkrankungen werden seit Jahren intensiv beforscht, was eindrucksvoll an der Anzahl der Publikationen (Datenbank PubMed: *National Library of Medicine*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>) in diesem Bereich deutlich wird (ca. 127400 PubMed-Einträge, Stand April 2006). Trotz intensiver Forschung und vielen Fortschritten in den vergangenen Jahren gibt es bis heute keine wirksamen Therapien gegen diese neurodegenerative Erkrankungen. Kaum ein Forschungsgebiet weist eine solche Diskrepanz zwischen dem einerseits eingesetzten Forschungsaufwand und verfügbaren, klinischen Therapien andererseits auf (Ley und Herdegen, 2004). Lediglich Symptom-Therapien wie die Dopamin-Therapie im Falle von Morbus Parkinson werden relativ erfolgreich

eingesetzt (Schapira, 2005). Allerdings bieten diese keine dauerhafte Heilung und kann die Krankheitsprogression nur verlangsamen. Bei den anderen neurodegenerativen Erkrankungen beschränkt sich die Medikation meist allein auf die Gabe neuroprotektiver Substanzen, die ebenfalls lediglich die Progression verlangsamen können. Gründe für die geringen Erfolge bei der Therapieentwicklung sind Heterogenität der einzelnen Erkrankungen und das Auftreten vieler spontaner Fälle ohne hereditären Hintergrund. Häufig fehlt ebenso ein detailliertes Verständnis der jeweiligen Pathomechanismen, was die Identifizierung kritischer Gene schwierig macht und somit die Entwicklung wirksamer Therapien erschwert.

Ein Ansatz zur Aufklärung neurodegenerativer Erkrankungen ist die Verwendung von Tiermodellen. Die Modellorganismen werden zur Aufklärung der Pathomechanismen und der ursächlichen Mutationen verwendet, aber auch zur Erforschung möglicher Therapien eingesetzt. Es werden sowohl Tiermodelle verwendet, mit spontanen Mutationen als auch solche mit gezielten genetischen Manipulationen (Hilbush et al., 2005). Im Laufe der letzten Jahre verschob sich das Verhältnis zwischen den spontan entstandenen Mutationen immer mehr in Richtung der gentechnisch veränderten Tiermodelle. Trotz einer Vielzahl von Organismen, die zum Studium von Neurodegenerationen eingesetzt werden, ist die Maus das verbreitetste Tiermodell in der Forschung.

1.1.1 Motoneuronerkrankungen

Unter dem Begriff Motoneuronerkrankungen (engl. *motor neurone disease*, MND) fasst man Erkrankungen zusammen, die das erste, das zweite Motoneuron oder auch beide Motoneurone betreffen. Typische Symptome dieser Erkrankungen sind Spastiken und Muskelatrophien. Die Ursachen oder die genaue Pathologie sind häufig nicht, oder nur teilweise, bekannt. Die verschiedenen Motoneuronerkrankungen werden aufgrund ihres Krankheitsverlaufs unterteilt, wobei es zu Überlappungen zwischen den einzelnen Formen kommen kann.

Zu den Motoneuronerkrankungen, die das erste und das zweite Motoneuron betreffen gehört die Progressive Bulbar Paralyse (auch Brown-Vialetto-van Laere Syndrom genannt, engl. *progressive bulbar palsy*, PBP, Omim-Nummer: 211530). Die Erkrankung kommt meist während der Kindheit zum Tragen und zeigt eine sehr variable Progressionen (Hawkins et al., 1990). Der Erbgang ist bis zum heutigen

Zeitpunkt nicht klar und es konnte bisher keine ursächliche Mutation identifiziert werden (Megarbane et al., 2000). Die Amyotrophe Lateralsklerose zählt ebenso zu den Motoneuronerkrankungen, die sowohl das erste als auch das zweite Motoneuron betreffen. Die Spinale Muskelatrophie hingegen betrifft nur das zweite Motoneuron.

1.1.1.1 Spinale Muskelatrophie

Die Spinale Muskelatrophie (SMA) zählt mit einem Auftreten von 1:10000 in der Bevölkerung zu den häufigsten Motoneurondegeneration (Ogino und Wilson, 2002). Zumeist wird diese Erkrankung autosomal rezessiv vererbt. Typisch ist ein Defekt der zum Absterben des zweiten Motoneurons, welches sich im Hirnstamm und im Rückenmark befindet, führt. Man unterscheidet vier klassische Typen aufgrund verschiedener Schweregrade und dem Einsetzen erster Krankheitssymptome.

Typ I, auch als Werdnig-Hoffmann Syndrom oder akute infantile SMA bezeichnet (OMIM-Nummer: 253300), gilt als die schwerste und aggressivste Form der SMA. Typ I SMA tritt in den ersten sechs Lebensmonaten auf und führt innerhalb weniger Jahre zum Tod. Bei Typ II, auch chronisch infantile SMA oder intermediäre SMA genannt, entwickeln betroffene Kinder in den ersten Lebensjahren Symptome und haben eine deutlich eingeschränkte Lebenserwartung (OMIM-Nummer: 253550). Typ III, auch Kugelberg-Welander Erkrankung oder juvenile SMA (OMIM: 253400), beginnt ebenfalls in den ersten Lebensjahren, verläuft aber deutlich milder als Typ I und II. Die Lebenserwartung der Betroffenen ist kaum reduziert. Die mildeste Form der SMA ist Typ IV, auch adulte SMA genannt (OMIM-Nummer: 271150), tritt erst nach dem dreißigsten Lebensjahr auf und beeinträchtigt die Lebenserwartung nicht wesentlich (Ogino und Wilson, 2004). Bei allen vier klassischen Typen ist die Ursache eine Deletion oder eine Mutation im *survival of motor neuron*-Gen (*SMN*), welches auf Chromosom 5q13 des Menschen kartiert. *SMN* ist ubiquitär exprimiert und ist in das RNA-Spleißen und axonalem Transport involviert (Paushkin et al., 2002). Es existiert eine Korrelation zwischen der Größe des deletierten Bereiches in der Region 5q13 und der Einteilung in die unterschiedlichen Typen der SMA (Ogino und Wilson, 2004). Ein transgenes Mausmodell, die *Smn*-transgenen Maus, und die spontane Maus-Mutante Wobbler sind Tiermodelle für diese Erkrankung (Tab.1.1). Für das *Smn*-transgene Mausmodell wurden für die humane *Smn2*-Variante transgene Mäuse generiert und diese mit *smn*-defiziente Mäusen gekreuzt. Die

transgenen *Smn*-defiziente Mäuse wiesen typische Merkmale von SMA auf (Monani et al., 2000).

| Erkrankung | OMIM-Nummer | Mausmodell | Betroffenes Protein | Funktion | Referenz |
|------------|-------------|-----------------------------|---------------------|--|---------------------------|
| SMA | 253300 | Wobbler (spontan) | Vps54 | Vesikeltransport | Schmitt-John et al., 2005 |
| | | Targeted knock-in | Smn1 | mRNA Prozessierung | Monani et al., 2000 |
| SMARD1 | 604320 | <i>nmd</i> -Mouse (spontan) | Ighmbp2 | Transkriptionale Aktivierung von ATPasen/DNA | Cox et al., 1998 |
| | | <i>pnm</i> -Mouse (spontan) | Tbce | Mikrotubuli-Organisation | Bommel et al., 2002 |
| SBMA | 313200 | Targeted knock-in | Ar | Androgen-Rezeptor | McManamny et al., 2002 |

Tab.1.1: Ausgewählte Mausmodelle verschiedener spinaler Muskelatrophien

Außer den vier klassischen SMA-Typen sind weitere SMA-ähnliche Erkrankungen beschrieben und teilweise charakterisiert worden, die nicht auf Mutationen oder Deletionen auf Chromosom 5q13 beruhen. Diese Erkrankungen werden unter der Bezeichnung SMA Typ V zusammengefasst. Dazu zählen unter anderem die SMA mit initialer respiratorischer Insuffizienz (engl. *spinal muscular atrophy with respiratory distress*, SMARD1, OMIM:604320), die durch Mutationen im *immunoglobulin mu-binding protein 2* (IGHMBP2)-Gen ausgelöst wird (Grohmann et al., 2001). Als Tiermodell für diese Erkrankung wird die *pnm*- und die *nmd*-Maus verwendet (Tab.1.1). Die spinale und bulbäre Muskelatrophie (Kennedy Erkrankung, SBMA, OMIM: 313200, Tab1.2) ist eine SMA-Erkrankung, welche durch CAG-Expansionen im Androgen-Rezeptor (Ar) ausgelöst wird (LaSpada et al., 1991). Für diese Erkrankung existiert ein transgenes Mausmodell, welches die humane Ar-Variante mit jeweils einer 65fachen und einer 120fachen CAG-Wiederholungen trägt (Tab1.1, McManamny et al., 2002). In der Bevölkerung finden sich normalerweise zwischen 11 bis 33 CAG-Wiederholungen, für SBMA-Patienten sind zwischen 38 und 72 Wiederholungen beschrieben (Gusella et al., 2000). Während die transgenen Mäuse mit einer 65fachen Wiederholung einen milderen Phänotyp aufweisen, zeigten die für die 120fache Wiederholung transgenen Tiere Verhaltensauffälligkeiten und eine Degeneration der Motoneuronen im Rückenmark. Dies führt zu einer

Muskelschwäche und –atrophie (McManamny et al., 2002). Die autosomal dominante spinale Muskelatrophie (Finkel-Typ, OMIM: 182980) wird durch Mutationen im *Vesicle-associated Membrane Protein-Gen (VAPB)* ausgelöst (Nishimura et al., 2004). Für die autosomal dominante TypII hereditäre Motor-Neuropathie (dHMN2, OMIM: 158590) konnten Mutationen im *Heat Shock Protein 8 (Hspb8)* nachgewiesen werden (Irobi et al., 2004).

1.1.1.2 Amyotrophe Lateralsklerose

Diese Erkrankung wurde vor über 130 Jahren von dem Arzt Charcot beschrieben und tritt mit einer Häufigkeit von 1:100000 in der Bevölkerung auf (Bruijn et al., 2004). Damit zählt die Amyotrophe Lateralsklerose (oder Myatrophe Lateralsklerose, Lou-Gehrig-Syndrom, früher auch Charcot-Krankheit, engl. *amyotrophic lateral sclerosis*, ALS, Omim-Nummer: 105400) zu einer der häufigsten Muskelerkrankungen.

Charakteristisch ist eine Degeneration des ersten und zweiten Motoneurons, die in einigen Fällen von Akkumulationen von Neurofilamenten, Hitzeschock-Proteinen und Ubiquitin-positiven Einschlüssen begleitet wird (Hirano et al., 1984). In der Regel bricht die Erkrankung um das sechzigste Lebensjahr aus, aber es gibt auch einige Fälle bei denen die Krankheit deutlich früher auftritt. Die frühesten Fälle von ALS wurden für den Alterszeitraum zwischen fünfzehn und dreißig Jahren beschrieben. Nach Ausbruch der Erkrankung versterben die meisten Patienten meist durch respiratorische Insuffizienz nach fünf Jahren (Winter und Ludolph, 2004). Die Verläufe und die Pathologie der ALS-Erkrankung sind sehr unterschiedlich, so kommt es immer wieder bei Patienten zu so genannten Plateau-Phasen, bei denen die Progression der Erkrankung nicht weiter voranschreitet. Man unterscheidet zwischen zwei Formen der ALS, der familiären und der sporadischen, wobei die familiäre ALS (fALS) nur ca. 10% aller ALS-Fälle ausmacht.

Bei ca. 20% der familiären Formen konnten dominante Allele der *Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1)* (Rosen et al., 1993) identifiziert werden. Bis heute sind über 100 verschiedene Mutationen im *SOD1-Gen* beschrieben. Wie sich der Pathomechanismus der so ausgelösten Neurodegeneration darstellt, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden und ist Gegenstand aktueller Forschung. Vermutlich handelt es sich um einen, durch die Mutationen verursachten, Funktionsgewinn („*gain of function*“), da die normale Funktion von SOD1, die Verstoffwechslung von Superoxiden zu Wasser oder Hydrogenperoxid, nicht beeinträchtigt ist (Reaume et

al., 1996). Diskutiert wird eine Fehlfaltung und Aggregation der Proteine, die zu Transportdefekten und schließlich zum Neuronentod führen (Bossy-Wetzel et al., 2004). Weiterhin werden ebenfalls Einflüsse von umliegenden Gliazellen als Auslöser der Neurodegeneration in Betracht gezogen (Clement et al., 2003).

Weitere mit fALS assoziierte Loci konnten in der Vergangenheit identifiziert werden, die entsprechenden Gene konnten aber bisher noch nicht alle identifiziert werden. Bei der sporadischen Form ist bisher wenig über die Ursachen bekannt.

Im Vergleich zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen gibt es wenige Mausmodelle für die Amyotrophe Lateralsklerose. In der Vergangenheit galten besonders die Wobblers-, die *mnd*- und die *pnn*-Maus als Modelle für ALS. Seit der Identifizierung der dominanten Mutationen im humanen *SOD1*-Gen, wurden verschiedene Versuche unternommen, ein entsprechendes Mausmodell zu erstellen. *Sod1*-defiziente Mäuse zeigen allerdings keine Neurodegeneration sondern eine leicht reduzierte Fertilität und Beeinträchtigungen im Metabolismus (Reaume et al., 1996, Ho et al., 1998). Als Mausmodelle für die Amyotrophe Lateralsklerose wird zumeist eine transgene Maus verwendet, die die humane Variante von *SOD1*, die eine Glyzin zu Alanin Substitution an Position 93 trägt (Rosen et al., 1993), überexprimiert (Bordet et al., 2001). Die Maus zeigt eine Schwächung der Muskeln bedingt durch den Verlust der spinalen Motoneuronen. Die Lebenserwartung beträgt ca. 5-6 Monate. Für eine weitere humane *SOD1*-Variante, die eine Glyzin zu Arginin Substitution an Position 37 trägt, welche mit einer familiären Form von ALS assoziiert ist, wurde ebenfalls eine transgene Maus generiert, die eine progressive Motoneurondegeneration aufweist (Wong et al., 1995). Durch eine postnatale Überexpression von Dynamitin in Motoneuronen konnte ein weiteres Mausmodell für ALS etabliert werden. Die Überexpression führt zu einer Auflösung des Dynein-Dynactin-Komplexes, was wiederum zu einer Inhibierung des axonalen Transports führt. Die Mäuse zeigen eine Neurodegeneration und eine Akkumulation von Neurofilamenten (LaMonte et al., 2002).

Die Primäre Lateralesklerose (engl. *primary lateral sclerosis*, PLS, Omim-Nummer: 606353) wird ausgelöst durch eine Mutation im *ALS2*-Gen, welches für Alsin kodiert. Es gibt viele Gemeinsamkeiten mit der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS), so dass erst im Zuge besserer diagnostischer Verfahren eine klare Trennung zwischen den beiden Erkrankungen vorgenommen werden konnte (Pringle et al., 1992). PLS ist im Gegensatz zu ALS charakterisiert durch eine Degeneration des ersten Motoneurons.

ALS2 ist auf Chromosom 2 des Menschen lokalisiert und konnte mittels Kartierungsexperimenten identifiziert werden (Hadano et al., 2001, Yang et al., 2001). Obwohl ubiquitär exprimiert, findet es sich in hohen Konzentrationen in den neuronalen Geweben, wo es an den endosomalen Membranen auf der zytoplasmatischen Seite lokalisiert ist (Yamanaka et al., 2003).

Eine juvenile autosomal dominante Form der ALS (engl. *juvenile ALS*, ALS4, Omim-Nummer: 602433) wurde von Chance und Mitarbeitern beschrieben, die sowohl das erste als auch das zweite Motoneuron betrifft und erste Symptome vor dem fünfundzwanzigsten Lebensjahr auftreten (Chance et al., 1998). Die verantwortliche Mutation konnte im Senataxin Gene (SETX) identifiziert werden (Chen et al., 2004). Eine Funktion konnte Senataxin bisher nicht zugeordnet werden.

Ein weiterer identifizierter ALS-Locus ist ALS8. In einer brasilianischen Familie wurden bei 26 Mitgliedern eine langsam progrediente autosomal dominante ALS beschrieben werden (Nishimura et al., 2004). Verantwortlich ist eine „*missense*“ Mutationen im Gen *Vesicle-associated membrane protein-associated protein B* (VAPB), die zu einem Aminosäureaustausch an Position 56 führt (Nishimura et al., 2005). Da VAPB an Vesikel assoziiert ist, erscheint eine Funktion im Transport wahrscheinlich (Nishimura et al., 2004).

1.2 Spermatogenese und Globozoospermien

Die Spermatogenese beschreibt den Prozess der Spermienbildung aus den Keimzellen hin zum Spermium. Dieser Prozess stellt einen der komplexesten Zelldifferenzierungen im Tierreich dar. Spermatogenesedefekte sind weit verbreitet, so leiden ca. 10% aller Paare an Kinderlosigkeit, was schätzungsweise zu 50% an männlicher Infertilität liegt (De Kretser und Baker, 1999). Sinkt der Anteil der intakten und funktionsfähigen Spermien unter 70% spricht man je nach Anteil von einer eingeschränkten bis totalen Infertilität (Nieschlag, 1993). Ein weit verbreiteter Defekt ist die Teratozoospermie, welches ein Sammelbegriff für fehlgeformte Spermien ist, deren Anteil über 15% der gesamten Spermienanzahl ausmacht (Szczygiel und Kurpisz, 1999). Nicht selten sind genetische Ursachen für eine solche Infertilität verantwortlich. Es ist bisher allerdings wenig über den exakten Mechanismus der Spermatogenese und die beteiligten Gene und Proteine bekannt.

Der Spermienkopf ist umgeben von einer Plasmamembran, die an der Schnittstelle Kopf-Schwanz an den posterioren Ring grenzt (Abb.1.2). Der gesamte Kopf ist in zwei Regionen einzuteilen, die Akrosomregion, die sich noch in die anteriore und die posteriore Akrosomregion, oder auch Äquatorialesegment unterteilt, und die Postakrosomregion. Der größte Teil des Kopfes wird von dem stark kondensierten Kern eingenommen, der außerdem noch aus dem Akrosom, dem *Nuclear Envelope* und den äußeren und inneren akrosomalen Membranen besteht. Der vom Akrosom abgedeckte Teil des Spermienkopfes variiert zwischen den Spezies, bedeckt aber meist die obere Hälfte des Kopfes. Im unteren Teil schließt sich an das Akrosom die postakrosomale Hülle, die auch als „calyx“ bezeichnet wird, an.

| Mausmodell | Betroffenes Protein | Funktion | Referenz |
|--------------------|---------------------|---|-------------------------|
| Targeted knock-out | Csnk2a2 | Kinase-Aktivität | Xu et al., 1999 |
| Targeted knock-out | Jam3 | Zelladhäsion | Gliki et al., 2004 |
| Targeted knock-out | Pms2 | Mitose, DNA-Reparatur | Baker et al., 1995 |
| Targeted knock-out | Poll | DNA-Reparatur, Replikation | Kobayashi et al., 2002 |
| Targeted knock-out | Styx | Spermatogenese | Wishart et al., 2002 |
| Targeted knock-out | Tnp2 | Spermatogenese, Chromosomenorganisation | Adham et al., 2001 |
| Targeted knock-out | Hrb | Akrosombildung | Kang-Decker 2001 |
| Targeted knock-out | Gpoc | Transportprozesse | Yao et al., 2002 |
| Azh | Hook1 | Mikrotubuli-Organisation | Hugenholtz et al., 1984 |
| Wobbler | Vps54 | Transportprozesse | Schmitt-John et al 2005 |

Tab.1.2: Gängige Mausmodelle, die eine Globozoospermie aufweisen

Eine weitere wichtige Rolle in der Spermatogenese nimmt das Akroplaxom ein. Es besteht unter anderem aus Keratin, Aktin und *activity regulated cytoskeletal-associated protein* (Arc). Das Akroplaxom wird nach der Kondensation des Kerns gebildet. Die akrosomalen Vesikel, welche vom Golgi-Apparat abgeschnürt werden, wandern in Richtung des kondensierten Kerns und lagern sich an das Akroplaxom an (Abb.1.2). Es folgt eine Elongation des Akrosoms wodurch es über den Kern gespannt wird. Das Akroplaxom spielt vermutlich eine wichtige Rolle in der Kopfkondensation und in der Elongation des Akrosoms. Vor einiger Zeit konnte gezeigt werden, dass das *Kinesin Family Member C1* (KIFC1), ein C-terminaler Kinesinmotor, in die Elongation des Akrosoms involviert ist, da eine entsprechende

Lokalisation an den akrosomalen Vesikeln und am fertigen Akrosom festgestellt wurde. Die genaue Rolle von KIFC1 konnte allerdings noch nicht aufgeklärt werden (Yang und Sperry, 2003).

Das Ausbilden und das Abbauen der Manschette, die aus Bündeln von Mikrotubuli besteht, fällt exakt mit dem Start und Ende der Kondensation und Elongation des Kerns zusammen, wodurch die Vermutung unterstützt wird, dass die Manschette eine Rolle in der Kondensation und Elongation übernimmt. Angeheftet sind die Mikrotubuli an den posterioren Ring und verlaufen in Richtung des Halses (Abb1.2). Obwohl mehrere assoziierte Moleküle bekannt sind, darunter auch verschiedene Mitglieder der *RAS oncogene family Proteine* (Rab), ist der genaue Mechanismus unbekannt.

In der Literatur sind verschiedene Mausmutanten beschrieben (Tab.1.2), die Globozoospermie mit Schwanzdefekten aufweisen. Zu den meist untersuchten Globozoospermie-Modellen gehören neben der Wobbler-Maus die *Hrb*- und *Gopc*-defiziente Maus und die spontane Mutante *Azh* (Mendoza-Lujambio et al., 2002).

1.1.1 Ausgewählte Mausmodelle der Globozoospermie

Die erste Beschreibung einer Mutante, die ausschließlich Defekte in der Kopfform der Spermien aufweist, veröffentlichten Hugenholtz und Mitarbeiter im Jahre 1984 mit der *Azh*-Mutante. Die Mutation ist autosomal rezessiv und hat eine Penetranz von 100% (Meistrich et al., 1992). Die ersten morphologischen Abweichungen in der Spermatogenese wurden bei der Ausbildung der Manschetten-Mikrotubuli beobachtet, die eine Fehllokalisierung aufweisen (Meistrich et al., 1990, Moreno et al., 2006). Daraus resultiert eine Fehlpositionierung des Kerns und Abnormalitäten in der Flagella-Anheftung an den Kopf. Mendoza-Lujambio und Mitarbeiter konnten im Jahr 2002 die verantwortliche Mutation im *Hook1*-Gen identifizieren. Durch eine Deletion der Exons 10 und 11 entsteht ein verkürztes Protein. Das *Hook1*-Gen, welches große Homologie zu dem Hook-Gen von *Drosophila melanogaster* aufweist, ist involviert in die Verbindung der Manschetten-Mikrotubuli mit der Flagelle an zelluläre Strukturen (Walenta et al., 2001) und spielt so eine wichtige Rolle in der Positionierung der Manschette und der Flagelle.

Die *Golgi-associated PDZ- and coiled-coil motif-containing protein* (*Gopc*)-defiziente Maus weist als primären Defekt eine Fragmentierung des Akrosoms während der

Spermatogenese auf. Die akrosomalen Vesikel fusionieren nicht, was durch einen Fehler während der Anheftung an das Akroplaxom verursacht wird, und durch das fehlende Akrosom kommt es in der Folge zur abnormalen Kopfform und einer Fehlanordnung der Mitochondrien (Ito et al., 2004). Von Gopc wird angenommen, dass es eine Rolle im Vesikeltransport spielt (Yao et al., 2001). Gopc kann ausschließlich in perinukleären Regionen und am Golgi-Apparat nachgewiesen werden (Yao et al., 2002). Das humane Homolog von GOPC interagiert mit Syntaxin 6 (Charest et al., 2001), für das eine Funktion während des Anheftens von Post-Golgi-Vesikeln mit den frühen Endosomen angenommen wird (Simonsen et al., 1999).

Die *HIV-1 Rev binding protein (Hrb)*-defiziente Maus wurde zuerst von Kang-Decker und Mitarbeitern im Jahre 2001 beschrieben. Die Spermien zeigen eine verringerte Mobilität, ihre Anzahl ist reduziert, sie weisen deformierte Kerne auf und das Akrosom wird nicht angelegt. Die proakrosomalen Vesikel schnüren sich vom Golgi-Apparat ab, aber die Fusion dieser Vesikel schlägt fehl. Die Mitochondrien des Mittelstückes weisen ebenfalls eine Fehlanordnung auf, das Akroplaxom wird jedoch angelegt (Kierszenbaum et al., 2004). Hrb interagiert mit *epidermal growth factor receptor pathway substrate 15 (Eps15)*, welches ein Vesikeladapterprotein für Endozytose und Vesikeltransport ist. Für Hrb wird gefolgert, dass es eine wichtige Rolle bei der Anlagerung und Fusion von proakrosomalen Vesikeln erfüllt (Kierszenbaum et al., 2004).

1.3 Der GARP-Komplex

Für eine Stoffaufnahme bzw. den intrazellulären Transport erfordert deren Existenz zwangsläufig spezialisierte Prozesse. Eukaryotische Zellen haben ein inneres Membransystem entwickelt, das ihnen die Aufnahme von Makromolekülen mittels Endozytose ermöglicht und darüber hinaus den Transport zu den in den Lysosomen gespeicherten Verdauungsenzymen gestattet. Verschiedenen Theorien über die Mechanismen des Vesikeltransportes wurden schon vor 30 Jahren von Palade (Palade, 1975) aufgestellt. Die Vesikel schnüren sich von der Ausgangsmembran ab, man spricht auch von abknospen, was zu einer Reduktion an Membranmaterial an den Ausgangsorganellen führt. Aus diesem Grund ist ein Recyclingweg von besonderer Bedeutung, da es ansonsten zu einem starken Ungleichgewicht an

Membranmaterial zwischen den Ausgangs- und Zielkompartimenten kommt. Um ein Gleichgewicht wieder herzustellen, fällt dem Rücktransport eine sehr wichtige Bedeutung zu, man spricht auch vom retrograden Transport.

Ein Teil dieses retrograden Transportwegs ist der Weg von den späten Endosomen zurück zum Golgi-Apparat. Häufig spielen dabei größere Proteinkomplexe in den Transportmechanismen eine wichtige Rolle. Ein, zu erst in der Hefe beschriebener Komplex, ist der *Golgi associated retrograd Protein* (GARP) Komplex. Hierbei handelt es sich um einen Trimeren Komplex aus drei Untereinheiten, die im Verhältnis 1:1:1 vorliegen (Conibear und Stevens, 2000). Die einzelnen Untereinheiten sind *Vesicular Protein Sorting 54* (Vps54), Vps53 und Vps52. Alle drei Untereinheiten scheinen für die Stabilität des GARP-Komplexes entscheidend zu sein, da in Abwesenheit eines der drei Untereinheiten der Komplex degradiert (Conibear und Stevens, 2000). Ein weiterer Bestandteil des GARP-Komplexes ist Vps51, welcher jedoch keinen Betrag zu Stabilität des Komplexes liefert und relativ leicht ablösbar ist. Es wird vermutet, das Vps51 zusätzliche Funktionen übernimmt, wie beispielsweise die Initialisierung der Vesikelfusion durch Vermittlung der Bindung mit SNAREs (SNAP- Rezeptoren; SNAP= soluble NSF (N- ethylmaleimidesensitive factor) attachment protein) (Conibear et al., 2003). Für Vps54 konnte zudem gezeigt werden, dass nur der N-terminale Teil in die Bindung an Vps53 und Vps52 involviert ist, nicht aber der C-terminale Teil des Proteins (Quenneville et al., 2006). Eine genaue Funktion oder eine Domäne konnte in diesem C-terminalen Teil noch nicht identifiziert werden. In der Maus und der Ratte konnte Walter und Mitarbeiter das Homolog von Vps54 identifizieren (Walter et al., 2002). Für den Menschen konnten ebenfalls alle drei Untereinheiten des GARP-Komplexes gefunden werden, die wie in der Hefe an den späten Endosomen und am Golgi-Apparat lokalisiert sind (Liewen et al., 2005). Vps51 konnte bisher weder auf humaner Seite, noch bei anderen höheren Eukaryonten identifiziert werden.

1.4 Wobbler-Maus

Obwohl eine Reihe von Maus-Mutanten in der Literatur beschrieben wurden, die pleiotrophe Defekte aufweisen, sind nur selten gleichzeitig neurologische und Spermatogenesedefekte beschrieben worden. Die Wobbler-Maus ist die einzige Mausmutante mit einer Motoneurondegeneration und einer Globozoospermie. Einzig

für die Weaver-Maus ist neben einer Neurodegeneration auch ein Spermatogenesedefekt beschrieben, wobei bei der Weaver-Maus keine Motoneuronen von der Degeneration betroffen sind (Lane et al., 1964, Harrison und Roffler-Tarlov, 1994).

Die Wobbler-Maus gehört zu den älteren Mausmutanten und wurde bereits 1956 von Falconer (Falconer, 1956, Tab.1.3) als spontane Mutation im C57BL/Fa Stamm am *Institute of Animal Genetics* in Edinburgh beschrieben. Als erste sichtbare Anzeichen der Erkrankung weisen die Tiere im Alter von ca. 21 Tagen einen Tremor im Kopfbereich und eine Muskelatrophie der Vorderpfoten auf. Die Atrophie schreitet stetig fort, breitet sich auf den Schultergürtel aus und betrifft nach mehreren Monaten auch die Hinterbeine der Tiere. Durch die Atrophie und den Tremor zeigen die betroffenen Tiere im Frühstadium einen wackligen Gang, was zu der Bezeichnung Wobbler (engl. *to wobble* = wackeln), führt. Zudem weisen die Tiere kurz vor dem Beginn des Tremors eine Reduktion der Gewichtszunahme auf. Die betroffenen Tiere erreichen nur ca. 60 % des Gewichtes der nicht betroffenen Geschwistertiere. Die Lebenserwartung der Wobbler-Mäuse reicht bis zu 16 Monaten (Andrews et al., 1974), wobei nicht alle Tiere dieses Alter erreichen. Durch die Muskelatrophie ist der Allgemeinzustand beeinträchtigt, was sich auch auf die Futteraufnahme auswirkt. Neben der Atrophie haben die männlichen Wobbler-Tiere einen Spermatogenesedefekt, der sich in einer Globozoospermie äußert.

Die Ursache für die Wobbler-Mutation konnte in unserer Arbeitsgruppe identifiziert werden. Es handelt sich um eine Punktmutation im letzten Exon des Gens *Vesicular Protein Sorting 54 (Vps54)*. Im Exon 24 ist ein Austausch von einer Adenin- zu Thyminbase zu beobachten. Auf Aminosäureebene resultiert daraus ein Austausch von Leuzin zu Glutamin, also von einer unpolaren zu einer polaren Aminosäure. Die Aminosäure Leuzin an der Position 967 des Vps54-Proteins ist in 8 von uns sequenzierten Mausstämmen, *Mus musculus* 129, C65Bl/J, C57BL/10, SWR und SJL, *Mus musculus, castaneus*, *Mus musculus molossinus* und *Mus spretus* konserviert. Außerdem ist sie in Wirbeltieren wie dem Menschen, der Ratte, dem Schimpansen, dem Hund, dem Huhn, dem Frosch, dem Zebrafisch und dem Kugelfisch hoch konserviert (Schmitt-John et al., 2005).

Es konnten vier verschiedene Spleiß-Isoformen von *Vps54* gezeigt werden (Hahn, 2004, Abb.1.3), von denen alle vier den C-terminalen Bereich enthalten, welcher die

Wobbler-Mutation trägt. Die Mutation scheint keinen Einfluss auf das Spleißen von *Vps54* zu haben, da alle 4 Transkripte mittels PCR nachgewiesen werden konnten.

| Jahr | Entdeckung | Referenz |
|------|--|--------------------------------|
| 1955 | Entdeckung und Erstbeschreibung von „Wobbler“ als autosomal rezessive Spontanmutante | (Falconer, 1956) |
| 1968 | Detaillierte Beschreibung des neurologischen Phänotyps | (Duchen und Strich, 1968) |
| 1980 | Aberante Spermien Morphologie: Mikrotubuli-Defekt | (Leetsma und Szepsenwol, 1980) |
| 1982 | Wobbler ist primär eine Erkrankung der Perikaria von degenerierenden Motoneuronen | (Mitsumoto und Bradley, 1982) |
| 1988 | Massive Astrogliose im Rückenmark | (Laage et al., 1988) |
| 1991 | Defekte Akrosomfusion | (Heimann et al., 1991) |
| 1992 | Wobbler-Gen-Kartierung auf Mausechromosom 11 | (Kaupmann et al., 1992) |
| 1997 | Zellautonome Wirkung des Wobbler-Gens | (Augustin et al., 1997) |
| 2002 | Detaillierte physikalische Karte des Kandidatengenbereichs | (Fuchs et al., 2002) |
| 2005 | Identifizierung einer Punktmutation in <i>Vps54</i> als Wobbler-Mutation | (Schmitt-John et al., 2005) |

Tab.1.3: Exemplarische Auswahl wichtiger chronologischer Eckdaten

Die Auswirkungen der Wobbler-Erkrankung sind zellautonom, wie schon durch die Chimärenexperimente von Augustin et al. 1997 bestätigt worden sind. Bei heterozygoten Tieren sind keine Auswirkungen der Wobbler-Mutation bekannt.

Die defekte Spermatogenese beruht nicht auf einem abnormalen Testosteronniveau (Heimann et al., 1991; Leestma et al., 1980). Die Zahl der Spermien ist um ca. 20-30% reduziert, ebenso gibt es Einschränkungen in der Mobilität der Spermien. Die Spermien besitzen kein ausgebildetes Akrosom, da keine Kappe um den Kern geformt wird. Die proakrosomalen Vesikel werden vom Golgi-Apparat abgeschnürt und wandern in Richtung des Kerns. Dort fusionieren sie größtenteils, aber die Elongation über den Kern erfolgt nicht. Die Akrosomvesikel bleiben teilweise am Kern haften, ein anderer Teil verbleibt im Zytoplasma. Die Kondensation des Kerns erfolgt nicht, was auch für die anderen Globozoospermie-Modelle beschrieben wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Msj-1* (*DnaJ* (*Hsp40*) homolog, subfamily B, member 3), einem Heat-Shock Protein, im Wobbler-Testis

reduziert ist (Meccariello et al., 2002; Berruti et al., 1998, Berruti und Martegani, 2001). Eine ähnliche Fehlregulierung konnte auch für das Rückenmark gezeigt werden. Die Rolle, die Msj-1 in der Spermatogenese einnimmt, ist bisher unbekannt. Hinsichtlich der weiblichen Fertilität gibt es bisher keine Erkenntnisse, die eine Aussage hinsichtlich der Oogenese von Wobbler-Weibchen zulassen.

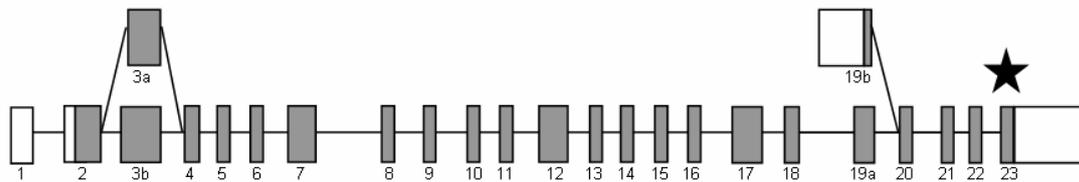


Abb.1.3: Spleiß-Isoformen von *Vps54* (Schmitt-John et al., 2005)

Der Verlauf der Motoneurondegeneration der Wobbler-Maus wird im Allgemeinen in drei Phasen eingeteilt. Die präsymptomatische Phase ohne erkennbare Symptome, die die ersten drei Lebenswochen einnehmen kann, die evolutionäre Phase in der die Symptome sich entwickeln, die von 18 Tagen bis ca. 49 Tagen je nach Krankheitsprogression reicht, und abschließend die Stabilisationsphase in der alle Symptome voll ausgebildet sind.

Erstes Anzeichen der Motoneurondegeneration ist eine Vakuolisierung der Zellen, die hauptsächlich in Rückenmark und Hirnstamm auftritt und bis zu 50% der Motoneurone betrifft. Der erste Nachweis dieser Degeneration wurde ab dem 14 Tag bei Wobbler-Tieren beobachtet (Rathke-Hartlieb et al., 1999). Besonders typisch ist eine deutliche Vakuolisierung, die schon relativ früh zu Beginn der Erkrankung auftritt. Mitsumoto und Bradley konnten im Jahr 1982 zeigen, dass es auch an den Axonen erste Anzeichen einer Degeneration gibt. In erster Linie ist das Perikaryon der Motoneuronen betroffen und anschließend folgt der Untergang des Axons. Die Motoneuronen durchlaufen keine Apoptose, was mittels Tunel-Färbungen (Blondet et al., 2001), durch das Fehlen einer Chromatinkondensation und Fragmentierung des Zellkerns gezeigt werden konnte. Indirekt wurde dies auch durch die Kreuzung von Wobbler-Mäusen mit *Bcl2*-überexprimierenden Mäusen gezeigt. *Bcl2* inhibiert die Apoptose und rettet so Neuronen vor dem programmierten Zelltod (Merry und Korsmeyer, 1997). Durch die Einkreuzung konnte die Degeneration von Motoneuronen bei Wobbler-Mäusen nicht verhindert werden.

Somit durchlaufen die Motoneuronen der Wobbler-Tiere keine Apoptose, es handelt sich aber auch nicht um einen nekrotischen Prozess, der in der Regel relativ schnell abläuft. Es scheint sich bei der Motoneurondegeneration der Wobbler-Mäuse um einen weiteren, bisher nicht weiter beschriebenen Weg des Zelltodes zu handeln. Bei Caspase 3-defizienten Mäusen konnte ein ähnlicher Zelltod beobachtet werden, welcher von der Caspase 3 unabhängig ist (Oppenheim et al., 2001).

Wie bei vielen neurodegenerativen Prozessen akkumulieren auch bei Wobbler-Tieren verschiedene Proteine in den Motoneuronen, besonders typisch sind die Akkumulationen von Neurofilamenten und Ubiquitin-positiven Einschlüssen in den Neuronen. Auch bei einigen Fällen von ALS konnte ein ähnlicher Phänotyp gezeigt werden (Hirano et al., 1984), ebenso bei den klassischen Tiermodellen für diese Erkrankungen den *SOD1*-transgenen Mäusen (*Cu/Zn superoxide dismutase*, *SOD1*). Neben ALS konnten derartige Akkumulationen bei der Alzheimer Erkrankung und Morbus Parkinson gezeigt werden. In diesem Zusammenhang wurde die Hypothese formuliert, dass eine veränderte Chaperon-Aktivität diesen Proteinakkumulationen zugrunde liegen könnte (Welch et al., 1998).

Auf Transkript-Ebene wurden bei Wobbler-Mäusen unter anderem eine Fehlregulierung verschiedener Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren gefunden (Boillee et al., 2003). Es handelt sich dabei wahrscheinlich um eine Reaktion auf den Neuronentod. Diese Reaktion zeigt sich ebenfalls auf histologischer Ebene, auf der man eine Aktivierung der Mikroglia und der Astroglia finden kann (Rathke-Hartlieb et al., 1999), welche besonders durch die erhöhte Expression von CD45 und GFAP gekennzeichnet ist. Beide Reaktionen sind voneinander unabhängig. Da die Gliazellen erst nach dem Beginn der Motoneurondegeneration aktiviert werden, ist anzunehmen, dass es sich dabei um einen Sekundäreffekt als Reaktion auf den Neuronentod handelt.

Zwischen Wobbler- und Kontroll-Tieren finden sich im Rückenmark viele Metabolite verändert. Die Veränderungen betreffen ganz unterschiedliche Synthesewege (Boillée et al., 2003).

Die Wobbler-Pathologie weist Parallelen mit den humanen Erkrankungen ALS und SMA auf. Aus diesem Grund wurde die Wobbler-Maus in der Vergangenheit häufig für die Erforschung möglicher Therapien verwendet. In der Regel werden die Therapeutika nach dem Auftreten der ersten Symptome verabreicht und die Wirksamkeit durch Erfassen der Muskelkraft in den Vorderbeinen ermittelt. Neben

vielen erfolglosen Therapieversuchen konnte mit der Kombinationsgabe von BDNF und CNTF oder IL-6 eine Verbesserung der Pathologie erzielt werden (Mitsumoto et al., 1994; Ikeda et al., 1996). Bei ALS-Patienten konnte ein derartiger Erfolg nicht erzielt werden.

Es ist bisher unklar, wie sich die Punktmutation in *Vps54* auswirkt. Eine Erklärung für die Veränderungen auf Transkript- und Metabolom-Ebene konnte bislang nicht gefunden werden und ein Modell für den Pathomechanismus der Wobbler-Maus ist bisher nicht etabliert.

1.1.1 Quantitative Trait Loci der Wobbler-Maus

Modifizierende Allelvariationen von Genen, auch Quantitative Trait Loci (QTL) genannt, können den Verlauf oder die Ausprägung einer Krankheit beeinflussen (Giess et al., 2000; Scharf et al., 1998, Kunst et al., 2000). Sie werden auch nur wirksam, wenn die entsprechende Krankheit auftritt, ohne die Erkrankung hat QTL keinen Einfluss auf den Phänotyp. Nicht zu verwechseln sind die QTL mit den Variationen, die durch exogene Faktoren gegeben sind, so z.B. Alter, Lebensumstände und andere Umwelteinflüsse.

Sowohl der neurologische als auch der Spermio-genese-Phänotyp der Wobbler-Maus werden bei Kreuzungen mit anderen Maus-Inzuchtstämmen durch QTL beeinflusst. Vor allem bei Kreuzungen mit *Mus musculus castaneus* wurden starke Phänotypvariationen beobachtet

Die Atrophie, welche zu Beginn nur die Vorderbeine der Tiere betrifft, breitet sich unter dem Einfluss eines QTL aus dem *Castaneus*-Genom verfrüht auf die Hinterbeine der Tiere aus. Auf histologischer Ebene konnte eine verstärkte Aggregation von Neurofilament mittlere Kette (Nfm) gezeigt werden. Ein QTL konnte auf Chromosom 14 kartiert werden (Ulbrich et al., 2003). Vergleichende Sequenzierungen ergaben einen Polymorphismus zwischen C57Bl6 und *Mus castaneus* im *Nfm* Gen, wodurch ein KSP-Motiv in ein ESP-Motiv umgewandelt wird. Ein anderer QTL betrifft die Spermatogenese der Wobbler-Mäuse. Hier konnten für ca. 15-20% der Wobbler-Männchen eine teilweise Wiederherstellung der Spermatogenese gezeigt werden. Die Anzahl der wildtypartigen Spermien weist eine große Bandbreite auf, sie reicht von wenigen Prozent bis hin zu 70% intakter Spermien, so dass in einigen Fällen von einer normalen Fertilität gesprochen

werden kann. Die wildtypartigen Spermien zeigten auf histologischer Ebene keine Unterschiede zu Wildtyp-Spermien. Zudem waren die Spermien in der Lage eine Eizelle zu befruchten, was durch In Vitro-Fertilisation gezeigt werden konnte. Der verantwortliche QTL konnte mit Hilfe statistischer Programme (Manly et al., 2001) auf Chromosome 10 kartiert werden und der kritische Bereich auf ca. 60 MB eingeeengt werden (Mußmann, 2002).

1.5 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die nähere Charakterisierung der Wobbler-Erkrankung und des Wobbler-Gens, *Vps54*. So sollte durch die Verwendung eines Mausmodells einen Beitrag zum besseren Verständnis neurodegenerativer Erkrankungen und Spermatogenesedefekten geleistet werden. Die Aufklärung der genauen Pathomechanismen kann neue Ansätze für weitere therapieorientierte Forschung entwickelt werden.

Zu Beginn meiner Arbeit war eine Punktmutation im Gen *Vps54* im wobbler-kritischen Bereich auf Chromosome 11 der Maus identifiziert worden. Im Rahmen meiner Arbeit sollte aufgeklärt werden, ob es sich dabei um die Wobbler-Mutation handelt. Zu diesem Zweck wurden von unserem Kooperationspartner *Vps54*-transgene Mäuse generiert, mit denen von mir ein Transgen-Komplementations-Experiment durchgeführt werden sollte. Zusätzlich sollte ein *Vps54* β -geo-gene-trap-Allel (*Vps54* ^{β -geo}) in diese Linie eingekreuzt werden, um die Identität der Wobbler-Mutation endgültig aufzuklären. Neben der Aufklärung der Wobbler-Mutation sollte auch das *Vps54* ^{β -geo}-Allel sowohl im homozygoten als auch im heterozygoten Zustand charakterisiert werden, um die Bedeutung des Vesikeltransportes zu analysieren. Eine weitere Aufgabe innerhalb meiner Arbeit sollte die Untersuchung weiterer, bisher nicht beschriebene Phänotypen der Wobbler-Maus sein.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mausstämme

Mus Musculus C57BL/6J-wr (B16): Labor-Inzuchtstamm, Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA, trägt die wobbler Mutation

Mus Musculus B16SJL TgN(Vps54): Hybridstamm aus den Laborstämmen *C57Bl/6-wr* und *SJL* transgen für den Bac 115F6

Mus Musculus B16129-Vps54^{β-geo}: Hybridstamm aus den Laborstämmen *C57Bl/6-wr* und der ES-Zelllinie RRI497, die aus dem Mausstamm 129/O/a gewonnen wurde

Mus Musculus CD1: Labor-Auszuchtstamm, Haraln/Winkelmann

2.1.2 Bakterienstämme

Escherichia coli XL1-Blue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac (F' proAB lacZΔM15 Tn10(Tet^R))) Sambrook et al., 1989

Escherichia coli TOP10F' (F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG), TOPO Manual, 2002, Invitrogen

Escherichia coli DH5α (F⁻ end A1 hsd R17 (r_k⁻, m_k⁻) sup E44 thi-1 □⁻ rec A1 gyr A96 rel A1 □(arg F⁻ lac ZYA) U 169 □80d lacZ□M15)

2.1.3 Verwendete Vektoren

| Bezeichnung | Verwendung | Bezugsquelle |
|---------------------|--------------|---------------------------|
| pCR4-TOPO | Klonierungen | Invitrogen, Karlsruhe |
| pBS-neo-link-Vektor | Klonierungen | Bielefeld (Drepper, 2005) |

2.1.4 Oligonukleotide

| Bezeichnung | Sequenz | Annealing Temperatur | Produktgröße (bp) |
|---------------|-------------------------------|----------------------|-------------------|
| Cct4a | TCATCGATTTTCAGAATGCTCCGC | 60 | 400 |
| Cct4b | TCAGAATAAAGATGATGCCATGGG | 60 | 400 |
| T7 | TAATACGACTCACTATAGGG | 58 | 394 |
| BAC115_T7 | AGAAAATGAAGCAAAGTGTATGTG | 58°C | 394 |
| SP6 | CCGTCGACATTTAGGTGACA | 58°C | 490 |
| BAC115_SP6 | TCATTTTCTCCCAGGCAAAC | 58°C | 490 |
| lacZ-F2 | GAATTATTTTTGATGGCGTT | 56°C | 854 |
| lacZ-R1 | ATTCATTGGCACCATGCC | 56°C | 854 |
| Trap_Neu_2a | ATGGTCTTGGTCCTTGGTG | 66°C | 974 |
| PCR_Mut_5b | GCTCTGTCCTCCAGTCTCCT | 66°C | 974 |
| Trap_S1_a | GAGGATTGCCCACTGAAAGA | 63°C | 505 |
| Trap_S2_b | CAACAAAGCAGACCCAACAG | 63°C | 505 |
| Vps54-up-a | CCGCGGTATTGCCAAGATTGGAAGG | 58°C | 3087 |
| Vps54-up-b | GCGGCCGCGGCCGTGAGCAGTAAGCTAC | 58°C | 3087 |
| Vps54-exon3-a | GCGGCCGCGGTGATTCACATACTTTATGT | 60°C | 1046 |
| Vps54-exon3-b | AGGCCTGGGTAGGGTCCCACCAAATC | 60°C | 1046 |
| Vps54-down-a | GTCGACTACCTGCCAAGGAGAAATGG | 60°C | 3091 |
| Vps54-down-b | GGTACCGGACGTGGAGACAAGGACAT | 60°C | 3091 |
| KO-Sonde-a | TGCCAGTTGCAGATTGTTTC | 60°C | 478 |
| KO-Sonde-B | TGGAAAGCTGAGGGTGATCT | 60°C | 478 |

2.1.5 Enzyme

| Enzym | Bezugsquelle |
|---------------------------------------|--|
| Taq-DNA Polymerase | Qiagen, Hilden |
| Restriktionsendonukleasen | MBI Fermentas, St. Leon-Rot, New England Biolabs, Schwalbach |
| Omniscript RT-Polymerase | Qiagen, Hilden |
| Transcriptor RT-Polymerase | Roche, Mannheim |
| Sybr Green PCR-Kit | Qiagen, Hilden |
| Proteinase K | Sigma, Deisenhofen |
| T4 DNA-Ligase | MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Invitrogen, Karlsruhe |
| Proof-Start DNA-Polymerase | Qiagen, Hilden |
| Expand Long-Template Kit | Roche, Mannheim |
| Klenow-Fragment DNA-Polymerase | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| RNase A | Roth, Karlsruhe |
| Lysozym | Roth, Karlsruhe |
| Proteinase K | Sigma, Deisenhofen |

2.1.6 Längenstandart

| Bezeichnung | Größen | Bezugsquelle |
|--|--|--|
| Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder Mix | 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 | MBI Fermentas, Vilnius, Litauen |
| Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder Mix | 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 | MBI Fermentas, Vilnius, Litauen |
| DNA-Marker Lambda Mix II | 118, 194, 234, 281/271, 310, 564, 603, 872, 1078, 1353, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416, 23130 | Molekularbiologisches & biochemisches Labor Dr. Bartling GmbH, Bielefeld |
| DNA Marker: 100 Bp –5000 Bp | 100, 150, 200, 300, 400, 500 (2x), 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000 | Molekularbiologisches & biochemisches Labor Dr. Bartling GmbH, Bielefeld |
| DNA-Marker 100Bp-Leiter „equalized“ | 100, 150, 200, 300, 400, 500 (3x), 600, 700, 800, 900, 1000 | Molekularbiologisches & biochemisches Labor Dr. Bartling GmbH, Bielefeld |

2.1.7 DNA-Extraktionspuffer zur Isolierung aus Schwanzspitzen

- 10 mM Tris
- 50 mM KCl
- 0,045% Tween 20
- 0,045% NP₄O

Der Puffer wurde sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

2.1.8 15,72 Glucose, Phosphate buffered saline (PBS)

- 34,22 mM NaCl
- 7,86 mM Na₂HPO₄·2 H₂O
- 0,17 mM KH₂ PO₄, pH 7,8
- 15,72 mM alpha-D-Glucose

Die Komponenten wurden in Aquadest gelöst und sterilfiltriert.

2.1.9 Bakterienkulturmedien

2.1.9.1 Luria-Bertani (LB)

- 10 g/l Bactotrypton
- 5 g/l Hefeextrakt
- 10 g/l NaCl

2.1.9.2 SOC

- 20 g/l Bactotrypton
- 5 g/l Hefeextrakt
- 0,5 g/l NaCl
- 10 ml/l 250 mM KCl

nach dem Autoklavieren zusetzen:

5 ml/l 2 M MgCl₂ (steril), 20 ml/l 1 M Glucose (steril)

2.1.10 Antibiotika

| Antibiotikum | Konzentration der Stammlösung | Arbeitskonzentration |
|--------------|-------------------------------|----------------------|
| Ampicillin | 150mg/ml in Wasser | 25-150µg/ml |
| Tetracyclin | 50mg/ml in Ethanol | 10-15µg/ml |
| Kanamycin | 20mg/ml in Wasser | 20µg/ml |

2.1.11 Verwendete Kits

| Kit | Bezugsquelle |
|---|----------------------------|
| QIAGEN Plasmid Purification Kits (div. Größen) | Qiagen, Hilden (D) |
| Nucleobond Plasmid Purification Kits | Macherey-Nagel, Düren (D) |
| Nucleo-Spin Extract Kits | Macherey-Nagel, Düren (D) |
| QIAquick Gel Extraction Kits | Qiagen, Hilden (D) |
| TOPO-TA Cloning Kit | Invitrogen, Karlsruhe (D) |
| Expand Long-Template Kit | Roche, Mannheim (D) |
| Taq-PCR Mastermix | Qiagen, Hilden (D) |
| Prime-It RmT Random Primer Labeling Kit | Stratagene, Heidelberg (D) |
| NucleoSpin[®] RNA II | Macherey-Nagel, Düren (D) |

2.1.12 Färbelösungen

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|--------------------------|--------------|
| Hämatoxylin-Eosin | Sigma |
| Hoechst | Sigma |
| Kresylviolett | Merk |

2.1.13 Verwendete Erstantikörper

| Antigen | Herkunft | Verdünnung (in 1% BSA) | Fixierung | Bezugsquelle |
|---|---|---------------------------|------------------------|--|
| GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) Astrozytenmarker) | Maus (monoclonal, Cy3 gekoppelt) | 1:800 | Methanol | Sigma |
| CD45 (Leukozyte Common Antigen, Ly-5, Mikroglia marker) | Ratte (monoclonal) | 1:150 | Methanol | BD Pharmingen |
| MF20 (Mysin leichte Kette, Embryonalentwicklung) | Maus (monoklonal) | 1:100 | Methanol | AG Lehmann, Bielefeld (Bader et al., 1982) |
| NFM (Neurofilament 160, mittlere Kette) | Maus (monoklonal) | 1:200 | Methanol | Sigma |
| Caspase III (Apoptosemarker) | Kaninchen (monoklonal) | 1:200 | Keine Fixierung | New England Biolabs |
| Vimentin | Maus | 1:200 | Methanol | Sigma |

2.1.14 Verwendete Zweitantikörper

| Antigen | Fluorochrom | Verdünnung (in 1% BSA) | Bezugsquelle |
|------------------|-----------------|---------------------------|----------------|
| Maus | Cy3 | 1:250 | Dianova |
| Kaninchen | Alex 488 | 1:250 | MoBiTec |
| Ratte | Cy3 | 1:150 | Dianova |

2.1.15 Verwendete Datenbanken

| Bezeichnung | Adresse |
|---------------------------------|---|
| BLAST | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ |
| Mouse Genome Informatics | http://www.informatics.jax.org/ |
| Ensembl Genome Browser | http://www.ensembl.org/ |
| PubMed | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed |
| OMIM | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM |
| NCBI Geo | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=GEO |
| RepeatMasker | http://woody.embl-heidelberg.de/repeatmask/ |
| VISTA | http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml |
| Webcutter | http://www.ccsi.com/firstmarket/firstmarket/cutter/cut2.html |
| Primer3 | http://cbr-rbc.nrc-cnrc.gc.ca/cgi-bin/primer3_www.cgi |

2.2 Methoden

2.2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren (Saiki et al., 1985).

Die PCR nutzt die Eigenschaft von DNA-Polymerasen, einen einzelnen DNA-Strang als Matrize für die Synthese des entsprechenden komplementären Stranges zu benutzen und so die DNA zu replizieren. Als Startpunkt benötigt die Polymerase ein kurzes Stück doppelsträngige DNA, das man künstlich durch ein Oligonukleotid mit einer Länge von ca. 20 bp schaffen kann.

Benutzt man nun zwei solcher Oligonukleotide, auch Primer genannt, die je auf dem „sense“ und dem „antisense“ Strang liegen, wird nur das Stück zwischen den beiden Primern verlängert.

Auf diese Weise kann man DNA-Stücke spezifischer Länge selektiv vermehren. Bei jeder Wiederholung des Syntheseverfahrens wird eine neue Kopie erstellt und die Vermehrung erfolgt exponentiell. Theoretisch reicht ein einziger DNA-Strang, um die PCR-Reaktion durchzuführen.

Die Verwendung thermostabiler Polymerasen macht es möglich die PCR-Reaktion zyklisch, ohne Unterbrechung, ablaufen zu lassen. So kann man die doppelsträngige DNA bei 94°C denaturieren, die Primer lagern sich (Annealing) bei ihrer spezifischen Annealingtemperatur an und die Polymerase führt die Elongation bei 72°C durch. Nach dem Durchlaufen dieses Zyklusses startet ein neuer wieder bei der Denaturierung.

2.2.1.1 Standart PCR-Reaktion

Für die Standard-PCR-Reaktion wurde das Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen, Hilden) verwendet.

| µl | Komponenten |
|-----|-----------------------|
| 10 | Master Mix |
| 0,4 | Primer a (50 pmol/µl) |
| 0,4 | Primer b (50 pmol/µl) |
| 8,2 | H ₂ O |
| 1 | Template DNA |

Alle Komponenten wurden zusammen pipetiert und der Ansatz in einem Thermocycler (Whatman, Biometra; Progene, Techne, Cambridge) gestellt. Folgendes Programm wurde durchlaufen:

| Temperatur | Zeit (Min) | Anzahl der Zyklen |
|-------------------------|------------|-------------------|
| 94 | 3 | 1 |
| 94 | 1 | 35 |
| Primerspezifisch | 1 | 35 |
| 72 | 1 | 35 |
| 72 | 10 | 1 |
| 10 | ∞ | 1 |

2.2.1.2 Standart PCR mit Q-Solution

Q-Solution erhöht die Spezifität der Primer indem es das Schmelzverhalten der DNA verändert und so verhindert, das Nebenbanden auftreten. In einigen Fällen wurde folgender Ansatz mit Q-Solution verwendet:

| μl | Komponenten |
|---------------|--|
| 10 | Master Mix |
| 0,4 | Primer a (50 pmol/ μl) |
| 0,4 | Primer b (50 pmol/ μl) |
| 5 | Q-Solution |
| 3,2 | H₂O |
| 1 | Template DNA (100 ng/ μl) |

Es wurde das Programm der Standard-PCR bei diesem Ansatz verwendet.

2.2.1.3 Gradienten-PCR

Um unterschiedliche Annealing Temperaturen für ein Primerpaar zu testen, besitzt der Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf eine Zusatzfunktion, mit der es möglich ist, PCRs verschiedener Temperaturen mit einer Spanne von bis zu 20°C gleichzeitig durchzuführen. Auf diese Weise lässt sich leicht die optimale Temperatur

für eine möglichst hohe Spezifität eines Primerpaares feststellen. Hierzu wurden 8 oder 12 identische Ansätze pipettiert und der gewünschte Gradient eingestellt. Nach der PCR konnte im Agarosegel die beste Annealing-Temperatur abgeschätzt werden.

2.2.1.4 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine Methode, mit der eine schnelle Analyse rekombinanter Bakterien möglich ist. Hierbei wurde ein Ansatz wie bei einer Standard PCR zusammengestellt (siehe oben), nur wurde auf die Zugabe von Template-DNA verzichtet. Das fehlende Volumen wurde durch Wasser ersetzt. Mit einer Pipettenspitze wurde dann die zu untersuchende Bakterienkolonie vorsichtig auf der Platte angepickt, auf einer zweiten Platte kurz ausgestrichen und in den PCR-Ansatz unter leichten Drehungen abgestreift. Hierbei war darauf zu achten, dass kein Medium von der Platte mitgenommen wird. Die Parameter der PCR wurden, bis auf eine längere initiale Denaturierung (10 Minuten), gegenüber einer Standardreaktion nicht geändert.

2.2.1.5 Proofreading Polymerasen

Um ein Produkt zu erhalten, das keine oder nur wenige Punktmutationen enthält, kann man eine Polymerase mit einer Proofreading Aktivität (3'-5' Exonuklease Aktivität) verwenden. Die bei einer Standard-PCR verwendete *Taq*-Polymerase besitzt keine Korrekturaktivität und ist daher für bestimmte Anwendungen, bei denen es auf eine korrekte Sequenz ankommt (z.B. Klonierungen von Genen, Promotoren oder Sequenzierungen), ungeeignet. Verwendet wurden: Proof-Start-Polymerase (QIAGEN), *Pwo*-Polymerase (Roche), ThermoZyme Polymerase (Mix aus *Taq* und einer nicht näher bezeichneten Proofreading Polymerase, Invitrogen) oder, um besonders lange Fragmente zu erzeugen, Expand Long-Template Polymerase (Mix aus *Taq* und *Tgo*, Roche). Die Polymerasen wurden nach den Anleitungen der Hersteller verwendet.

2.2.2 Gelelektrophorese

Die Elektrophorese ist eine schnelle und einfach durchzuführende Analysemethode, die es ermöglicht DNA-Fragmente nachzuweisen und der Größen nach aufzutrennen. Generell verbirgt sich hinter dem Begriff Elektrophorese die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Die Laufgeschwindigkeit kann man näherungsweise als umgekehrt proportional zur Größe des Fragments und proportional zur angelegten Spannung annehmen.

Im Gegensatz zu Proteinen liegt die DNA fast im gesamten pH-Bereich negativ geladen vor, die Laufrichtung im Gel erfolgt somit vom negativen zum positiven Pol innerhalb der Gelmatrix.

Agarose, ein Polymer mit verschiedenen Galaktoseeinheiten, ist eines der meist verwendeten Matrixmaterialien.

Je nach Fragmentgröße werden die Konzentrationen der Agarose gewählt, so liegt die Agarosekonzentration für eine optimale Auftrennung von 100 – 500 bp großer DNA-Fragmenten bei ca. 2%.

Wenn die Differenz zwischen den Fragmentlängen der einzelnen PCR-Produkte unter 15 bp lag, wurde ein 4% Nusieve-Agarosegel anstatt eines 2% Agarosegels verwendet. Im Gegensatz zu den 2%igen Agarosegelen wurde in die flüssige, ca. 60°C warme, Nusieveagarose Ethidiumbromid (1 µl/100ml Agarose) gegeben, da ein derartig hochprozentiges Gel sehr schlecht in einem Färbebad abgefärbt werden kann.

Als Laufpuffer wurde standardmäßig 1 x TBE (0,089 M Tris/HCl pH 8,0; 0,089 M Borsäure; 20 mM EDTA) benutzt, zu den Proben wurde 1/6 Probenpuffer (0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 30% Glyzerin) gegeben und ein entsprechender Längenstandard mitgeführt.

Die angelegte Spannung betrug 10V/cm.

Die 2%-Agarosegele wurden nach dem Lauf in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml in 1 x TBE) gefärbt und mit Hilfe von UV-Durchlicht (302 nm) fotografiert.

2.2.3 Bakterien-Methoden

2.2.3.1 Anzucht von Bakterien

Für die Anzucht von Bakterien wurde in der Regel Luria-Bertani Medium (LB-Medium) verwendet. Sollte eine größere Plasmidausbeute erreicht werden, ist Terrific-Broth (TB-Medium) verwendet worden. In Flüssigkultur wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Um eine Reinkultur zu gewährleisten, wurden bei Bedarf die Kolonien auf Platte zur Vereinzelung ausgestrichen. Für Platten wurden dem Medium 15g/l Agar zugesetzt. Medien wurden generell autoklaviert, um eine Verunreinigung mit anderen Mikroorganismen zu vermeiden. Für die Blau-Weiß Selektion wurden dem Agar-Medium X-gal und IPTG zugesetzt. Rekombinante Klone wurden auf Platten bis zu vier Wochen gehalten. Für längere Lagerungen wurden Agar-stabs verwendet. Hierzu wurde ein 1,5ml Plastikgefäß mit Schraubverschluss zu zwei Dritteln mit sterilem *stab*-Agar (LB-Medium mit 0,6% (w/v) Agar, optional kann 10mg Cystein pro Liter zugegeben werden) gefüllt. Die gewünschte Kolonie wurde mit einem Zahnstocher gepickt und durch stoßen in den Agar angeimpft. Der *stab* wurde für 8h bei 37°C inkubiert und trocken bei Raumtemperatur fest verschlossen gelagert. Für längerfristige Lagerung (bis zu mehreren Jahren) wurden Glycerinkulturen (Kultur in 20% Glycerin) angelegt. Hierzu wurden 200µl 100% Glycerin in einem Eppendorfgefäß vorgelegt und 800µl frische Bakterienkultur dazugegeben. Nach Vortexen wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70°C aufbewahrt.

2.2.3.2 Kryokulturen

Für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden One Shot™ Zellen (Top10F') der Firma Invitrogen, JM109 der Firma Promega, JQ101 oder DH5α verwendet. Hierzu wurden die Zellen auf Eis angetaut, und 2µl Ligationsansatz oder Plasmidlösung (5ng/µl oder mehr) zugegeben und mit der Pipettenspitze umgerührt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wird das Gefäß mit den Zellen 30-50 Sekunden lang in ein 42°C Wasserbad überführt und danach sofort für 2 Minuten auf Eis gestellt. 250-800µl SOC-Medium wurden zugefügt. Die Zellen erholten sich anschließend bei 37°C für eine Stunde im Schüttler. Von diesem Ansatz wurden 50 und 200µl auf Selektionsplatten (Ampicillin) ausplattiert.

Für die Transformation elektrokompetenter *E. coli* Zellen wurde der Gene Pulser™ der Firma BIO-RAD verwendet. Hierzu wurden am Gerät eine Spannung von 2,5kV, ein Widerstand von 400Ω und eine Kapazität von 25μF eingestellt. Die elektrokompetenten XL1-Blue Zellen wurden auf Eis angetaut. 2-5μl des zu transformierenden Ligationsansatzes wurde zu den Zellen pipettiert und für eine Minute auf Eis inkubiert. Eine vorgekühlte Elektroküvette wurde mit dem Ansatz beladen und in den Schlitten gestellt. Dabei war darauf zu achten, dass die Küvette von außen keine Restfeuchtigkeit aufweist. Nach dem Einschieben des Kontaktgebers wurden die beiden Knöpfe am Gene Pulser™ solange gleichzeitig gedrückt bis ein Signalton ertönt. Sofort danach wurde 0,8ml SOC-Medium zu den Zellen pipettiert und der Ansatz in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach 90minütiger Erholung der Zellen in dem 37°C Schüttler wurden die Zellen auf Selektionsplatten ausplattiert.

2.2.3.3 Easy-Präp

Eine sehr einfache und schnelle Methode, um Plasmid-DNA zu gewinnen, ist die von Berghammer und Auer (1993) beschriebene Methode "Easy-Präp". Diese Methode eignet sich gut, um eine größere Anzahl von Bakterienklonen auf eine erfolgreiche Transformation zu testen. Ein Nachteil ist die geringe Reinheit, da hier auf den Phenolisierungsschritt verzichtet wird. Die Reinheit ist aber für schnelle Tests durchaus ausreichend. Durchführbar ist die Easy-Präp allerdings nur für *endA*⁻-Stämme, da die Endonuklease A nicht durch Hitze inaktivierbar ist und die DNA abbauen würde.

Hierzu füllt man 1ml Medium (LB- bzw. TB-Medium) in ein Eppendorfgefäß, sticht mehrere Löcher in den Deckel, und inkubiert die Kultur über Nacht bei 37°C im Schüttler. Nach 30-60 Sekunden in der Eppifuge (13000rpm, RT) wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 50μl Lysispuffer (10mM Tris pH8.0, 1mM EDTA, 15% Sucrose, 0,4mg/ml RNase A, 2mg/ml Lysozym, 0,1mg/ml BSA) gelöst. Nach 5 Minuten im Schüttler bei Raumtemperatur wurde das Eppendorfgefäß in ein 100°C Wasserbad für 30 Sekunden gegeben, was zur Lyse der Bakterien führte. Anschließend wurde für 60 Sekunden auf Eis inkubiert. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei Raumtemperatur in der Eppifuge, wurden bis zu 5μl des

Überstandes für eine Testspaltung und anschließender Agarosegel-Elektrophorese eingesetzt.

2.2.3.4 Alkalische Lyse

Mit Hilfe dieser Methode lassen sich high-copy wie auch low-copy Plasmide, die nur in einer geringeren Anzahl in der Zelle vorliegen, in einer höheren Konzentration isolieren.

Eine 1ml Übernachtskultur wurde in einem Eppendorfgefäß (mit Löchern versehen) angeimpft. Das Medium wurde abgesaugt und das Pellet in 300µl eiskalter Lösung 1 gelöst (50mM Glucose, 25mM Tris-Cl (pH8.0), 10mM EDTA (pH8), 100µg/ml RNase A). Die Zugabe von 300µl Lösung 2 (0,2N NaOH, 1% SDS, frisch ansetzen) bewirkt durch die Erhöhung des pH-Wertes ein denaturieren der chromosomalen DNA. Das SDS ermöglicht das Ablösen DNA-assoziierter Proteine. Das Eppendorfgefäß wurde 5-9mal invertiert, und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Mit 300µl Lösung 3 (3M Kaliumacetat mit Eisessig pH4.8 einstellen) wurden chromosomale DNA und Proteine gefällt. Das Eppendorfgefäß wurde solange invertiert, bis sich eine homogene Suspension gebildet hat und für 5 Minuten auf Eis inkubiert.

Nach 5minütiger Zentrifugation (13000rpm in der Eppifuge 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mit einem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch wurden letzte in Lösung befindliche Proteine extrahiert. Dazu wurden 600µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und vorsichtig invertiert. Nach kurzem Zentrifugieren (für 2 Minuten) wurde von den sich bildenden Phasen die obere (wässrige) Phase vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden zu dieser Lösung 700µl Isopropanol gegeben und vorsichtig invertiert. Nach 2minütiger Inkubation wurde anschließend 6 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes, wurde das Pellet mit 300µl eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Nachdem der Alkohol komplett abgesaugt wurde, wurde das Pellet in 30-50µl TE pH8.0 oder H₂O_{bidest} aufgenommen. Bis zu 3µl wurden für Testspaltungen eingesetzt.

2.2.3.5 Säulen-Aufreinigung

Für die Präparation von hochreiner Plasmid-DNA oder von Plasmiden mit geringer Kopienzahl empfiehlt sich die Verwendung eines Kits. Diese basieren ebenfalls auf der alkalischen Lyse, nur wird hier keine Aufreinigung der DNA mit Phenol/Chloroform vorgenommen. Durch die Herstellung optimaler Salzkonzentrationen und pH-Werte wird die Plasmid-DNA in einer equilibrierten Ionenaustauscher-Säule gebunden, gereinigt und anschließend von ihr eluiert. Auf diese Weise können degradierte RNA, zelluläre und nukleinsäureassoziierte Proteine von der Plasmid-DNA entfernt werden. Die Fällung erfolgt mit Isopropanol.

Nachfolgend ist ein Protokoll zur Verwendung der Nucleobond AX Säulen exemplarisch angegeben. Protokolle anderer Anbieter (z.B. Qiagen) unterscheiden sich nur geringfügig. Bei Verwendung anderer Säulen (AX100 oder AX500) ändern sich die eingesetzten Lösungsmengen.

Die Zellen wurden geerntet, indem sie bei 4°C für 5-10 Minuten zentrifugiert wurden (Rotor GSA 6000rpm). Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet in 12ml S1 Puffer resuspendiert. Wenn alles gelöst war, wurde 12ml S2 Puffer zugeben, achtmal invertiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 12ml Puffer S3 zugeben, 8mal invertiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer mindestens 40minütigen Zentrifugation bei 12000g, wurde der Überstand über einen angefeuchteten Faltenfilter in ein 50ml Röhrchen (Greiner „Bluecap“) filtriert. Eine Nucleobond AX 500 Säule wurde mit 6ml N2 Lösung equilibriert. Der filtrierte Überstand wurde zweimal über die Säule gegeben und anschließend dreimal mit 12ml N3 Lösung gewaschen. Die so gereinigte Säule wurde mit 7ml Elutionspuffer N5 (vorgewärmt auf 50°C) in ein Greiner Röhrchen eluiert. Pro Röhrchen wurde 0,7-faches Volumen (5ml) an Isopropanol zugegeben und mit Parafilm abgedeckt, invertiert und für 30 Minuten zentrifugiert (SS34 Rotor 12000rpm). Die entstehenden Pellets wurden mit einem Filzstift markiert, der Überstand verworfen und ca. 3ml 70% Ethanol (-20°C) vorsichtig auf den gegenüberliegenden Rand pipettiert. Nach 15minütiger Zentrifugation im SS34 Rotor bei 12000rpm wurde der Überstand verworfen. Verbleibende Tropfen wurden mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Röhrchen für ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um restliches Ethanol abzdampfen. Das Pellet wurde sorgfältig in 50-200µl Wasser (pH 8.0 mit NaOH eingestellt) resuspendiert, in Eppendorfgefäße überführt und bei 37°C in den Schüttler für mindestens 5 Minuten gestellt, um restliche Plasmide zu lösen.

2.2.3.6 Ligation

Führt man Ligationen mit einem Vektor durch, der nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten ist, kann man die Rate der Religierungen des linearen Vektors ohne Insert durch den Einsatz von alkalischer Shrimp Phosphatase verringern. Dazu werden in den Restriktionsansatz des Vektors zusätzlich 1µl Shrimp Phosphatase gegeben und diese nach 37°C Inkubation durch kurzes Erhitzen (15 Minuten bei 65°C) inaktiviert. Die Wirkung ist eine Dephosphorylierung der 5'-DNA-Enden. Beim Einsatz mit zwei Restriktionsenzymen kann auf den Dephosphorylierungsschritt verzichtet werden. Die T4-Ligase (Gibco BRL oder MBI Fermentas) wird mit einem 5-fachen Reaktionspuffer geliefert. Das Gesamtvolumen des Ansatzes beträgt 20µl, das Mengenverhältnis zwischen Vektor und Insert beträgt 1:5. Setzt man standardmäßig 25ng Vektor ein, so kann man nach folgender Formel die Fragmentmenge für die Ligation berechnen (Mühlhardt, 2000):

$$\text{Masse}_{\text{Fragment}} [\text{ng}] = 125 [\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Fragment}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]$$

Für eine Ligation mit kohäsiven Enden wurden 0,5 bis 1 Weiss-Unit (entspricht 0,5-1µl) an T4 Ligase eingesetzt. Die Ligationstemperatur beträgt 16°C und erfolgte über Nacht. Der Ligationsansatz enthält 4µl 5-fach Puffer, der Rest des Volumens wurde mit autoklaviertem Aqua_{bidest} aufgefüllt.

Will man in einen Vektor eine kurze DNA-Sequenz integrieren, um z.B. Restriktionsschnittstellen einzufügen, kann ein Adapter hergestellt werden, indem zwei Oligonukleotide konstruiert werden, die diese Schnittstellen beinhalten und zu sich selbst komplementär sind. Diese werden dann zusammen hybridisiert und anschließend durch eine Ligation in den gewünschten Vektor integriert. Zunächst mussten die Oligonukleotide durch eine Kinase phosphoryliert werden, um eine spätere Ligation durchführen zu können. Der Reaktionsansatz stellte sich für jedes Oligonukleotid wie folgt dar: 2µl des Oligonukleotides (1pmol/µl), 2µl 5x Forward Reaction Buffer (Gibco BRL), 1µl ATP (10mM), 1µl T4 Polynukleotidkinase (10 U/µl; Gibco BRL) und 4µl H₂O_{bidest}. Die Reaktion wurde für 30 Minuten bei 37°C durchgeführt, anschließend wurden beide phosphorylierten Oligonukleotide vermischt. Danach wurde die Suspension in einem Wasserbad oder Thermoschüttler auf 95°C erhitzt und die Kinase durch eine 15minütige Inkubation bei dieser Temperatur deaktiviert. Anschließend wurde der Ansatz langsam auf RT abgekühlt,

wodurch die beiden komplementären Nukleinsäuren spezifisch hybridisierten und ein doppelsträngiger Adapter entstand. Danach konnte der Adapter mit einem entsprechend geöffneten und dephosphorylierten Vektor ligiert werden (70ng Vektor und 1,5µl der Oligohybridisierungsreaktion).

2.2.4 DNA-Methoden

2.2.4.1 DNA-Isolierung aus Gewebe

Nach der Präparation des Gewebes (maximal 400mg pro Ansatz) aus der Maus wurde die Gewebeprobe schnell in flüssigem N₂ schockgefroren, um eine Degradierung der DNA durch nukleolytischen Abbau der Enzyme zu verhindern. Anschließend wurde das Gewebe in einer vorgekühlten Reibschale in flüssigem N₂ zu feinem Pulver gemahlen, in 12ml Greinerröhrchen überführt und in 4ml DNA-Gewebe-Extraktionspuffer (100mM NaCl, 25mM EDTA, 0,5% SDS, 10mM Tris-Cl pH 8,0, 0,1mg/ml Proteinase K (kurz vor Gebrauch zusetzen)) resuspendiert und über Nacht bei 55°C geschüttelt. Dem Ansatz wurden 3ml Phenol zugegeben, um dann 2 Stunden bei 4°C zu schütteln und anschließend 10 Minuten zu zentrifugieren (Hettich Rotanta/S Tuttlingen 75%). Hiernach wurde ausschließlich die obere wässrige Phase entnommen und mit 4ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt und 1,5 Stunden bei 4°C invertiert. Der Ansatz wurde erneut für 10 Minuten zentrifugiert (Hettich Rotanta/S Tuttlingen 75%), die obere wässrige Phase wurde in ein neues Greinerröhrchen überführt und mit 4ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) 30 Minuten bei 4°C invertiert. Es erfolgte ein weiterer 10minütiger Zentrifugationsschritt (Hettich Rotanta/S Tuttlingen 75%), und die obere wässrige Phase wurde mit 2ml Ammoniumacetat (7,5M) und 10ml 100% Ethanol (bei -20°C vorgekühlt) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und über Nacht bei 4°C gefällt. Nach dem Pelletieren wurde noch mit 2ml 70% Ethanol (bei -20°C vorgekühlt) gewaschen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation und das Pellet wurde unter dem Abzug getrocknet. Hiernach wurde die DNA in 2ml TE-Puffer resuspendiert, und die Konzentration wurde durch UV-Absorptionsspektrometrie bestimmt.

2.2.4.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Wird zum Beispiel nach einer Restriktionsspaltung nur ein bestimmtes Fragment für weitere Arbeiten benötigt, so ist es möglich, die verdauten DNA über ein Agarosegel aufzutrennen. Nach dem Färben mit Ethidiumbromid werden auf einem Transilluminator die Größen der einzelnen Banden bestimmt und das gewünschte Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten. Für die DNA-Extraktion aus Agarose wurde das QIAquick Gel Extraction Kit der Firma QIAGEN oder das Nucleospin Extract Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Beispielhaft ist das Protokoll der Firma QIAGEN angegeben. Hierbei wurde das isolierte Agaroseblöckchen gewogen und in dem 3fachen Volumen QG Puffer bei 50°C ca. 10 Minuten gelöst. Der Ansatz wurde anschließend auf eine mitgelieferte Minisäule gegeben und durch Zentrifugation für 1 Minute in einer Tischzentrifuge an das Säulenmaterial gebunden. Nach dem Waschen mit 750µl PE-Puffer wurde die Säule durch wiederholtes Zentrifugieren getrocknet und die DNA mit 30µl Elutionspuffer (10mM Tris-Cl pH 8.0) eluiert. Die Konzentration wurde anschließend in einem Agarosegel abgeschätzt, oder photometrisch bestimmt.

2.2.4.3 Restriktionsenzymsspaltungen

Je nach Menge der zu spaltenden DNA wurde das Gesamtvolumen des Restriktionsansatzes bestimmt. Für Testspaltungen wurde das Gesamtvolumen des Ansatzes mit 20µl angesetzt. Hierbei wurden 0,5µg DNA, ca. 0,5µl Restriktionsenzyme (Menge ist Abhängig von der Konzentration, bzw. der spezifischen Aktivität der Enzyme) und 2µl 10-fach Puffer in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit Wasser auf 20µl aufgefüllt. Bei Restriktionsspaltungen größerer DNA Mengen, z.B. für nachfolgende Ligationen, wurde ein Volumen von 50-100µl eingesetzt. 5-10µg DNA, 2µl Restriktionsenzym, 5µl (10)µl 10-fach Puffer und mit Wasser bis auf 50µl (100µl) auffüllen.

Optional wurde BSA (Rinderserumalbumin) in einer Endkonzentration von 0,1µg/µl dem Spaltungsansatz zugegeben. BSA kann bei schwierigen Restriktionsspaltungen die Spaltungsrate durch eine Stabilisierung der Restriktionsenzyme erhöhen. Weiterhin ist noch darauf zu achten, dass das Volumen der Restriktionsenzyme nicht höher als 10% des Gesamtvolumens liegt, da diese in einem glycerinhaltigen Puffer vorgelegt werden und viele Enzyme bei zu hohen Glycerinkonzentrationen

Staraktivität zeigen. Die Ansätze werden bei 37°C (oder einer anderen für das jeweilige Enzym spezifischen Temperatur) 3 Stunden bis über Nacht inkubiert (je nach Verwendung).

2.2.4.4 Fällung von DNA

Um den bei der Ligation eingesetzten Puffer aus dem Ansatz zu entfernen oder DNA anzukonzentrieren, bietet sich eine Fällung an. Zu mindestens 100µl Ligationsansatz (bei Bedarf mit Wasser auffüllen) wurde 1/10 Volumen (10µl) 3M Natriumacetat pH5.2, und 2,5 Volumen (250µl) 100% Ethanol -20°C gegeben. Die Lösung wurde mehrmals invertiert und bei -80°C für 10-20 Minuten inkubiert. Nach 30 Minuten zentrifugieren bei 13000rpm und Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 0,5ml eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und für 10-15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Aqua_{bidest} (autoklaviert) resuspendiert (5µl). Falls die Menge der DNA gering ist (< 250ng/µl), so kann noch ein *carrier*, wie etwa t-RNA oder Glykogen, zugegeben werden, um die Fällung zu unterstützen und eine bessere Ausbeute zu erhalten.

2.2.4.5 Southern Blotts

Für den Transfer wurden verschiedene Membranen, z.B. von Pall, Millipore oder Schleicher und Schuell, mit Porengrößen von 0,45µm verwendet. Hierzu wurden die DNA-Fragmente im Gel durch Inkubation mit 0,25N HCl für 20 Minuten partiell depurinert. Die so generierten Strangbrüche sollten den Transfer auf die Membran erleichtern. Anschließend wurde das Gel mit Wasser gespült, um die restliche Säure zu entfernen. Die Denaturierung wurde mit 0,5N NaOH und 1,5M NaCl für 30 Minuten durchgeführt.

Für den Blot-Aufbau wurde eine Schale zur Hälfte mit 20x SSC gefüllt und eine Glasplatte quer darüber gelegt. Eine Flüssigkeitsbrücke wurde erzeugt, indem man 3MM-Whatman Papier über die Glasplatte gelegt und die überstehenden Enden in die SSC Lösung eintauchen ließ. Das Gel wurde umgekehrt auf die Flüssigkeitsbrücke positioniert. Ein zurechtgeschnittenes passendes Stück Membran und drei weitere Lagen Whatman Papier wurden luftblasenfrei darüber gelegt. Anschließend wurde ein Stapel saugfähiges Papier (mindestens 10cm) aufgelegt.

Eine kleine Glasplatte und ein mindestens 300g schweres Gewicht komplettierten den Aufbau. Zusätzlich wurde zwischen dem unteren Whatman Papier und den saugfähigen oberen Papieren an überstehenden Enden Parafilm gelegt. Der Transfer erfolgte über Nacht. Die Membran wurde für 60 Minuten im 80°C Schrank getrocknet und die DNA somit fixiert. Zusätzlich wurde eine UV-Fixierung (0,8J/cm²) durchgeführt. Die Membran wurde anschließend trocken bis zur Verwendung gelagert.

2.2.4.6 Generierung von Sonden

Die verwendeten zu markierenden DNA-Sonden wurden entweder durch eine PCR-Reaktion oder durch Restriktionsspaltungen und Gelaufreinigung von klonierten Fragmenten hergestellt und anschließend mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und mit dem *Prime-It[®] RmT Random Primer Labeling Kit* (Stratagene) oder mit Klenow-Polymerase (MBI Fermentas) markiert. Beide Labeling-Reaktionen sind sehr ähnlich. Beim Stratagene Kit wurden die mitgelieferten Reaktionsgefäße kurz anzentrifugiert, um den Inhalt am Boden des Gefäßes zu konzentrieren (Microspheres mit random Primer (Nonamere), Nukleotide, Puffer und Kofaktoren). Ungefähr 50ng Aufgereinigtes PCR Produkt wurden zugegeben und das Volumen mit Aqua_{dest} auf 42µl aufgefüllt. Um die DNA zu denaturieren, wurde für 5 Minuten im kochenden Wasser erhitzt und das Reaktionsgefäß kurz anzentrifugiert. Bei Raumtemperatur wurden 5µl des Radionukleotids ([α-³²P]dCTP mit 3000Ci/mmol) zugegeben. Mit der Pipette wurde die Probe gut durchmischt. Anschließend wurden 3µl der Magenta DNA Polymerase (4U/µl) in den Ansatz gegeben und wieder mit der Pipette durchmischt. Nach Inkubation in einem Wasserbad bei 37°C für 10 Minuten und Zugabe von 2µl Stop-Solution ist die Labeling-Reaktion abgeschlossen. Bei der Markierung mit Klenow-Polymerase wurden zunächst 25ng der Sonde mit H₂O_{bidest} auf ein Gesamtvolumen von 9µl aufgefüllt, 10 Minuten gekocht und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden dann 2µl Hexanukleotide in 10x Reaktionspuffer (Roche), 1µl Klenow-Enzym (MBI Fermentas), 5µl [α-³²P]dCTP (3000Ci/mmol) und 3µl einer ATG-Lösung (je Nukleotid 0,5mM; MBI Fermentas) zugegeben. Nachdem der Ansatz gut gemischt und kurz anzentrifugiert worden war, erfolgte die Labeling-Reaktion für 30-40 Minuten bei 37°C.

Um die nicht eingebauten Nukleotide aus dem Ansatz zu entfernen wurden die ProbeQuant™ G-50 Micro Columns (Amersham) verwendet. Diese wurden kurz gevortext und für eine Minute bei 735g (2500rpm) zentrifugiert um die Equilibrierungslösung aus der Säule zu entfernen. Die Säule wurde in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß gestellt und die Labeling Reaktion tropfenweise auf die Säule gegeben. Eine Zentrifugation für 2 Minuten bei 735g konzentrierte die markierte Sonde am Boden des Eppendorfgefäßes, die nicht eingebauten Nukleotide wurden in der Säule zurückgehalten. Um Einzelstränge zu erhalten wurde die so Aufgereinigte Sonde für 5 Minuten aufgekocht, kurz anzentrifugiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert.

2.2.4.7 Hybridisierung und Nachweis

Die zu hybridisierenden Blots wurden in eine Hybridisierungsröhre passender Größe überführt. Vorgewärmter (60°C) Hybridisierungspuffer Perfecthyb™ Plus (Sigma) wurde in die Röhre gegeben (0,125ml/cm²). Um unspezifische Bindungen abzusättigen, wurde denaturierte Heringssperma-DNA, in einer Endkonzentration von 100µg/ml zugegeben. Nach einer Inkubation von mindestens 30 Minuten bei 68°C wurde die frisch gelabelte Sonde in die Prähybridisierungslösung gegeben. Hierbei war darauf zu achten, dass man nicht die Membran berührt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C. Um eine hohe Stringenz zu erreichen, wurde die Membran einmal für 20 Minuten in *Low Stringency*-Puffer (2x SSC, 0,1% SDS) und einmal in *Ultra-high Stringency*-Puffer (0,1x SSC, 0,1% SDS) gewaschen. Die gewaschenen Blots wurden nun in Haushaltsfolie verpackt und mit einem Röntgenfilm in einer Expositionskassette bei -70°C über Nacht inkubiert. Der Röntgenfilm wurde anschließend in der Dunkelkammer wie folgt entwickelt: Inkubation für 5 Minuten in Röntgenentwickler (1:5 Verdünnung), 1 Minute im Stoppbad (H₂O mit wenigen Tropfen Essigsäure) und anschließender fünfminütiger Fixierung (1:5 Verdünnung der Fixierungslösung). Nachdem der Film gewässert wurde, ist er an der Luft getrocknet worden.

2.2.5 Konzentrationsmessungen von Nukleinsäuren

Da die DNA meist nur in sehr kleinen Mengen und Volumina zur Verfügung steht, wurde die Konzentration in einer Verdünnungen festgestellt. 2µl DNA wurden mit

58µl 10mmol Tris pH 8.0 versetzt und die Absorption bei 260nm gemessen. Eine A_{260} von 1,0 entspricht dabei 50µg/ml dsDNA bzw. 40µg/ml ssDNA. Die Messung der A_{280} und das Errechnen des Quotienten von A_{260} und A_{280} gibt Auskunft über die Reinheit der DNA. Wird dabei ein Verhältnis von 1,8-2,0 erreicht, so nimmt man eine reine Präparation an.

Eine weitere Methode der Konzentrationsbestimmung ist das Abschätzen der Fluoreszenz von gebundenen Ethidiumbromid. Dazu wird die DNA-Probe gegen einen Fragmentlängenstandard bekannter Konzentration auf ein Agarosegel aufgetragen, im elektrischen Feld aufgetrennt und anschließend im Ethidiumbromidbad gefärbt. Dabei interkaliert der Farbstoff in die DNA. Beim Bestrahlen mit UV-Licht fluoresziert Ethidiumbromid orange. Hierbei kann ein Mengenverhältnis zwischen eingesetztem Marker (bekannter Konzentration) und Probe abgeschätzt werden.

2.2.6 Diagnostik und Genotypisierung der Mäuse

2.2.6.1 Isolierung von DNA aus Schwanzspitzen

Für einige Genotypisierungsdagnostiken wird Gewebe oder Blut zur DNA-Aufreinigung benötigt. Da Blutabnahmen bei Mäusen im größeren Maßstab nicht praktikabel ist, wird die Schwanzspitze der Maus abgetrennt und für die weiteren Untersuchungen verwendet. Je nach dem wie groß das abgetrennte Stück ist und wie die DNA-Aufreinigung erfolgt können die unterschiedlichsten Tests durchgeführt werden bis hin zu Hybridisierungen.

Es wurde ca. 1 mm Schwanzspitze mit einer Schere abgetrennt und in ein Eppendorfgefäß gegeben. Die Schwanzspitze wurde mit 300 µl DNA-Extraktionspuffer und 5 µl Proteinase K (20 µg/ml),(Qiagen, Hilden), für mindestens 2,5 Stunden bei 55°C im Thermoschüttler (Eppendorf) inkubiert.

Dann erfolgte die Inaktivierung der Protease K für 30 Minuten bei 95°C und nach einer Zentrifugation konnte die Schwanzspitzenprobe bei 4°C gelagert werden.

2.2.6.2 Isolierung von DNA aus Haarproben

Die schonendste Methode für das Tier zur Gewinnung von DNA ist die Isolierung aus Haarproben. Das Auszupfen der Haare ist relativ schmerzarm und stellt keine

Verletzung dar. Im Gegensatz zum Abtrennen der Schwanzspitze können von einem Tier sehr häufig Haarproben genommen werden. Allerdings weist die aus Haaren aufgereinigte DNA einen höheren Grad an Verunreinigungen und eine geringere Haltbarkeit bei 4°C auf.

Es wurde mit einer Pinzette ein kleines Haarbüschel vom Bauchfell der Maus ausgezupft. Die Haare wurden mit 50 µl 50 mM NaOH 5 Minuten bei 95°C inkubiert und danach auf 5 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurden für 5 Minuten zentrifugiert und die so gewonnenen DNA-Proben bei -20°C gelagert.

2.2.6.3 CcT4-Diagnostik

Das PCR-Produkt für die *Cct4*-Diagnostik wird mit dem Standardansatz (20 µl oder 12,5 µl Ansatz) mit dem Standard-PCR-Programm bei einer Annealingtemperatur von 60°C amplifiziert.

Durch einen Basenaustausch im *Cct4*-Gen ist eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *AluI* entstanden, man spricht von einem Restriktions-Fragmentlängenpolymorphismus (RFLP).

Das erhaltene PCR-Produkt wurde für die Restriktionsspaltung verwendet.

Folgender 15 µl Ansatz wurde verwendet:

- 1 µl PCR-Produkt
- 1,5 µl 10xReact Puffer
- 0,5 µl Enzym (10 U/µl)
- 12 µl Aquadest

Die Spaltung wurde für mindestens 2,5 Stunden bei 37°C durchgeführt.

Unter idealen Bedingungen kann 1 U Enzym in einer Stunde bei der optimalen Temperatur 1 µg DNA spalten. Allerdings herrschen bei dieser Spaltung keine optimalen Bedingungen vor, da die Menge an amplifiziertem PCR-Produkt nicht bei allen Proben gleich ist und immer noch Verunreinigungen durch die unsaubere DNA-Aufbereitung vorhanden sein können.

Der gesamte Spaltungsansatz wurde mit 3 µl Probenpuffer versetzt und mit einem 2%iges Agarosegel aufgetrennt.

2.2.6.4 *Vps54* ^{β -geo}-Diagnostik

Zur Identisierung der homozygoten und heterozygoten und *Vps54* ^{β -geo}-Allel wurden von den einzelnen Tieren Haarproben und Schwanzspitzen genommen, und die entsprechenden Aufreinigungen (Kapitel 2.2.6.1 und 2.2.6.2) durchgeführt. Bis zur Etablierung einer spezifischen Diagnostik (Drepper, 2005) für das *Vps54* ^{β -geo}-Allel über die im Allel enthaltene LacZ-Kassette nachgewiesen. Dafür wurden eine Standard-PCR mit den spezifische Primer lacZ-F2 und lacZ-R1 durchgeführt und die Produkte in einem Agarosegel nachgewiesen. Für die Diagnostik des *Vps54* ^{β -geo}-Allel an der Integrationsstelle (Drepper 2005) wurde folgender PCR-Ansatz verwendet:

| Bestandteile | 20 μ l Ansatz |
|--------------------|-------------------|
| Taq-MasterMix | 10 μ l |
| PCR_WT_Allel_b | 0,25 μ l |
| PCR_Trap_Allel_b | 0,25 μ l |
| PCR_TrapWT_Allel_a | 0,4 μ l |
| H2O | 8,1 μ l |
| Template DNA | 1 μ l |

Die PCR wurde mit dem Standard-PCR-Programm durchgeführt und die entstanden Amplifikate in einem 2% Agarosegel aufgetrennt. Die Größe es Wildtyp-Fragmentes war 412 bp und des *Vps54* ^{β -geo}-Fragmentes 324 bp.

2.2.6.5 BAC-transgenen Diagnostik

Zur Identifizierung von Tieren, die transgen für den BAC115F6 waren, wurden die beiden Enden des BACs durch die spezifische Primer T7 und BAC115_T7 bzw. SP6 und BAC115_SP6 nachgewiesen. Zur Amplifizierung wurde das Standard-PCR-Programm verwendet und anschließend die Produkte in einem 1% Agarosegel aufgetrennt.

2.2.7 RNA-Methoden

2.2.7.1 TotalRNA-Isolierung aus Gewebe

(Chomczynski und Sacchi, 1987)

Frisches oder schockgefrorenes Gewebe, bis zu 400 g, wurde mit 1 ml pro 100 mg Denaturierungslösung (4 M Guandinium-Thiocyanat; 25 mM Na-Citrat pH 7,0; 0,5% Na-Sarcosyl (v/v); 0,1 M β -Mercaptoethanol) versetzt und mit Hilfe eines Ultra-Turrax (Janke und Kunkel, Staufen) homogenisiert. Die Proben wurden dann auf Eis gelagert und 1 ml pro 100mg Gewebe wassergesättigtes Phenol, 200 μ l pro 100mg Gewebe CHCl_3 /Isoamylalkohol (49:1) und 100 μ l pro 100 mg Gewebe 2 M Na-Acetat pH 4,0 zugegeben und für ca. 1 Minute stark geschüttelt.

Die Proben wurden für 10 Minuten im Eis belassen und danach 30 Minuten bei 10.000 U pro Minute in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, die untere Phenolphase verworfen. Als nächstes wird zur Fällung das gleiche Probenvolumen an Isopropanol zugegeben und 2 Stunden bei -70°C gefällt. Erneut erfolgt ein Zentrifugationsschritt mit 10.000 U/min bei 4°C . Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit ca. 300 μ l Denaturierungslösung resuspendiert. Zur wiederholten Fällung wurde wiederum die gleiche Menge Isopropanol zugegeben, dann erfolgte die Fällung über Nacht bei -20°C . Abzentrifugiert wurde nach der Fällung bei Raumtemperatur in einer Eppendorffzentrifuge bei 13.000 U pro Minute und das Sediment mit 500 μ l 70% EtOH zwei mal gewaschen. Nach Lufttrocknung des Sediments wurden die Proben in 100 μ l DEPC- H_2O (1 ml Diethylpyrocarbonat/ 1 l Wasser) aufgenommen und bei 60°C 10 Minuten gelöst.

Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

2.2.7.2 mRNA-Isolierung

75 μ g total RNA wurden in 100 μ l DEPC- H_2O für mindestens 2 Minuten im Thermoschüttler bei 65°C erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzulösen. 200 μ l der Dynabeadssuspension (hierbei handelte es sich um superparamagnetische Polystyrol-Kügelchen mit 25-meren polyT-Ketten) wurden in ein 1,5ml Eppendorffgefäß gegeben und in den Magnetständer gestellt. Nach 30 Sekunden wurde der Überstand abgezogen, und mit 100 μ l Binding Buffer (20mM Tris-Cl pH7.5,

1M LiCl und 2mM EDTA) gewaschen. Anschließend wurden die Dynabeads in 100µl 2x Binding Buffer aufgenommen. Das gleiche Volumen RNA-Lösung wurde hinzugegeben und unter Schütteln für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Dynabeads mit dem magnetischen Ständer vom Puffer getrennt und zweimal mit Washing Buffer (10mM Tris-Cl pH 7.5, 0.15M LiCl, 1mM EDTA) gewaschen. Eluiert wurde mit 10 bis 20µl Elution Buffer (10mM Tris-Cl pH7.5) oder DEPC-H₂O durch Inkubation bei 65°C für mindestens 2 Minuten. Das Eppendorfgefäß wurde wieder in den magnetischen Ständer gestellt und das Eluat abgenommen. Die mRNA konnte bei -70°C gelagert werden. Die Konzentration wurde mit dem Photometer und durch Vergleich mit einer bekannten Konzentration im RNA-Minigel bestimmt.

2.2.7.3 RNA-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der RNA wird diese in einem Agarosegel aufgetrennt.

Die Gelkammer und der Kamm wurde vorweg für 30 Minuten mit 3% H₂O₂ gereinigt.

Es wurden 1 %igen Gele bestehend aus 0,3 g Agarose, 3 ml 10x MOPS-Puffer (0,2 M 3-N- Morpholino-Propansulfonsäure pH 7,0; 10 mM EDTA pH 7,0) und 27 ml DEPC- H₂O verwendet mit 1 x MOPS-Puffer als Laufpuffer. Die Konzentration wurde mit Hilfe eines Eppendorf-Photometers bestimmt. Danach wurden 1 µg RNA in 9 µl RNA-Probenpuffer (50% Formamid; 10% 10 x MOPS; 0,45% Formaldehyd; 7% Glycerin; 0,5% (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen und 1 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) zugegeben. Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei 65°C denaturiert, und danach 5 Minuten auf Eis inkubiert.

Die Spannung während des Gellauf beträgt 10 V pro cm, und nach dem Ende des Gellaufs erfolgte die Dokumentation.

2.2.7.4 Reverse Transkription (RT)

Zur Untersuchung von RNA macht man sich die Eigenschaft einiger RNA-abhängigen DNA-Polymerasen zu eigen, diese nutzen die RNA als Matrize für die Erstellung eines DNA-Stranges. Der gebildete DNA-Strang wird auch komplementäre DNA oder copy DNA (cDNA) genannt.

Diese cDNA kann nun als Template in einer PCR-Reaktion verwendet werden. Es können Aussagen über die Genexpression von Zellen und Geweben gemacht werden und es besteht die Möglichkeit Expressionslevel von RNA zu quantifizieren.

Die Gesamtreaktion, bestehend aus reverser Transskription (RT) und PCR-Amplifikation, bezeichnet man als RT-PCR.

Es wurde der Omniscrypt RT-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet.

Für die Reaktion wurden 1 – 2 µg Gesamt-RNA in 10 µl DEPC- H₂O aufgenommen und zu folgenden Ansatz pipetiert:

| | |
|--------|--------------------------|
| 1 µl | RNasin; 1:4 verdünnt |
| 0,5 µl | PolyT-Primer (0,5 µg/µl) |
| 2 µl | RT-Puffer |
| 2 µl | DNTPs (5 µM) |
| 1 µl | Omniscrypt |
| 3,5 µl | DEPC- H ₂ O |

Die Inkubationszeit dieses Ansatzes betrug 60 Minuten bei 37°C, für die darauffolgende PCR wurde jeweils 1 µl RT-Reaktionsansatz eingesetzt.

2.2.7.5 Realtime PCR

Mit Hilfe des LightCycler Systems (Roche) wurde eine Quantifizierung von Transkriptmengen in der online PCR von Transkriptmengen unter Verwendung des Farbstoffs SYBR Green I (QIAGEN) durchgeführt. Der Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA und die Menge des PCR-Produktes konnte über die Fluoreszenzzunahme bei 521nm bestimmt werden. Hierzu wurde der Wendepunkt (crossing point) in der log-Phase der sigmoiden Fluoreszenzkurve jeder Probe bestimmt. Die ideale Produktgröße in der online PCR liegt zwischen 150 und 200bp. Beim Primerdesign ist, wenn möglich, auf dieses Kriterium geachtet worden. Die Ansätze wurden immer als Doppelbestimmung (Technisches Replikat) durchgeführt um Pipettierfehler und andere Schwankungen zu minimieren. Der verwendete Standard-Ansatz sah folgendermaßen aus: 20µl Sybr Green MasterMix, je 0,4µl Primer (50µmol/µl), 17,2µl H₂O und 2µl Template (Standard RT-Ansatz, siehe 2.3.5). Von diesen 40µl sind je 18,5µl in eine für den Lightcycler vorgesehene Glaskapillare (Roche) gegeben worden. Nach schließen und zentrifugieren bei 1000g für 1 Minute wurde das Gerät (bis zu 32 Proben) beladen und gestartet. LightCycler PCRs wurden nach folgendem Standard-Programm durchgeführt. Während einer initialen Denaturierung von 95°C für 15 Minuten wurde die Polymerase aktiviert. Es schlossen

sich bis zu 70 Zyklen mit 20 Sekunden und 94°C Denaturierung, 20 Sekunden 58°C Annealing und 15 Sekunden 72°C Elongation an. Im Anschluß an die letzte Elongationsphase führte das Gerät eine Schmelzkurvenanalyse durch, so dass Ergebnisse ohne Nebenprodukte identifiziert und ausgewertet werden konnten. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte gegenüber einem internen Standard. Verwendet wurde ein Primerpaar spezifisch für β -Aktin. Hiermit wurde die Transkriptmenge normalisiert. Es wurden generell Ansätze von drei biologischen mit je zwei technischen Replikaten gemessen. Zur Berechnung der normalisierten Transkriptmenge von Wildtyp und Mutante wurde folgende Formel verwendet:

$$\Delta C_T = C_T (\text{Gen A in Gewebe X}) - C_T (\text{Gen N in Gewebe X})$$

Die ΔC_T Werte (*certain threshold level*) wurden so aus den Messungen für β -actin (Gen N) und das zu untersuchende Gen (Gen A) ermittelt. Die drei Messwerte für den Wildtyp wurden gemittelt und genau wie die drei Wobbler Messwerte nach folgender Formel in relative Transkriptmengen (X) umgerechnet:

$$X = 2^{-\Delta C_T}$$

Die relativen Transkriptmengen der Mutante wurden anschließend durch die Werte des Wildtyps geteilt und so zueinander in Verhältnis gesetzt.

2.2.8 Bestimmung des Blutglukosegehaltes

Zu Bestimmung des Glukosgehaltes im Blut wurden vor- und nachmittags gemessen. Dazu wurde die Schwanzvene der Tiere punktiert und 1-2 Blutstropfen für die Messung abgenommen. Das Blut wurde auf einen Teststreifen aufgetragen und mit einem Messgerät (Disetronic Freestyle, Hersteller Disetronic) der Glukosegehalt ermittelt.

2.2.9 Zyklusuntersuchung, Superovulation und Zygotentransfer

Zur Bestimmung des Zyklus wurden über 14 Tage täglich die Epithelzellen der Vagina mit Wasser ausgespült und im Lichtmikroskop beurteilt.

Als Eizellenspender wurden Wobbler-Weibchen im Alter von ca. 49 Tagen verwendet. Die Tiere wurden zunächst 5 I.U. des Hormone Pregnant Mare's Serum

Gonadotropin (PMSG, Handelsname Intergonan, Intervet) gespritzt und nach 46 Stunden 2,5 I.U des Hormons humanes Chorionic Gonadotropin (hCG, Handelsname Predalon, Intervet). Nach der zweiten Hormongabe wurden die Weibchen über Nacht mit geschlechtsreifen Männchen zusammengesetzt und die Eizellen am folgenden Morgen präpariert. Dafür wurden die Weibchen durch Durchtrennung des zervikalen Rückenmarks getötet. Der Uterus wurde entnommen und die Eizellen vorsichtig mit 1x PBS ausgespült. Die gewonnen Eizellen wurden in pseudoschwangere Weibchen des Stammes CD1. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Eizellen noch im 1-Zell-Stadium. Die Transfers wie zuvor beschreiben (Schmidt, 2002) von Sandra Heising durchgeführt.

Nach der Geburt wurde eine CcT4-Diagnostik (Kapitel 2.2.6.3) der Jungtiere durchgeführt.

2.2.10 Gewichtsmessungen

Zur Erfassung des Gewichts wurden alle Wurfgeschwister im Alter von zehn und zwölf Tagen mit einer Ohrnummer zur Unterscheidung versehen. Die Gewichtsmessung erfolgte alle 2-3 Tage und wurde bis zum 40 Tag fortgesetzt. Es wurden nur Würfe in einer Größenordnung von fünf und acht Tieren betrachtet, um Schwankungen in der Gewichtszunahme durch unterschiedliche Wurfgrößen zu minimieren. Das Absetzen von der Mutter erfolgte bei allen Würfen im Alter von 28-30 Tagen.

Männliche und weibliche Tiere wurden in unterschiedlichen Tabellen dargestellt, da sich es geschlechtsspezifische Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren gibt.

2.2.11 Kraftmessungen

Zur Erfassung der Kraft der Forderextremitäten wurden von allen Wurfgeschwistern vom zehnten und zwölften Tagen im Abstand von 2-3 Tagen Messungen durchgeführt, da die Tiere ab diesem Alter in der Lage waren koordiniert zu greifen. Die Dynamometer-Vorrichtung stammt aus der Universitätseigenen Werkstatt, gleicht aber in der Funktion der im Handel erhältlichen Vorrichtungen (Tippmann, 2004). Die Tiere wurden zur Messung mit den Vorderpfoten auf den Gitteraufsatz gesetzt und am Schwanz waagrecht zur Seite weggezogen bis die Tiere den Gitteraufsatz

losließen. Die Kraft wurde anhand der Auslenkung des Gitteraufsatzes in Centi-Newton (cN) ermittelt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und der Mittelwert errechnet.

2.2.12 Histologische Methoden

2.2.12.1 Paraffineinbettung

Für die Paraffineinbettung wurden die frisch entnommenen Gewebe 12 Stunden in 3,7% Para-Formaldehyd (Formalin®) bei 4°C fixiert. Formaldehyd reagiert mit basischen Aminosäuren, wobei es zur Bildung quervernetzender Hydroxymethylgruppen kommt. Somit ist die Permeabilität für Makromoleküle relativ gering und die Struktur zytoplasmatischer Proteine wird kaum verändert.

Zur Entfernung des Formalins wurden die Gewebe 60 min. mit Wasser ausgewaschen. Für die anschließende Entwässerung wurden die Gewebe für 2 h in 50% Isopropanol gelegt. Danach wurden sie für 3 h in 75% Isopropanol, danach für 6 h in 90% Isopropanol und zum Schluss 2 mal je 4 h in 100% Isopropanol entwässert. Für die Einbettung wurden die Gewebe in ein 1:1 Gemisch aus 100% Isopropanol und flüssigen Paraffin (Paraplast® x-TRA – Oxford Labware) gegeben und 12 h bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden die Gewebe 2 mal in flüssigen Paraffin für 4 h bei 60°C gewaschen. Die Gewebe wurden in vorbereitete Formen mit flüssigen Paraffin gegeben, fixiert und bei Raumtemperatur ausgehärtet.

2.2.12.2 Parafinschnitte

Für die Parafinschnitte wurden die Paraffinblöcke auf einem Supercut 2050 der Firma Reichert-Jung befestigt. Mit Hilfe von Glasmessern wurden Schnitte mit einer Dicke von 7,5 µm angefertigt welche auf einen Wassertropfen auf dem Objektträger (Superfrost® Plus der Firma Menzel-Glaser)) übertragen wurden. Zur Streckung der Schnitte wurden die Objektträger auf eine 40°C warme Heizplatte gelegt.

2.2.12.3 Entparafinierung

Für die Entparafinierung wurden die Objektträger für 30 min. bei 60°C gelagert und danach sofort 2 mal 10 min. in Xylol gewaschen. Danach wurden die Schnitte je 5

min. in der absteigenden Alkoholreihe in 100%, 90%, 80%, 70% Ethanol rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte 3 mal für 5 min. in CMF-PBS gewaschen.

2.2.12.4 Gefrierblöcke

Für die Herstellung der Gefrierblöcke wurde frisch entnommenes Gewebe verwendet. Die Gewebe wurden mit einem Einbettmedium (Tissue freezing medium[®] – Jung) auf Korkplättchen fixiert und zum Schutz vor Gefrierschäden benetzt. Nach der Fixierung wurden die Gewebe sofort für ca. 30 Sekunden in flüssiges Propan gegeben, um die Präparate zum Schutz vor Gefrierschäden vorzukühlen. Anschließend wurden die Blöcke direkt in flüssigen Stickstoff überführt. Die Gewebelöcke wurden in Plastikröhrchen bei – 80°C gelagert.

2.2.12.5 Gefrierschnitte

In der Immunhistochemie bieten Gefrierschnitte eine viel bessere Erhaltung der Antigene als Paraffinschnitte. Außerdem ermöglichen Gefrierschnitte den flexiblen Einsatz von Fixativen, d.h. man kann für ein und demselben Gewebelock für verschiedene Antigene das jeweils am besten geeignete Fixativ feststellen. Jedoch sind die morphologischen Details bei Gefrierschnitten meistens schlechter erhalten als bei Paraffinschnitten.

Die Gefrierschnitte wurden mit einem 2800 Frigocut E der Firma Reichert-Jung in einer Dicke von 10 µm angefertigt und direkt mit einem Objektträger abgenommen. Die Schnitte wurden zum Antrocknen ca. 5 min bei Raumtemperatur gelagert und anschließend in eine feuchte Kammer gelegt.

Die Gefrierschnitte wurden je nach verwendeten Erstantikörper 15 min. mit 100% Methanol bei –20°C oder mit 3,7% Para-Formaldehyd fixiert.

2.2.12.6 Antikörperfärbung

Bei der Antikörperfärbung wird die hochspezifische Bindung von Antikörpern an ihre Antigene ausgenutzt. Dabei kann man monoklonale oder polyklonale Antikörper verwenden.

Monoklonale Antikörper sind das Produkt eines einzelnen Klons von Plasmazellen. Antikörper eines bestimmten Klons sind immunchemisch identisch und reagieren nur

mit einem bestimmten Epitop des Antigens, gegen welches sie generiert wurden. Sie wirken daher hoch spezifisch.

Polyklonale Antikörper werden von verschiedenen Zellen gebildet und sind folglich immunchemisch verschieden; sie reagieren mit verschiedenen Epitopen des Antigens, gegen welches sie generiert worden sind. Dieses Antikörpergemisch ist also weniger spezifisch was aber ein Vorteil sein kann, wenn einige Antigen Epitope durch die Fixierung denaturiert wurden.

Die (Erst-)Antikörper können mit einem Fluoreszenzfarbstoff (oder Enzym) gekoppelt sein. Sie können aber auch mit einem Zweitantikörper, der gegen den Erstantikörper gerichtet ist, detektiert werden, der ein Fluorochrom oder Enzym trägt. Der Einsatz des Zweitantikörpers führt zu einer Signalverstärkung, da an einem Erstantikörper mehrere Zweitantikörper binden können.

Das Protokoll für die Antikörperfärbung ist je nach verwendeten Erstantikörper unterschiedlich. Die Unterschiede beziehen sich auf die Fixierung der Schnitte (Para-Formaldehyd, Methanol) und die verwendeten Blockierlösungen.

Für die Standard-Antikörperfärbung wurden die Schnitte nach der Fixierung 3 mal in CMF-PBS für je 5 min. gewaschen. Danach wurden die Pufferreste gründlich abgesaugt und BSA (Rinderserumalbumin in PBS gelöst) aufgetragen. Die Zugabe von BSA dient der Reduktion von unspezifischer Hintergrundfärbung. Das BSA wurde in einer Konzentration zwischen 0,5% und 2%, je nach Erstantikörper, verwendet. Die Inkubation wurde bei Raumtemperatur für 1 h durchgeführt. Danach wurde abgesaugt und der Erstantikörper auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation des Erstantikörpers erfolgte bei Raumtemperatur für 1h oder über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und die Schnitte 3x5 min. in CMF-PBS gewaschen.

Der Zweitantikörper wurde aufgetragen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Die drei folgenden Waschschrte mit CMF-PBS wurden ebenfalls je 5 Minuten im Dunkeln durchgeführt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern. Die Antikörper gefärbten Schnitte wurden nach dem letzten Waschschrte mit Elvanol eingedeckt und dunkel gelagert.

2.2.12.7 Hoechstfärbung

Die Hoechst-Färbung (Farbstoff Bisbenzimid) diente zur Ergänzung der Antikörperfärbungen. Aufgrund der DNA-Interkalierenden Eigenschaft des

Farbstoffes werden bei der Hoechst-Färbung die Zellkerne angefärbt. Durch die starke Färbung des kondensierten Chromatins lassen sich apoptotische und proliferierende Zellen detektieren.

Die Hoechst-Färbung wurde im Anschluss an einige Antikörperfärbungen durchgeführt. Dabei wurde 1µg/ml Hoechst in CMF-PBS aufgenommen und auf die Schnitte gegeben. Nach 10 min. Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Objektträger mit den Schnitten 3x5 Minuten in CMF-PBS gewaschen und schließlich mit Elvanol eingedeckt.

2.2.12.8 Nisslfärbung

Die Nissl (Kresylviolett) Färbung ist besonders geeignet zur Darstellung des Nervensystems und der Knochen. Die Kerne und die Tigroidsubstanzen werden lila bis violett angefärbt. Daher sind die großen Neuronen des Zentralen Nervensystems gut erkennbar.

Für diese Färbemethode mussten die Objektträger mit den Schnitten für 15 min. in Methanol bei -20°C fixiert werden. Danach wurden sie in das auf 60°C vorgewärmte Kresylviolettbad gegeben und für 15 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte je 3 min in 70%, 80%, 90%, 100% Ethanol dehydriert und danach 5 min. in Xylol gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte in Entellan (Merck) eingedeckt.

2.2.12.9 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hämatoxylin färbt die Zellkerne blauviolett und Eosin das Zytoplasma rosa.

Die Schnitte wurden für 15 min. mit gefilterten Hämalaun (1:1 Gemisch aus Harris und Meyer`s Hämatoxylinlösung) gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte 15 min. unter fließendem Leitungswasser ab gespült. Die Objektträger wurden trocken gesaugt und anschließend wurde 0,5%-iges Eosin auf die Schnitte gegeben. Nach 1,5 min. wurden die Schnitte kurz mit aqua dest. abgewaschen und dann je 1 min. in 70%, 80%, 90%, 100% Ethanol dehydriert. Danach wurden die Objektträger in Xylol für 5 min. gebadet und schließlich mit Entellan eingedeckt.

2.2.12.10 β -Galaktosidase-Färbung

Durch eine β -Galaktosidase-Färbung kann die Expression eines LacZ-Gens durch eine Blau-Färbung indirekt nachgewiesen werden. Durch die Spaltung von X-Gal durch die β -Galaktosidase entsteht ein blauer Indolfarbstoff.

Die Gefrierschnitte wurden ca. 15 Minuten mit der Fixierlösung (2% Formaldehyd, 0,2% Glutardialdehyd in PBS) fixiert und danach einmal für fünf Minuten mit einem 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen. Die frisch angesetzte Färbelösung (5mM Kaliumferrocyanat, 5mM Kaliumferricynid, 0,2mM Magnesiumchlorid, 0,001% X-Gal in PBS) wurde auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wurde erneut einmal für fünf Minuten mit 50mM Phosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen und über eine Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 100%) entwässert. Als letztes wurde die Schnitte für fünf Minuten in 100% Xylol gewaschen. Das Eindecken der Schnitte erfolgte mit Entellan (Merk).

2.2.12.11 Confokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM)

Für die confokale Lasermikroskopie wurde das von der Firma Leica entwickelte CLSM-SP Mikroskop benutzt, das optische Schnitte in verschiedenen Ebenen erzeugt, ohne dabei wie im Fluoreszenzmikroskop Streulicht aus darüber sowie darunter liegenden Ebenen mit aufzufangen. Damit wird eine bessere räumliche Auflösung erreicht. Im confokalen Laserrastermikroskop wird nur ein bestimmter kleiner Teil der Probe mit dem Anregungslicht eines fokussierten Laserstrahls belichtet, der sich rasch über die verschiedenen Punkte in einer Brennebene der Probe bewegt. Das Laserlicht eignet sich für diese Anwendung besonders gut, weil ein Laserstrahl monochromatisches Licht mit hoher Intensität auf einen kleinen Punkt fokussieren kann. Das Laserlicht wird durch einen Lichtleiter zur Scan- Einheit gebracht, in der sich die Lochblenden, dichroischen Spiegel und PMTs befinden. Zwei Scan- Spiegel sind dazu nötig: einer für die Punkte innerhalb einer Zeile (X-Richtung) und einer für die Zeilen des Bildes (Y-Richtung). Das Fluoreszenzlicht wird über dieselben Spiegel zum Detektor geleitet. Ein Rechner steuert über zwei tellmotoren die Position der beiden Scan- Spiegel und rekonstruiert aus der gemessenen Fluoreszenzintensität jedes einzelnen Punktes ein Bild des Objekts. Da die confokale Optik dafür sorgt, dass nur Licht aus der Brennebene des Objektivs zum Detektor gelangt, können nacheinander mehrere Schichten des Objekts

gescannt und abgebildet werden. Solche optische Schnitte können dann im Rechner zu drei-dimensionalen Bildern des Objekts zusammengesetzt werden. Das Gerät arbeitet mit einem Argon/Krypton- Laser, der sowohl blaues (488 nm) als auch grünes (568 nm) Anregungslicht liefert. Die Präparate konnten bei 63-facher Vergrößerung (PI APO 63x/1,32/Öl) betrachtet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Neue Phänotypen der Wobbler-Maus

3.1.1 Oogenese der Wobbler-Weibchen

Die männlichen Wobbler-Mäuse zeigen neben der Neurodegeneration einen Spermatogenesedefekt, es findet sich allerdings in der Literatur kein Hinweis auf die Oogenese der Wobbler-Weibchen. Bisher konnten bei Wobbler-Weibchen keine Anzeichen einer Schwangerschaft beobachtet werden, obwohl sie mit geschlechtsreifen Männchen über längere Zeiträume zusammen gehalten und Paarungen beobachtet wurden. Fraglich ist, ob die Oogenese der Weibchen eine Störung ähnlich der Spermatogenese der Männchen aufweist. Makroskopische und lichtmikroskopische Untersuchungen des Ovars und der Gebärmutter zeigten keinerlei Auffälligkeiten oder gaben Hinweise auf eventuelle Beeinträchtigungen (Daten nicht gezeigt). Neben einem Defekt in der Oogenese, des Ovars oder der Gebärmutter kommt als Ursache für Unfruchtbarkeit ebenfalls eine hormonelle Unterbrechung des Ovarialzyklus in Betracht. Zyklusunterbrechungen und eine daraus resultierende Unfruchtbarkeit können auch typische Sekundäreffekte eines schlechten Allgemeinzustandes sein.

Um die Frage nach der Funktionalität der Oogenese der Wobbler-Weibchen aufzuklären, wurden Ovarialzyklusuntersuchungen durchgeführt. Mäuse besitzen einen Ovarialzyklus der ca. 4-5 Tage dauert und sich in vier Phasen einteilt: Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus. Die Phase direkt vor der Ovulation wird als Proöstrus bezeichnet in der sich die Follikel im Ovar entwickeln. Es folgt der Östrus, die fruchtbare Phase innerhalb der die Ovulation stattfindet. Anschließend folgt die Phase des Metöstrus in der sich die Oozyte durch den Ovidukt in den Uterus bewegt. Schließlich folgt die Phase des Diöstrus in der die Follikelreifung erneut einsetzt. Die einzelnen Phasen können anhand der morphologischen Unterschiede der Vaginalepithelzellen unterschieden werden. Die Unterscheidung wird lichtmikroskopisch anhand der Größe und Form der ausgespülten Epithelzellen vorgenommen. Kantige, große, im Durchmesser ca. 30 µm messende Zellen sind

typisch für den fruchtbaren Abschnitt des Zyklus, dem Östrus. Runde, deutlich kleinere Zellen kennzeichnen den unfruchtbaren Abschnitt des Zyklus, den Diöstrus. Es konnte von mir eindeutig gezeigt werden, dass die für den fruchtbaren Zyklusabschnitt typischen großen, kantigen Epithelzellen bei Wobbler-Weibchen nicht vorhanden sind. Der Zyklus stoppt in der Phase des Diöstrus (Abb.3.1). Die Zyklusbestimmung wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen täglich durchgeführt, um auszuschließen, dass es sich bei den Wobbler-Weibchen um eine eventuelle Verlängerung des Zyklus handelt. Dies wird beispielsweise bei älteren oder kranken Tieren häufig beobachtet. Lediglich bei einem von vier untersuchten Wobbler-Weibchen konnte das Übergangsstadium Proöstrus zwischen der fruchtbaren und unfruchtbaren Phase des Ovarialzyklus beobachtet werden. Dies entspricht allerdings keinem kompletten Zyklus, so dass keine Ovulation zu erwarten war. Das Zwischenstadium zwischen den fruchtbaren Östrus und unfruchtbaren Diöstrus wiesen sowohl kleine runde Zellen als auch größere Zellen auf. Diese größeren Zellen entsprechen von ihrer Form her nicht den Zellen, die während des Östrus ausgespült werden, da sie nicht die typische eckige Form haben, sondern eher rund sind. Die Ovarialzyklusunterbrechung liefert eine schlüssige Erklärung, warum bei keinem Wobbler-Weibchen bisher eine Schwangerschaft beschrieben wurde. Die Tiere haben *de facto* keinen Ovarialzyklus und können so keine reifen Oozyten bilden.

Eine mögliche Erklärung für die Zyklusunterbrechung liefert der verschlechterte Allgemeinzustand, so dass dies als Ursache der Zyklusunterbrechung nicht auszuschließen ist. Gestützt wird diese Annahme durch das stark reduzierte Gewicht der Wobbler-Weibchen im Vergleich zu Wildtypen und die Einschränkung durch die Muskelatrophie bei Verhaltensweisen wie z.B. dem Fressen oder Putzen. Wenn der Zyklus der Weibchen aufgrund von sekundären Effekten unterbrochen wird, müsste es möglich sein, durch Hormongabe erneut einen Ovarialzyklus bei Wobbler-Weibchen zu induzieren. In diesem Fall sollten funktionsfähige Oozyten zu erwarten sein.

Dazu wurden die Hormone Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG) und humanes Chorionic Gonadotropin (hCG) verwendet. PMSG übt eine ähnliche stimulierende Wirkung wie das Follikelstimulierende Hormon (FSH) und Luteinisierungshormon (LH) aus und bindet auch an die entsprechenden Rezeptoren. Dadurch wird die Follikelreifung stimuliert. hCG bindet an die LH-

Rezeptoren und kann so die Ovulation auslösen. Wobler-Weibchen wurden im Abstand von 48 Stunden das jeweilige Hormon injiziert und über Nacht zu geschlechtsreifen, heterozygoten Männchen (*wr/+*) gesetzt. Am folgenden Morgen wurden die befruchteten Eizellen isoliert, da die Wobler-Weibchen auf Grund ihres schlechten Allgemeinzustandes nicht in der Lage sind Junge auszutragen und die Gefahr besteht, dass die sich entwickelnden Embryonen von der Mutter wieder resorbiert werden. Die befruchteten Eizellen wurden in scheinchwangere Leihmütter transferiert und die Jungen hinsichtlich des Genotyps analysiert.

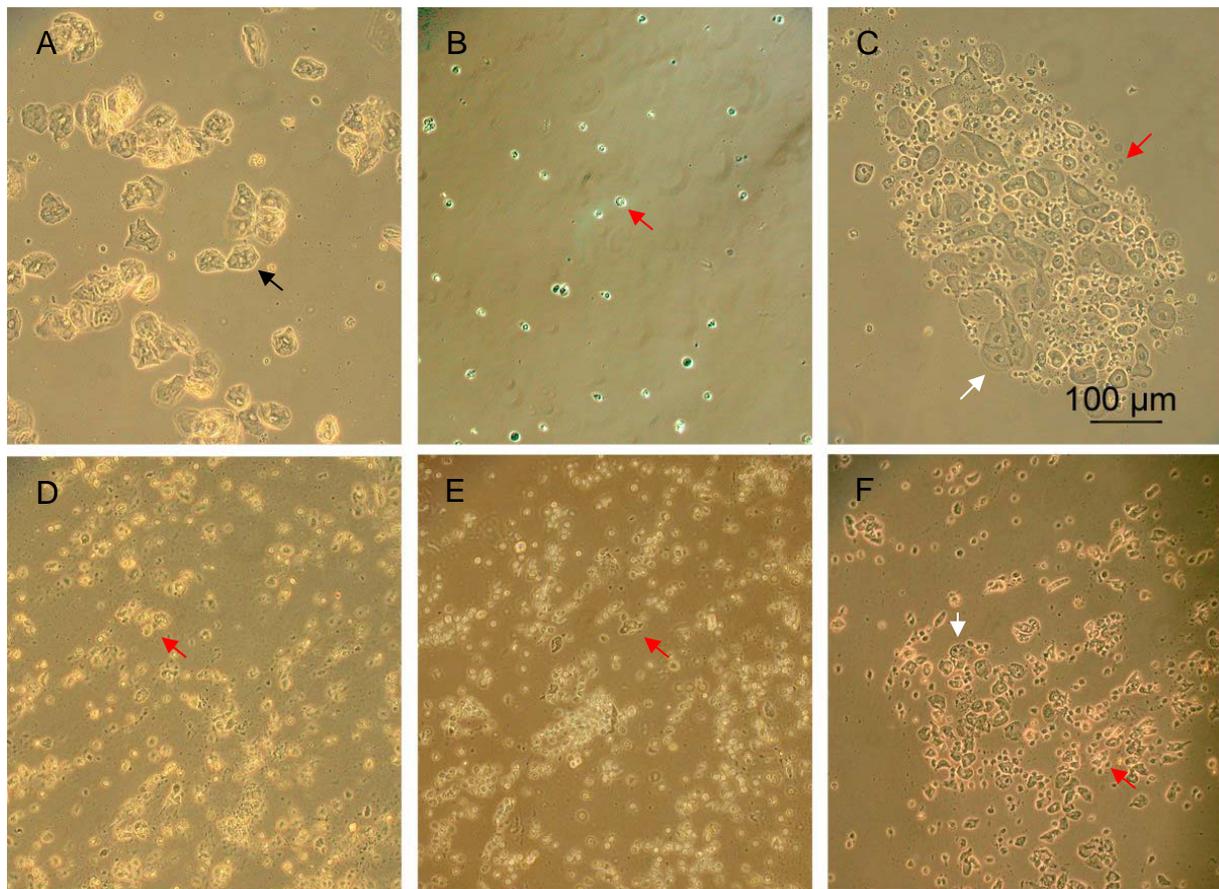


Abb.3.1: Zyklusuntersuchung der Wobler-Weibchen

Lichtmikroskopische Aufnahmen der ausgespülten Epithelzellen von Wobler- und Wildtyp-Weibchen im Alter von ca. 7-9 Wochen über eine Dauer von 14 Tagen. Die schwarzen Pfeile weisen auf die Zellen des Östrus-Stadiums (A), die roten Pfeile auf die Zellen des Diöstrus-Stadiums (B, D, E) die weißen Pfeile die Zellen während des Proöstrus-Stadiums (C,F). Maßstab gilt für alle Abbildungen. Die Wildtyp (A-C) zeigten die Einzelstadien während eines Ovarialzyklus mit den unfruchtbaren (B), fruchtbaren (A) und zwischen Stadien (C). Die Wobler-Weibchen (D-F) hingegen wiesen fast ausschließlich nur das Diöstrus-Stadium (D, E), in einem Fall wurde das Proöstrus-Stadium (F) beobachtet.

Ca. 50% der geborenen Jungtiere von insgesamt 12 Tieren entwickelten mit 3-4 Wochen den Wobbler-Phänotyp, was der erwarteten mendelschen Verteilung entsprach.

Dies zeigt, dass die Oogenese der Wobbler-Weibchen keine Defekte aufweist und voll funktionsfähige Eizellen hervorbringt, aus denen sich Junge normal entwickeln können. Ein, dem Spermatogenesedefekt der Männchen, ähnlicher Defekt in der Oogenese liegt bei den Weibchen nicht vor. Die Zyklusunterbrechung beruht somit höchstwahrscheinlich auf der schlechten Verfassung der Wobbler-Weibchen und wäre damit ein Sekundäreffekt.

Ungeklärt ist bisher, ob der Uterus der Wobbler-Weibchen funktionsfähig ist. Dies ist unwahrscheinlich, da von der Wobbler-Mutation lediglich die Skelettmuskulatur betroffen ist und nicht die Glattmuskulatur. Berichte über die Beeinträchtigung von Drüsengeweben sind in der Literatur ebenfalls nicht zu finden. Eine Überprüfung dieser Art konnte in meinem experimentellen Rahmen nicht durchgeführt werden, da der schlechte Allgemeinzustand der Wobbler-Weibchen eine Schwangerschaft von vornherein ausschließt.

3.1.2 Futterakkumulationen im Magen

Bisher konnten für die Wobbler-Maus eine Motoneuronendegeneration und ein Spermatogenesedefekt beschrieben werden, weitere Defekte in anderen Geweben sind in der Literatur nicht beschrieben. Während verschiedener Präparationen von Wobbler-Mäusen fielen immer wieder stark gefüllte Mägen bei den Tieren auf.

Nähere Untersuchungen und wiegen der Tiere und ihrer Mägen zeigten, dass Wobbler-Tiere beider Geschlechter eine sehr große Futtermenge im Magen aufweisen, unabhängig vom Zeitpunkt der Präparation. Beide Teile des Magens, der Cardiac und Pyloric waren auffällig stark mit Futter gefüllt. Diese Ansammlung von teilweise verdaulichem Futter findet sich nur in den Mägen, in den Teilen der Därme ist keine vergleichbare Akkumulation zu finden. Der Anteil des Magengewichtes und seines Inhalts ist durch die Akkumulation im Verhältnis zum gesamten Körpergewicht im Vergleich zu Wildtypen deutlich erhöht (Abb.3.2). Die Wobbler-Mäuse zeigen auch eine deutlich größere Streuung der Gewichtswerte, was möglicherweise mit der Variation des Allgemeinzustandes der Tiere oder dem Grad der Atrophie korreliert.

Mit morphologischen Untersuchungen mittels Lichtmikroskopie an Gewebeschnitten konnten keine Unterschiede in der Magen- oder Darmwand zwischen Wobbler-Mäusen und Wildtypen auffindig gemacht werden. Größere Defekte in der Struktur der Magen- oder Darmwand sind daher auszuschließen (Daten nicht gezeigt). Defekte des peripheren Nervensystems des Magen- und Darmtraktes können zur Beeinträchtigung der Magen- und Darmtätigkeit führen. Allerdings weist das periphere Nervensystem der Wobbler-Tieren keine Unterschiede zu Wildtypen auf (Daten nicht veröffentlicht).

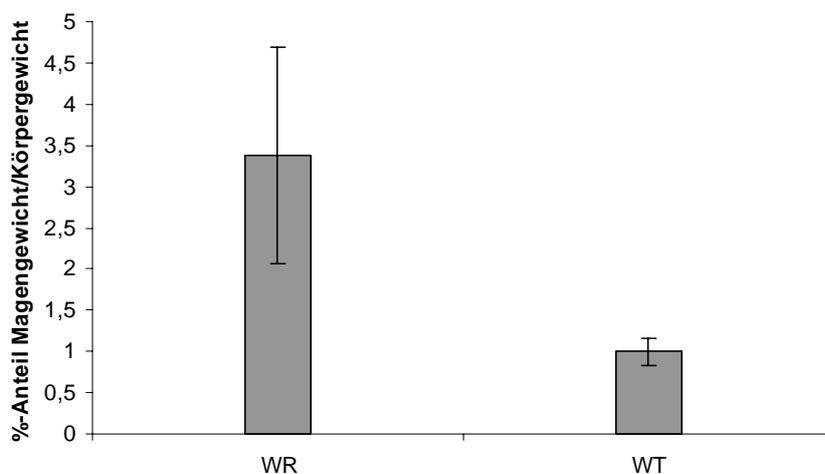


Abb.3.2: Vergleich des Gewichtsanteils des Magens samt Inhalts am gesamten Körpergewicht von Wobbler-Tieren und Wildtypen

Das Gewicht des Magens samt Inhalt wurde in Relation zum gesamten Körpergewicht der Tiere gesetzt und das Verhältnis in Prozent angegeben. Die Signifikanz wurde durch einen t-Test ermittelt und betrug 0,000175, n=10.

Im Vergleich sind die Mägen mit samt Inhalt der Wobber-Mäuse mehr als doppelt so schwer wie die der Wildtypen, während bei den Wobber-Mäusen eine starke Streuung der Werte auftritt.

Es ist aber denkbar, dass es sich bei diesem beobachteten Phänotyp um einen Sekundäreffekt handelt, der auf der verminderten Lokomotion durch die Atrophie der Vorderbeine und so eine verminderte Darmperistaltik beruht. Dagegen spricht der Umstand, dass sich nur im Magen eine Ansammlung von Futter befindet nicht aber im Darm.

3.2 Metabolomuntersuchungen

3.2.1 Schwankender Blutglukosegehalt

Die auffälligen Futterakkumulationen im Magen der Wobbler-Tiere könnte ein Hinweis auf einen Stoffwechseldefekt, wie z.B. eine Unterversorgung geben. Zudem ist der Allgemeinzustand der Wobbler-Mäuse im Vergleich zu Wildtypen verschlechtert und ihr Gewicht reduziert. Glukose ist der wichtigste Energielieferant für einen Organismus. Zur Bestimmung des Glukosegehaltes wurde mit einem handelsüblichen Testgerät die Glukosekonzentration im Blut aus der Schwanzvene gemessen. Da die Wobbler-Mäuse zusätzlich mit sehr energiereichem, eingeweichtem Futter gefüttert werden, welches täglich am Vormittag gefüttert wird, wurden die Messungen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten am Vor- und Nachmittag durchgeführt. Als Kontrolltiere wurden stets nur Geschwistertiere (sowohl $+/+$ als auch $wr/+$) aus dem gleichen Käfig wie die zu messenden Wobbler-Tiere verwendet. Der Blutglukosegehalt jedes Tieres wurde über mehrer Tage sowohl vor- als auch nachmittags gemessen.

Der Glukosegehalt des Blutes von Wobblern-Mäusen war insgesamt signifikant niedriger als die der Wildtypen. Eine Unterversorgung war durch diesen leicht reduzierten Glukosespiegel noch nicht gegeben, da erst bei einem Wert unter 40 mg/dl eine Hypoglykämie vorliegt. Mit einem Mittelwert von 103,9 mg/dl sind die Wobbler-Mäuse deutlich von dem Grenzwert der Hypoglykämie entfernt. Jedoch zeigt sich eine deutlich größere Streuung der einzelnen Werte, so dass diese Maximal- und die Minimalwerte die der Wildtypen übertrafen (Abb.3.3, A). Der Variationskoeffizient (VK) liegt bei den Wobbler-Mäusen mit $VK_{WR}=27,9\%$ deutlich höher als bei den Wildtypen mit $VK_{WT}=19,2$. Diese starke Schwankung der Wobbler-Mäuse lässt sich nicht aus der Fütterung mit dem Zusatzfutter am Vormittag erklären, da zu allen Zeitpunkten der Messungen diese Schwankungen der Glukosewerte auftraten.

Um auszuschließen, dass es sich bei diesen Schwankungen um einen Sekundäreffekt handelt, der durch die eingeschränkte Futteraufnahme bedingt durch die Atrophie der Tiere verursacht wird, wurden an Tieren, welche homozygot für die *Adr*-Mutation waren, ebenfalls Messungen der Glukosekonzentration im Blut durchgeführt. Die *Adr*-Mutanten haben eine deutlich gravierendere Beeinträchtigung als die Wobbler-Mäuse. Betroffene Tiere leiden an einer Myotonie, einer

Wachstumsretardierung, die mit ca. vier Wochen auftreten, und einer Versteifung der Hinterbeine. Die Lebenserwartung beträgt vier bis sieben Wochen. Diese Tiere sind durch die Myotonie ebenfalls stark in der Futteraufnahme behindert.

Die Glukosewerte der Adr-Mutanten schwanken nicht so stark wie die der Wobbler Mäuse, zudem sind die Mittelwerte deutlich niedriger im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypen (Abb.3.3, B).

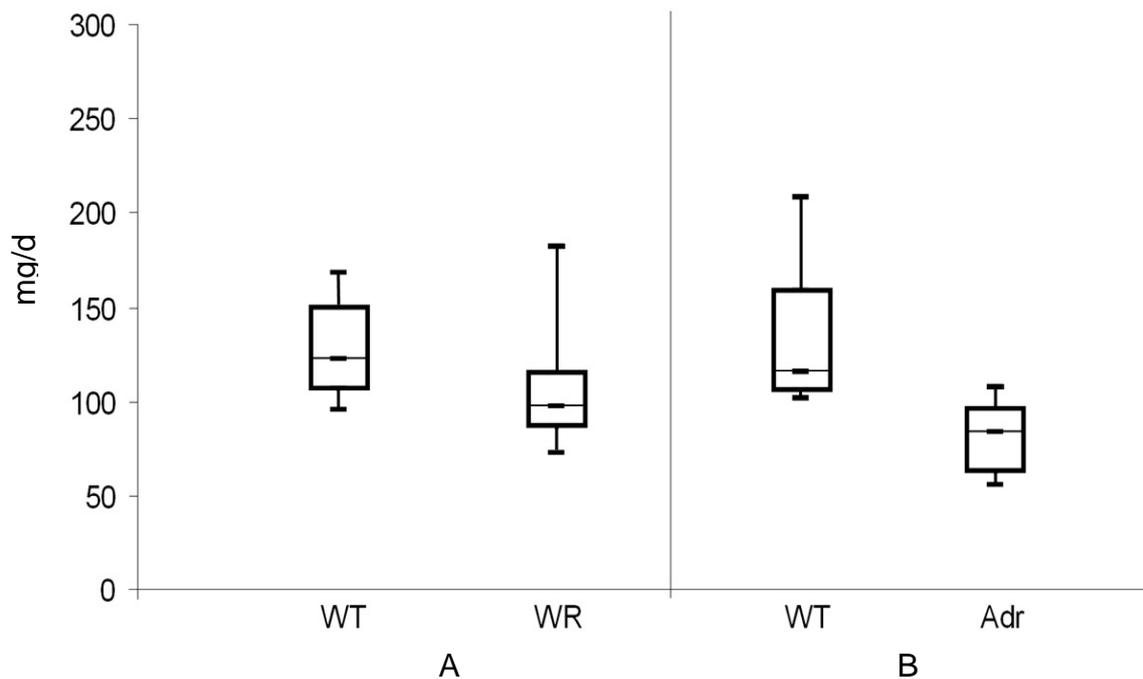


Abb.3.3: Blutglukosewerte von Wobbler- und Adr-Mäuse

Die Glukosemengen im Blut wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten über mehrere Tage ermittelt. Die Messungen wurden immer zur gleichen Zeit an denselben Tieren durchgeführt. Die Signifikanz wurde durch einen t-Test ermittelt und betrug für die Wobbler-Mäuse 0,0224 und für die Adr-Mäuse 0,000607, n=20.

Die Wobbler-Mäuse zeigen insgesamt einen leicht niedrigeren Glukosegehalt als die jeweiligen Wildtypen, aber eine deutlich größere Streuung der einzelnen Werte. Die Maximalwerte übersteigen die der Wildtypen (A). Die Adr Mäuse leiden an einer Myotonie und sind wie die Wobbler-Tiere nicht in der Lage zu greifen. Die Glukosewerte der Adr-Mäuse sind niedriger als die der Wildtypen. Eine wie bei den Wobbler-Mäusen vorliegende Streuung der Werte ist bei diesen Mutanten nicht zu erkennen (B).

Obwohl die Wobbler-Mäuse keine gravierende Reduktion der Glukosegehalt im Blut aufweisen, die eine Unterversorgung bedeuten würde, sind die Schwankungen der Glukosewerte weder durch die Atrophie der Vorderbeine und einer daraus resultierenden schlechteren Nahrungsaufnahme, den schlechten Allgemeinzustand der Tiere noch mit den haltungsbedingten Zufütterungen zu erklären. Unklar ist, ob es sich bei diesem Phänotyp ähnlich wie bei der Futterakkumulation im Magen um

Auswirkungen der Wobbler-Mutation auf andere Gewebe als die Motoneuronen und den Testis handelt.

3.2.2 Metabolomanalyse des Testis

Um einen besseren Einblick in die Wobbler-Pathologie zu erhalten, sollte parallel zu einem laufenden Microarray-Experiment zur Analyse von Fehlregulierungen auf RNA-Ebene (Dissertation Drepper, 2005) auch die Protein- und im Besonderen die Metabolitmengen in den von der Wobbler-Pathologie betroffenen Geweben, Rückenmark und Testis, untersucht werden. Es wurden von unserem Kooperationspartner (Aiko Barsch, Universität Bielefeld, Center for Biotechnology, Molecular Phytopathology) ein Metabolomscreening durchgeführt, um einen besseren Einblick in den Krankheitsmechanismus und seine Auswirkungen auf die Metabolite zu erhalten. Dafür wurde die Gewebe lyophilisiert und das Trockengewicht ermittelt. Die Metabolite wurden mit 80% Methanol extrahiert und in einem TraceGC Gaschromatograph gekoppelt an ein PolarisQ Massenspektrometer analysiert (Barsch et al. 2004). Meines Wissens nach ist dies die erste Metabolomuntersuchung einer Globozoospermie der Maus. Auch beim Menschen sind bisher keine derartigen Untersuchungen durchgeführt worden.

Um einen Einblick in den zeitlichen Ablauf und eine Gewichtung der Veränderungen auf Metabolitenebene zu erhalten, wurden Wobbler-Mäuse und Kontrolltiere zu zwei verschiedenen Zeitpunkten untersucht, im Alter von 21 und 49 Tagen. Im Alter von 21 Tagen zeigen sich die ersten Anzeichen der Wobbler-Erkrankung durch einen Tremor des Kopf- und Halsbereiches und einen Kraftverlust in den Vorderpfoten. Ein Spermatogenesedefekt kann man zu diesem Zeitpunkt noch nicht beobachten, da diese erst nach ca. 28 Tagen beginnt. Im Alter von 21 Tagen liegen lediglich Typ B Spermatogonien vor, welche noch vor der ersten meiotischen Teilung stehen und so noch keinen nachweisbaren Defekt entwickelt haben. Im Alter von 49 Tagen sind die Männchen geschlechtsreif, der Spermatogenesedefekt kommt so voll zum tragen. Im Testis sind zu diesem Zeitpunkt alle Entwicklungsstadien der Spermatogenese vorhanden, da die Reifung der Spermien nicht synchron, sondern in so genannten spermatogenen Wellen verläuft.

Im Alter von 21 Tagen ist eine signifikante Veränderung der Menge von drei Metaboliten im Testis zu finden, nämlich Alpha-Ketoisocaproate, Homoserin und

Adenin (Abb.3.4). Alpha-Ketoisocaproate ist die Keto-Säure des Isoleucins und ist im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert. Es wird ausschließlich in den Mitochondrien synthetisiert, stimuliert die Insulinausschüttung und hat inhibitorische Wirkung auf ATP-regulierte Kalium Kanäle (*KATP*-Kanäle) (Hutton et al., 1980; Bränström et al., 1998). Neben Glukose ist Alpha-Ketoisocaproate das einzige Substrat, das eine Insulinausschüttung induzieren kann (Gao et al., 2003). Homoserin ist der einzige Metabolit, der eine Erhöhung zeigt und zwar um den Faktor 2,7. Homoserin, eine nicht-proteinogene, polare Aminosäure, stellt ein Bindeglied im Stoffwechsel des Glycins, Serins und Threonins, des Methionins und Schwefels und der Lysin-Biosynthese dar. Die Purinbase Adenin findet sich außer im Purinstoffwechsl noch im Arginin und Proline Metabolismus und liegt im Testis stark reduziert vor. Es ist der am stärksten Veränderte Metabolit des Testis.

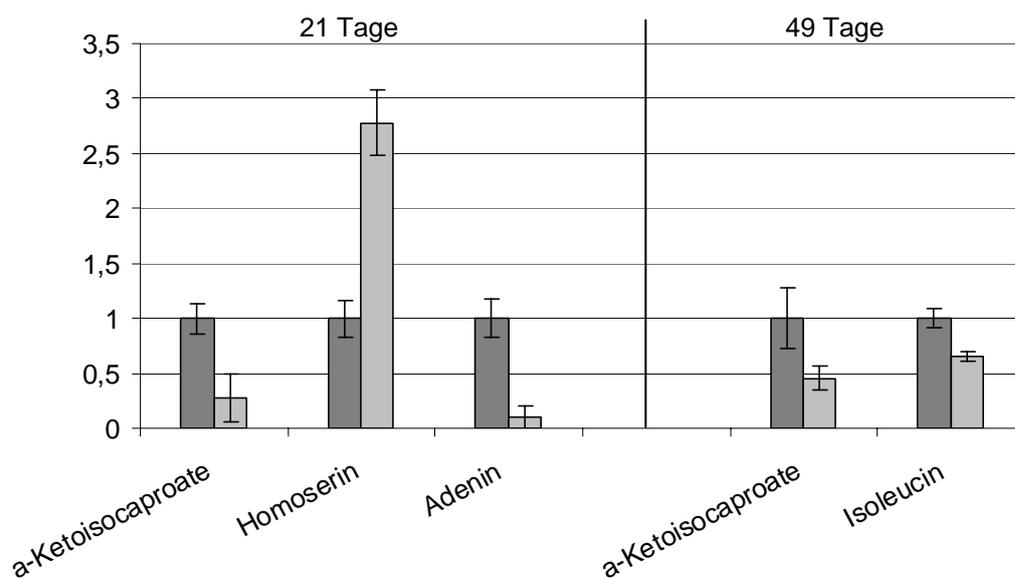


Abb.3.4: Metabolomanalyse des Testis von 21 und 49 Tagen alten Tieren

Die Metabilmengen wurden von in den Testis-Geweben von je drei Wildtyp- und drei Wobblers-Mäusen im Alter von 21 und 49 Tagen bestimmt. Die Mittelwerte der Wildtypen wurden auf eins normiert (dunkelgraue Balken) und die Mittelwerte der Wobblers-Mäuse (hellgraue Balken) dazu in Relation gesetzt. Als Fehler ist der Standardfehler angegeben. Die Signifikanz wurde mittels t-Test bestimmt und betrug im Alter von 21 für Alpha-Ketoisocaproate 0,05628, für Homoserin 0,01218 und für Adenin 0,01776. Im Alter von 49 Tagen betrug die Signifikanz für Alpha-Ketoisocaproate 0,05603, und für Isoleucin 0,04475.

Im Alter von 21 Tagen sind die Purinbase Adenin, die Aminosäuren Homoserin und Alpha-Ketoisocaproate verändert. Homoserin ist der einige Metabolit, der im Testis der Wobblers-Männchen erhöht vorliegt und Adenin der am stärksten Veränderte. Im Alter von 49 Tagen liegt Alpha-Ketoisocaproate weiterhin reduziert vor. Die anderen veränderten Metabolite im Alter von 21 Tagen finden sich später nicht mehr wieder. Weiterhin ist mit 49 Tagen Isoleucin reduziert.

Im Alter von 49 Tage findet sich nur einer der veränderten Metabolite wieder, nämlich Alpha-Ketoisocaproate, das weiterhin reduziert vorliegt. Außerdem ist noch Isoleucin verändert (Abb.3.4). Alle weisen wie Alpha-Ketoisocaproate eine Reduktion auf. Isoleucin, ein Konstitutionsisomere des Leucins, gehört zu den essentiellen proteinogenen Aminosäuren aus der Aspartatfamilie und den verzweigtkettigen Aminosäuren (engl. *branched chain amino acids*, BCAA). Diese Aminosäuren werden zumeist nicht wie die meisten anderen Aminosäuren über die Leber sondern direkt aufgenommen.

Die Anzahl der veränderten Metabolite ist relativ gering, bei einer ähnlichen Untersuchung des Rückenmarks der Wobbler-Tiere (laufendes Projekt) wurden im Alter von 49 Tagen fünf Mal so viele veränderte Metabolite gefunden wie im Testis gleichen Alters. Da aber nur die letzten Stadien der Spermatogenese einen Defekt aufweisen und man daher von milden Defekt sprechen kann, ist die Anzahl der Zellen, die einen Defekt aufweisen, klein, verglichen mit der Anzahl nicht betroffener Zellen im Testis. Dies könnte die geringe Anzahl an veränderter Metabolite erklären. Die Motoneuronen weisen im Vergleich einen deutlich drastischeren Phänotyp auf. Zudem sind die betroffenen Spermatozyten im Verhältnis zu den restlichen Zellen im Testis noch stärker unterrepräsentiert als es bei den Motoneuronen im Rückenmark der Fall ist. Daher ist ein Verdünnungseffekt nicht auszuschließen.

Es fällt ebenso auf, dass die meisten und die am stärksten veränderten Metabolite aus dem Aminosäurestoffwechsel stammen. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch für das Rückenmark der Wobbler-Mäuse gemacht (laufendes Projekt). Im Testis scheint besonders der Stoffwechselweg des Isoleucins betroffen zu sein, da sich neben dem Isoleucin auch Alpha-Ketoisocaproat unter den veränderten Metaboliten befindet. Ob es sich dabei um einen für die Wobbler-Mutation typischen Effekt handelt, ist bisher nicht geklärt. Die meisten der bisher veröffentlichten Metabolomuntersuchungen wurden an Blutseren durchgeführt und sind daher nur bedingt mit den Daten aus ganzen Geweben zu vergleichen. Eine Analyse des Testis ist nicht in der Literatur zu finden.

3.3 Vimentinablagerung in den Motoneuronen

In Microarray-Experimenten wurde auf RNA-Ebene von Rückenmarksproben unter anderem eine Erhöhung von *Vimentin* (*Vim*) gefunden, welches in Quantitativer Real-

Time-PCR Untersuchungen die größte Fehlregulierung von allen Genen aufwies (Drepper, 2005). Vimentin ist eines des am weitesten verbreiteten Intermediäfilaments innerhalb der zytoplasmatischen Filamenten und ist in den meisten Zellen mit mesenchymalen Ursprung exprimiert. Für die Wobbler-Maus sind, wie im Zusammenhang mit vielen neurodegenerativen Erkrankungen, Proteinakkumulationen und -ablagerungen in den Motoneuronen beschrieben, von z.B. Neurofilament mittlere Kette (Nfm) und Amyloid Precursor Protein (APP) (Boillee et al., 2003; Diplomarbeit Schlitek 2004). Um eine mögliche Akkumulation von Vimentin auf Proteinebene zu überprüfen wurden Antikörper-Doppelfärbung gegen Vimentin und Neurofilament mittlere Kette an Gefrierschnitten des zervikalen Rückenmarks gemacht.

In den Motoneuronen der Wobbler-Mäuse sind deutlich größere, punktförmige Ablagerungen von Vimentin zu erkennen, die nicht bei Wildtypen vorhanden sind. Die Ablagerungen verteilen sich gleichmäßig über das Perikarion der Zelle und akkumulieren weder in größeren Aggregaten, noch in einem bestimmten Bereich des Zellesomas (Abb3.5). Eine starke Anfärbung von Vimentin findet sich in den Axonen der jeweiligen Motoneuronen der Wobbler-Mäuse, bei Wildtypen konnte keine vergleichbare starken Anfärbung in den Axonen nachgewiesen werden (Abb.3.5, B₁, B₃).

Neben Vimentin akkumulieren auch Neurofilament in den Motoneuronen, die sich aber hauptsächlich in der Nähe des Kerns befinden (Abb3.5, B₂, B₃). Dies konnte schon in anderen Arbeiten sowohl mittels Antikörperfärbungen als auch durch EM-Aufnahmen bestätigt werden (Daten nicht veröffentlicht).

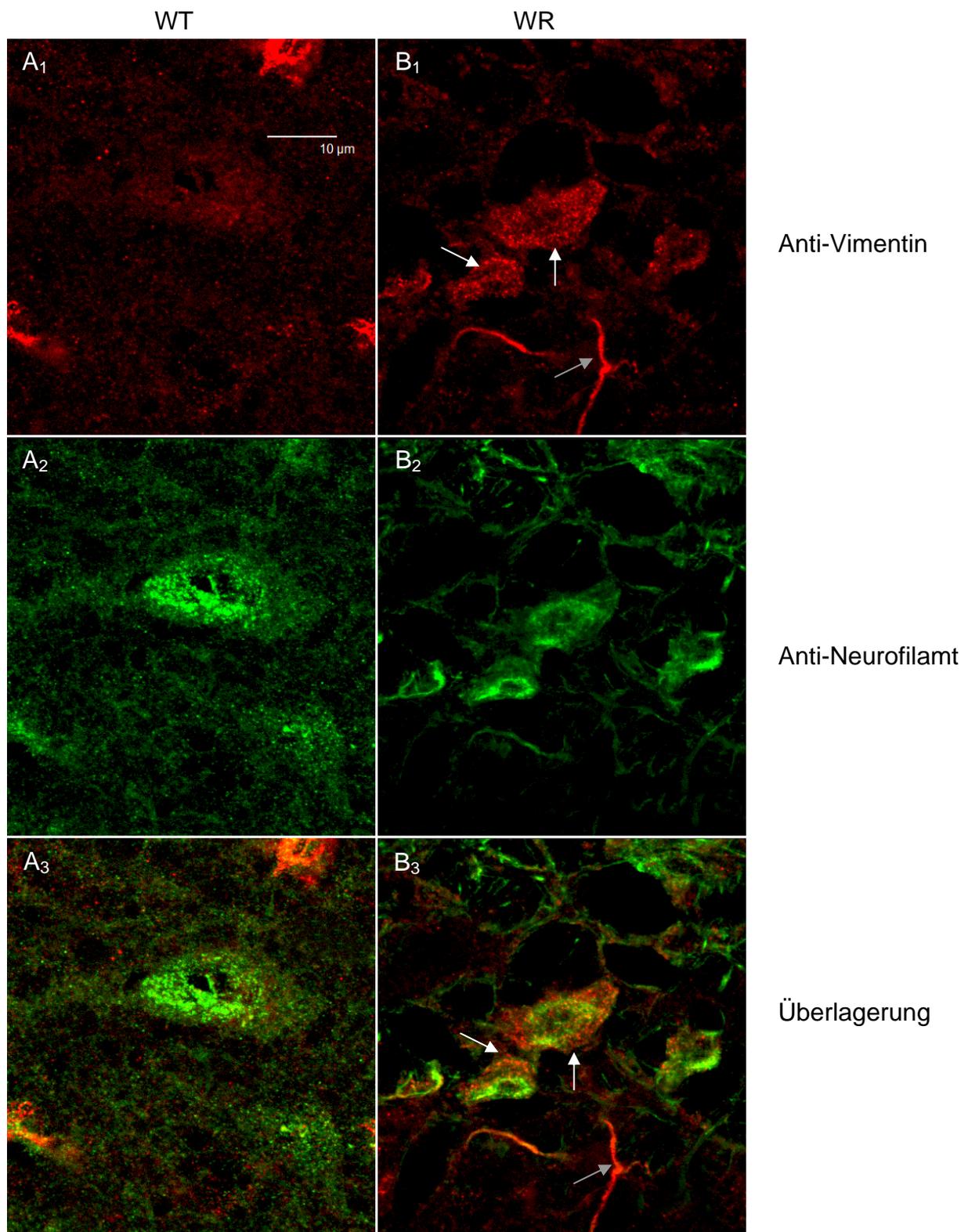


Abb.3.5: Vimentin-Akkumulationen in den Motoneuronen der Wobbler-Maus

Confokale Laserscanning Mikroskopopafnahmen von Antikörper-Färbung gegen Vimentin (rot, A₁, B₁) und Neurofilament mittlere Kette (grün, A₂, B₂) an Gefrierschnitten des ventralen Vorderhorns des zervikalen Rückenmarks von Wildtyp-Tieren (A) und Wobbler-Tieren (B). Die Aufnahmen wurden am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) mit gleicher Laserintensität erzeugt.

In den Motoneuronen der Wobbler-Mäuse sind deutliche Ablagerungen von Vimentin zu erkennen (weiße Pfeile) so wie auch in den Axonen (grauer Pfeil), in denen die Signale besonders stark sind. Im Gegensatz zu Neurofilament finden sich die Ablagerungen von Vimentin über das ganze Zellsoma verteilt. Neurofilament dagegen akkumuliert eher in der Nähe des Kerns, was schon in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte.

3.4 BAC-Kompensation des Wobbler-Phänotyps

Um zu überprüfen, ob die im Gen *Vps54* gefundene Punktmutation die Wobbler-Pathologie bedingt, wurde eine BAC-Kompensation (*transgenic rescue*) durchgeführt. Hierzu wurde ein BAC (*bacterial artificial chromosome*), der die Wildtyp-Variante von *Vps54* trägt, in befruchteten Eizellen injiziert und diese in pseudo-schwangere Leihmütter gebracht. Die Nachkommen dieser Tiere wurden hinsichtlich des Vorhandenseins des Transgens untersucht.

Der ausgewählte BAC, BAC115F6, enthält den Bereich zwischen den Genen *Peli1* und *Ugp2*, der alle annotierten Exons von *Vps54* und stromaufwärts vom ersten Exon einen ca. 10 kb großen Bereich trägt. Dieser Bereich enthält höchstwahrscheinlich den Kernpromoter und könnte auch andere regulatorische Elemente enthalten (Drepper, 2005).

Der BAC115F6 wurde von unserem Kooperationspartner (Dr. M. Meisler, Institute of Human Genetics, Ann Arbor, Michigan, USA) mit *PvuI* gespalten, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und das Fragment, welches *Vps54* trägt, aufgereinigt. Dieses Fragment wurde in befruchtete Eizellen aus einer Hybridlinie der Stämme SJL und C57/BL6 injiziert und von Leihmüttern ausgetragen. Unter den Nachkommen wurden diejenigen ausgewählt bei denen man die beiden BAC-Enden mittels einer etablierten PCR-Diagnostik nachweisen konnte (Drepper, 2005). Von diesen Tieren wurden 6 Männchen nach Bielefeld versandt und mit heterozygoten BL6-*wr* Weibchen (*wr/+*) verpaart. Nachkommen aus dieser Verpaarung wurden hinsichtlich der BAC-Enden und des *wr*-Allels durch CcT4-Diagnostik genotypisiert. Heterozygote *wr/+* und BAC115F6-transgene F₁-Tiere wurden miteinander zur F₂-Generation verpaart.

3.4.1 Etablierung von BAC-transgenen Zuchtlinien

Alle 5 männlichen Founder wurden zwischen drei- und achtmal mit heterozygoten (*wr/+*) C57/BL6-*wr* Weibchen verpaart. Dabei wurden zwischen 18 und 75 Nachkommen jedes Founder-Männchens hinsichtlich ihrer Genotypen diagnostiziert. Dabei stellte sich heraus, dass nicht die nach der mendelschen Verteilung erwarteten 50% transgen für den BAC115F6 Nachkommen erreicht wurde (Tab.3.1). Für die weiteren Verpaarungen wurden BAC115F6-transgene (*tg*) Tiere verwendet, die ebenfalls das Wobbler-Allel (*wr*) aufwiesen).

| Founder-Männchen-Nr. | Nachkommen gesamt | Wildtypen (+/+) | BAC-transgen (tg) | %-Anteil BAC-transgen |
|----------------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------------|
| 522 | 32 | 22 | 10 | 31,25 |
| 577 | 75 | 57 | 18 | 24 |
| 586 | 42 | 34 | 8 | 19,05 |
| 590 | 44 | 30 | 14 | 31,82 |
| 601 | 18 | 11 | 7 | 38,89 |

Tab. 3.1: Genotypverteilung der BAC-transgenen Zuchtlinien

Anteil der transgenen Nachkommen aus allen Verpaarungen der einzelnen Founder-Männchen. Bei der Verpaarung konnten von fünf der sechs Founder-Männchen Nachkommen erzeugt werden, die transgen für das BAC115F6 sind. Der Anteil der transgenen Tiere entsprach nicht der erwarteten mendelschen Verteilung.

3.4.2 Gewichts- und Kraftmessung

Für die Wobbler-Erkrankung sind drei optisch deutlich sichtbare Phänotypen beschrieben. Zum einen eine deutliche Gewichtsreduktion von ca. 40% im Vergleich zu Wildtypen und zum anderen eine durch die Atrophie verursachte Kraftverlust in den Vorderbeinen und ein Tremor des Kopf- und Schulterbereiches (Falconer, 1956). Trotz unterschiedlicher Stammhintergründe wurden diese drei Phänotypen für die Wobbler-Mutation immer wieder in der Literatur beschrieben und daher können diese Phänotypen als charakteristisch für die Wobbler-Mutation angesehen werden. Aus diesem Grund wurden die Gewichts- und Kraftentwicklung der *wr/wr* BAC115F6-transgenen Tiere (*wr/wr* tg) gemessen. Um auszuschließen, dass der eingebrachte BAC115F6 Auswirkung auf den Phänotyp der Tiere durch eine Erhöhung der Kopienzahl des Gens *Vps54* hat, wurden neben Wildtypen, Wobbler- und BAC-transgenen Wobbler-Tieren auch BAC-transgenen Wildtypen (+/+ tg) betrachtet. Es wurden Würfe mit einer Jungenanzahl zwischen fünf und achten Jungtieren ausgewählt und ab dem zehnten Tag post Natal alle zwei Tage Gewichts- und Kraftmessungen an den Tieren durchgeführt.



Abb.3.6: Größenvergleich zwischen Wildtypen (+/+), Wobbler- (*wr/wr*) und BAC-transgenen Wobbler-Mäusen (*wr/wr tg*)

Optischer Vergleich zwischen +/+, *wr/wr* und *wr/wr tg* Tieren. Im Alter von 49 Tagen sind optisch keine Unterschiede zwischen BAC-transgenen Wobbler-Mäusen und Wildtypen zu erkennen. Beide sind in der Lage mit den Vorderbeinen zu greifen und weisen keinen Tremor auf. Die Wobbler-Tiere hingegen zeigen eine deutliche Gewichtsreduktion, einen Tremor und die Atrophie der Vorderbeine.

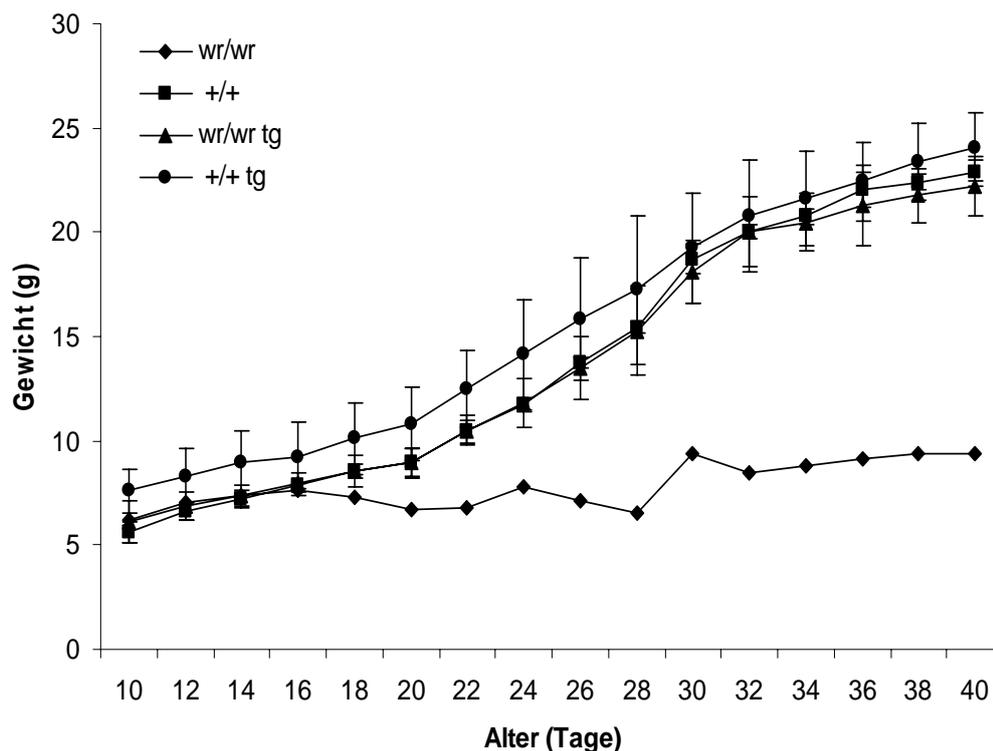


Abb.3.7: Gewichtsmessung der männlichen Tiere

Die Gewichtsmessungen wurden ab Tag 10 p.n. von allen Tieren aus Würfen durchgeführt bei denen die Wurfgrößen zwischen fünf und acht Jungtieren lagen (für +/+, *wr/wr tg* und +/+ tg n=5, für *wr/wr* n=1).

Die *wr/wr tg* Tiere zeigen die gleiche Gewichtsentwicklung wie die Wildtypen. Die Gewichtsentwicklung der +/+ und +/+ tg Tiere verläuft unabhängig vom BAC115F6. Alle Tiere weisen die gleiche Gewichtszunahme und Endgewicht auf. Die Wobbler-Mäuse (*wr/wr*) zeigen dagegen die typische Gewichtsreduktion beginnend mit ca. 18 Tagen.

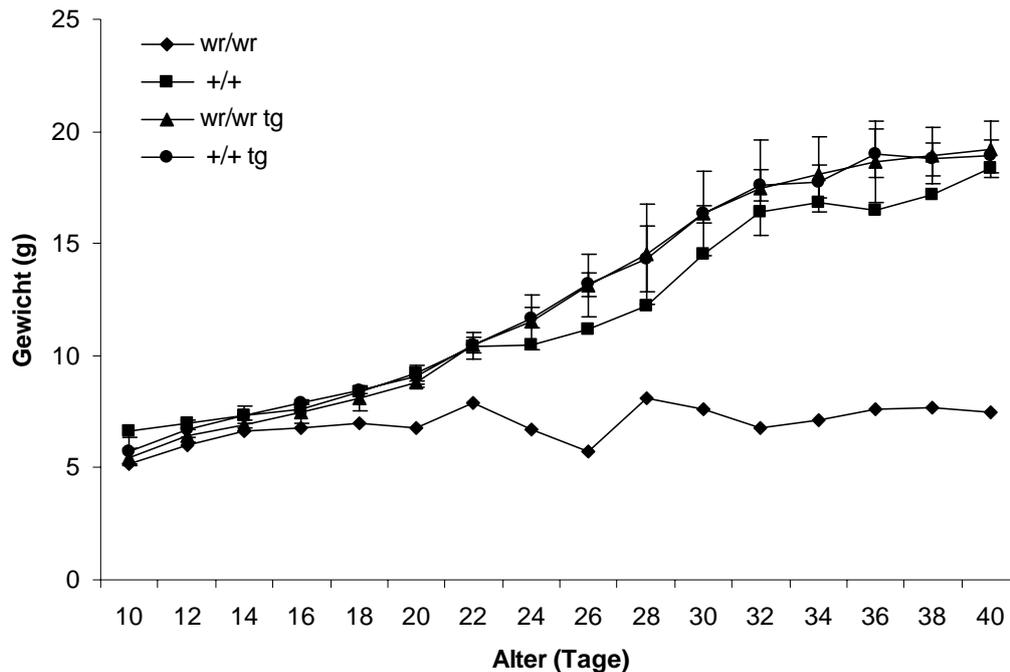


Abb.3.8: Gewichtsmessungen der weiblichen Tiere

Die Gewichtsmessungen wurden ab Tag 10 p.n. von allen Tieren aus Würfen durchgeführt bei denen die Wurfgrößen zwischen fünf und acht Jungtieren lagen (für +/+, wr/wr tg und +/+ tg n=5, für wr/wr n=1).

Die wr/wr tg Tiere zeigen die gleiche Gewichtsentwicklung wie die Wildtypen. Die Gewichtsentwicklung der +/+ und +/+ tg Tieren verläuft unabhängig vom BAC115F6. Alle Tiere weisen die gleiche Gewichtszunahme und Endgewicht auf. Die Wobblers-Mäuse (wr/wr) zeigen dagegen die typische Gewichtsreduktion beginnend mit ca. 18 Tagen. Im Vergleich zu den Männchen ist lediglich das Gesamtgewicht geschlechtsbedingt niedriger.

Sichtbar sind vom Phänotyp keine Unterschiede zwischen Wildtypen und wr/wr tg Tieren zu erkennen, beide weisen im Gegensatz zu Wobblers-Tieren weder eine Gewichtsreduktion, ein Tremor oder eine Atrophie der Vorderbeine auf (Abb.3.6). Unterschiede in der Gewichtsentwicklung sind nicht vorhanden (Abb.3.7 und Abb.3.8). Die normalen, geschlechtsspezifischen Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen sind vorhanden. Die Wobblers-Tiere aus den getesteten Würfen zeigen die typische Gewichtsreduktion, die ab dem zwanzigsten Tag einsetzt. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt ist weder kein Tremor der Kopfregeion zu beobachten noch größerer Kraftverlust. Der BAC115F6 hat keine Auswirkungen auf das Gewicht oder die Gewichtszunahme der Tiere, die kein Wobblers-Allel tragen (+/+), da es keine Unterscheide zwischen +/+ BAC-tg und +/+ Tieren gibt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt haben die Tiere ein Alter von 20 Monaten erreicht und es konnte keine Gewichtszu- oder -abnahmen im Vergleich zu Wildtypen festgestellt werden. Die Kompensation

der Gewichtsreduktion durch die Wobbler-Erkrankung ist durch den Vps54 tragenden BAC115F6 vollständig erfolgt.

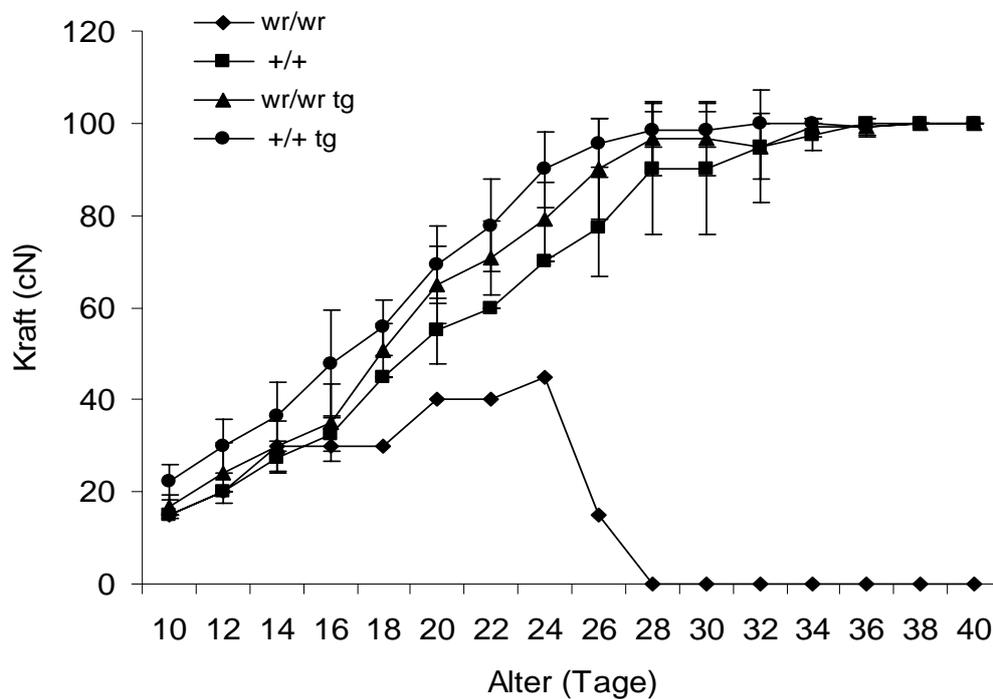


Abb.3.9: Kraftmessungen der männlichen Tiere

Die Kraftmessungen wurden ab dem Tag 10 p.n. von allen Tieren aus Würfen durchgeführt bei denen die Wurfgrößen zwischen fünf und auch Jungtieren lagen (für +/+, wr/wr tg und +/+ tg n=5, für wr/wr n=1).

Die Kraftzunahme verläuft bei wr/wr tg und +/+ Tiere gleich, ebenso für +/+ tg Tiere. Die Zunahme an Kraft ist bei Wobbler-Mäusen ca. ab dem 18 Tag im Vergleich zum Wildtyp reduziert, aber generelle Kraftzunahme ist bis um den 22-24 Tag weiter festzustellen. Ab dem 24 Tag verlieren die Wobbler-Tiere sehr deutlich an Kraft und ab 28 Tagen ist keine Greifkraft mehr vorhanden.

Parallel zu den Gewichtsmessungen wurde von allen Tieren die Greifkraft der Vorderbeine gemessen um den zweiten für Wobbler-Erkrankung typischen augenscheinlich sichtbaren Phänotyp zu überprüfen. Sowohl transgenen Wobbler-Mäuse (wr/wr tg) als auch transgenen Wildtypen (+/+ tg) zeigen keine Unterschiede in der Greifkraft zu Wildtypen. Auch die Kraftentwicklung verläuft ohne signifikante Unterschiede. Die Wobbler-Tiere hingegen verlieren mit zunehmender Atrophie der Vorderbeine innerhalb kurzer Zeit die Kraft zu greifen. Durch die fortschreitende Atrophie sind die Tiere nicht mehr in der Lage Greifbewegungen jedweder Art durchzuführen, was zu einer totalen Reduktion der Kraft auf Null führt. Einige Tage vor der drastischen Reduktion der Greifkraft auf Null lässt sich eine verminderte Zunahme an Gewicht für die Wobbler-Mäuse zeigen (Abb.3.7, 3.8, 3.9 und 3.10). Die Gewichtsreduktion lässt sich um den achtzehnten Tag nachweisen, wohingegen die

drastische Reduktion der Greifkraft zwei bis vier Tage später einsetzt. Zeitlich korreliert diese Entwicklung mit den ersten Degenerationen in den Motoneuronen.

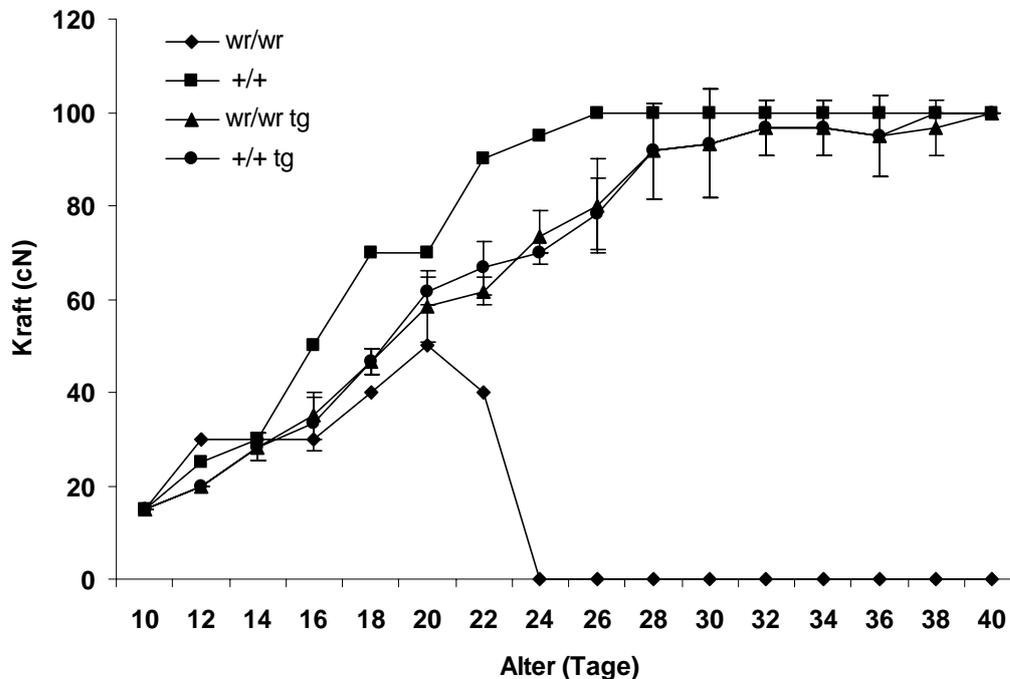


Abb.3.10: Kraftmessung der weiblichen Tiere

Die Kraftmessungen wurden ab dem Tag 10 p.n. von allen Tieren aus Würfen durchgeführt bei denen die Wurfgrößen zwischen fünf und acht Jungtieren lagen (für +/+, wr/wr tg und +/+ tg n=5, für wr/wr n=1).

Die Kraftzunahme verläuft bei wr/wr tg und +/+ gleich, ebenso für die +/+ tg Tiere. Die Zunahme an Kraft ist bei Wobbler-Mäusen ca. ab dem 16 Tag im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert, aber generelle Kraftzunahme ist bis um den 20 Tag weiter festzustellen. Ab dem 22 Tag verlieren die Wobbler-Tiere sehr deutlich an Kraft und ab 24 Tagen ist keine Greifkraft mehr vorhanden.

Da die transgenen Wobbler-Mäuse keine Reduktion der Greifkraft aufweisen und die Entwicklung der, der Wildtypen entspricht, kompensiert der *Vps54* tragende BAC ebenfalls den durch die Wobbler-Erkrankung ausgelösten Kraftverlust in den Vorderbeinen. Die Tiere zeigen bis zum jetzigen Zeitpunkt, im Alter von 20 Monaten, keine Unterschiede in der Kraft im Vergleich zu Wildtypen.

Der zwischen der dritten und vierten Woche auftretende Tremor der Wobbler-Mäuse konnte bei keinem der BAC-transgenen Tiere beobachtet werden, während er bei den Wobbler-Tieren deutlich zu erkennen war.

Die sichtbaren Phänotypen der Wobbler-Maus, Gewichts- und Kraftreduktion so wie Tremor des Hals- und Schulterbereiches, werden durch den BAC115F6 vollständig und dauerhaft kompensiert.

3.4.3 Histologische Untersuchung des zervikalen Rückenmarks

Neben einer drastischen Gewichtsreduktion, Tremor und dem Kraftverlust in den Vorderextremitäten der Wobbler-Mäuse lässt sich auf histologischer Ebene eine Motoneurondegeneration, eine Astroglie und eine Mikroglie im Rückenmark und Stammhirn als typisches Zeichen der Wobbler-Pathologie beobachten (Rathke-Hartlieb et al., 1999). Die BAC-transgenen Wobbler-Mäuse haben zwar keinen äußerlich sichtbaren Phänotyp der Wobbler-Erkrankung, dieses schließt aber eine Veränderung im Rückenmark nicht vollständig aus. Aus diesem Grund wurden Gefrierschnitte des ventralen Vorderhorns des zervikalen Rückenmarkes angefertigt. Es wurden Nissl-Färbungen, so wie GFAP- und CD45- Antikörper-Färbungen angefertigt, um die eventuell vorhandenen Neurodegeneration, Mikro- und Astroglia-Aktivierung nachzuweisen.

Bei den Wobbler-Tieren sind durch die Nissl-Färbung die deutlich degenerierenden Motoneurone, die sich in unterschiedlichen Stadien der Degeneration befinden, zu erkennen. In Abb.3.11, B₁ sind die typischen „Ghosts“ zu sehen, die ein klares Zeichen für ein späteres Stadium der Degeneration markieren. Die bei Degenerationen typische Auflösung des Zellkerns konnte ebenfalls in den Schnitten der Wobbler-Tiere nachgewiesen werden. Eine Motoneurondegeneration ist bei den BAC-transgenen Wobbler-Mäuse nicht zu erkennen, „Ghost“ oder sich auflösende Kern sind in den Schnitten nicht zu finden. Vielmehr entsprechen die BAC-transgenen Wobbler-Mäusen den Wildtypen, die ebenfalls keine Degeneration aufweisen (Abb.3.11, A₁, B₁, C₁).

Die GFAP-Färbung zeigt bei den Wobbler-Mäusen eine starke Aktivierung der Astroglia, was auf inflammatorische Prozesse hindeutet. Inflammatorische Prozesse sind eine typische Reaktion in neuronalen Geweben auf degenerative Prozesse. Die Aktivierung der Astroglia wird gefolgt von einer Poliferation. Die BAC-transgenen Wobbler-Mäuse zeigen wie die Wildtypen keine derartige Aktivierung der Astroglia und entsprechen dem Wildtyp (Abb.3.11, A₂, B₂, C₂).

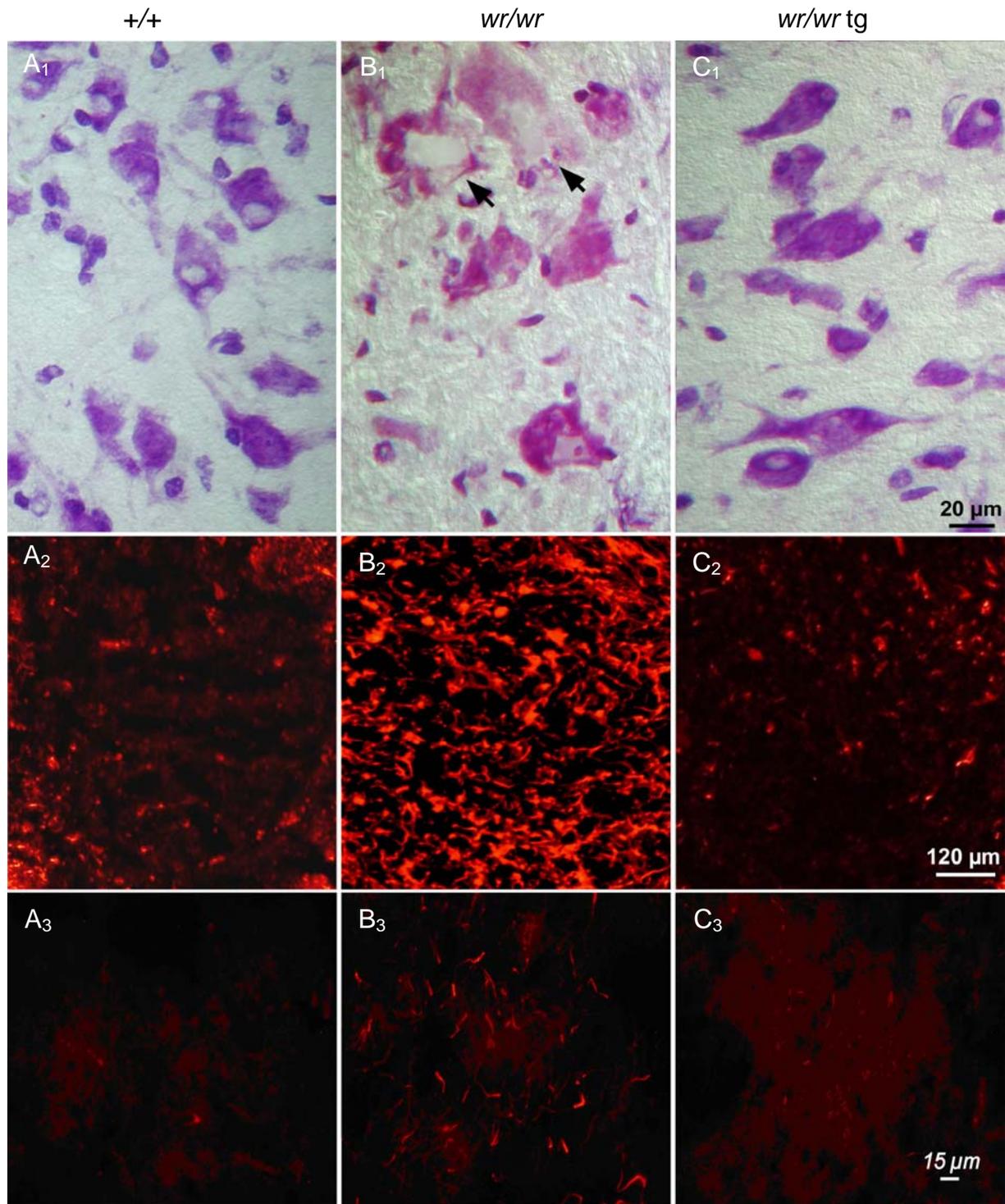


Abb.3.11: Histologische Untersuchung des Rückenmarks

Gefrierschnitte des ventralen Vorderhorns des zervikalen Rückenmarks mit Nissel-Färbung (A₁, B₁, C₁), und Antikörper-Färbung mit GFAP (A₂, B₂, C₂) und CD45 (A₃, B₃, C₃) von Wildtypen (+/+, A), Wobbler-Tiere (*wr/wr*, B) und BAC-transgenen Wobbler-Mäuse (*wr/wr tg*, C) im Alter von 49 Tagen. Die schwarzen Pfeile deuten auf absterbende Motoneurone und „Ghosts“ im Rückenmark von *wr/wr*. Die Wobbler-Mäuse zeigen degenerierende Motoneurone und eine starke Aktivierung der Astro- und Mikroglia (B₂, B₃). Zwischen den BAC-transgenen Wobbler-Tieren und den Wildtypen sind keine Unterschiede zu finden.

CD45 ist ein Mikroglia-Marker mit dem somit eine Aktivierung der Mikroglia nachgewiesen werden kann. Eine deutliche Aktivierung der Mikroglia ist bei den Wobbler-Mäusen vorhanden. Ebenso wie die Astro- ist auch die Mikrogliose ein Indikator für inflammatorische Prozesse, wie sie im Rückenmark der Wobbler-Tiere durch die Neurodegeneration ausgelöst werden. Die BAC-transgenen Wobbler-Tiere weisen keine Aktivierung der Mikroglia auf, sondern entsprechen genau wie bei der GFAP-Färbung dem Wildtyp (Abb.3.11, A₃, B₃, C₃).

Durch die histologischen Untersuchungen des ventralen Vorderhorns des zervikalen Rückenmarkes konnte gezeigt werden, dass keine der für die Wobbler-Pathologie typischen Prozesse wie die Motoneurondegeneration, die Astro- oder die Mikrogliose in den transgenen Wobbler-Mäusen nachweisbar sind. Dies korreliert mit der phänotypischen Beobachtung, dass die transgenen Wobbler-Mäuse weder eine Atrophie der Vorderbeine, eine Gewichtsreduktion noch einen Tremor der Kopfregion aufweisen. Der neurologische Phänotyp der Wobbler-Tiere, welcher ursächlich auf die Motoneurondegeneration zurückgeht, konnte durch das *Vps54*-tragenden BAC vollständig und dauerhaft kompensiert werden.

3.4.4 Spermatogenese und Fertilität

Neben dem neurologischen Phänotyp der Wobbler-Maus ist für die männlichen Tiere ein Spermatogenesedefekt beschrieben, der sich als Globozoospermie äußert, der eine Penetranz von 100% aufweist. Die typische Sichel- oder Papageienschnabelform des Kopfes bei Wildtypspermien ist bei Wobbler-Spermien nicht vorhanden. Die aus dem Golgi-Apparat hervorgehenden Akrosomenvesikel lagern sich nicht an den Zellkern an. Die Abflachung des Kerns tritt nicht ein und häufig verbleiben Zytoplasmareste am Kopf der Spermien zurück, da diese nicht abgespalten werden (Heimann et al., 1991). Aufgrund des fehlenden Akrosoms sind die Spermien nicht in der Lage eine Eizelle zu befruchten. Die Spermien können im Phasenkontrast am Lichtmikroskop beurteilt werden, da die Globozoospermie deutlich zu erkennen ist. Um die Frage zu klären, ob der BAC115F6 nicht nur den neurologischen Phänotyp sondern auch den Spermatogenesedefekt kompensieren kann, wurden die Spermien der BAC-transgenen Wobbler-Männchen untersucht und Testverpaarungen durchgeführt.

Die aus dem *Ductus deferens* ausgespülten Spermien der BAC-transgenen Wobbler-Tiere weisen die typische Sichelform der Köpfe auf und zeigten die gleiche Mobilität und auch die gleiche Spermienanzahl (Daten nicht gezeigt). Die Spermatogenese verläuft auch bei Wildtypen selten vollständig fehlerfrei, so dass 1-5% defekte Spermien auch bei Wildtypen gefunden werden. Mit Hilfe von Phasenkontrastaufnahmen konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp- und transgenen Wobbler-Spermien gezeigt werden. Eine Nissl-Färbung des Testis zeigt eine normale Entwicklung der Spermien der BAC-transgenen Wobbler-Tiere. Globozoospermie wie bei den Wobbler-Männchen konnte nicht beobachtet werden. Die von Dr. Peter Heimann durchgeführten EM-Aufnahmen des Testis (Schmitt-John et al., 2005) konnten ebenfalls keine Unterschiede auf zellulärer Ebene zwischen den BAC-transgenen Wobbler-Tiere und Wildtypen zeigen.

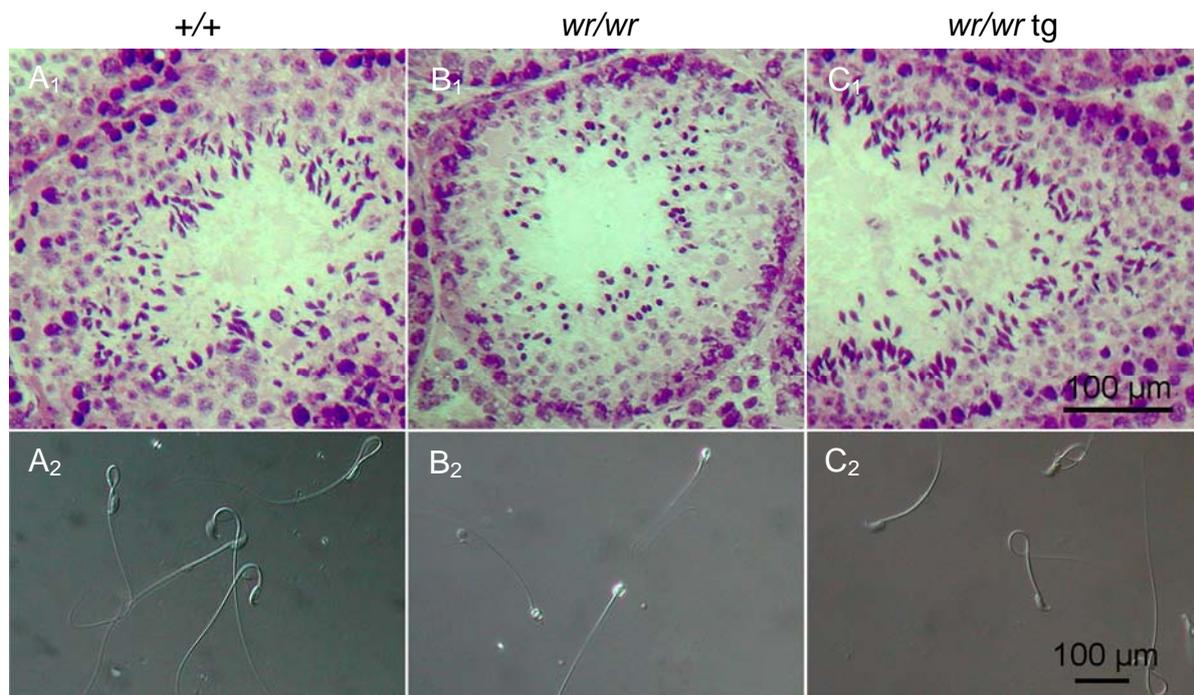


Abb.3.12: Lichtmikroskopische Aufnahmen des Testis und der Spermien

Nissl-Färbung von Gefrierschnitten des Testis (A₁, B₁, C₁) und Phasenkontrastaufnahmen (Normaski) von aus dem *Ductus deferens* ausgespülte Spermien (A₂, B₂, C₂) von 49 Tagen alten Tieren, Wildtyp (+/+), Wobbler-Mäuse (*wr/wr*, B) und BAC-transgenen Wobbler-Tieren (*wr/wr tg*, C).

Die Entwicklung der Spermien der BAC-transgenen Wobbler-Tieren verläuft identisch mit der der Wildtypen. Kopfdefekt oder Mittelstückdefekt wie sie bei Wobbler-Spermien auftreten, sind nicht vorhanden. Alle Köpfe zeigen die typische Sichel- oder Papageienschnabelform.

Um die Fertilität der Spermien der BAC-transgenen Wobbler-Tieren zu überprüfen, wurden 3 männliche Tiere mit C57Bl6 Weibchen und ein BAC-transgenes Wobbler-Weibchen mit einem C57Bl6 Männchen verpaart. Alle transgenen Wobbler-Männchen und das transgenen Wobbler-Weibchen zeugten Nachkommen, deren

Anzahl dem üblichen Durchschnitt innerhalb der Zucht der BAC-transgenen Linie entsprach.

Die Spermien der BAC-transgenen Wobbler-Mäuse sind sowohl morphologisch als auch funktionell intakt und beide Geschlechter sind vollständig fertil. Der Spermatogenesedefekt der Wobbler-Männchen wird demnach ebenso wie die Motoneuronendegeneration vollständig von dem *Vps54*-tragende BAC115F6 kompensiert.

3.5 *Vps54* ^{β -geo}-Allel

Um zweifelsfrei zu klären, ob es sich bei der gefundenen Punktmutation in *Vps54* um die Wobbler Mutation handelt, oder ob das BAC115F6 noch andere bisher unbekannte Gene oder regulatorische Elemente enthält, ist das Gen *Vps54* gezielt ausgeschaltet worden. Von einem unserer Kooperationspartner (Dr. Andreas Lengeling, Abteilung für Infektionsgenetik, GBF Braunschweig) wurde eine ES-Zelllinie RRI497 (Stamm129/Ola) in der BayGenomics Datenbank (BayGenomics, San Francisco, USA; (Stryke et al. 2003)) identifiziert, die einen integrierten β -geo *gene-trap* Vektor trägt. Die Insertionsstelle liegt zwischen dem 5 und 6 Exons von *Vps54* (*Vps54*^{gt(pGT10)2841Ucd}). An der GBF wurde die ES-Zelllinie RRI497 expandiert. Aus schwangeren Tieren des Stammes CB20 wurden Blastozysten gewonnen. In diese wurden die RRI497-ES-Zellen mittels Injektion eingebracht. Die so behandelten Blastozysten wurden in pseudo-schwangere Leihmütter eingebracht und so chimäre Tiere erzeugt. Die Chimären wurden durch Fellfarbunterschiede identifiziert und ihr Chimaritätsgrad abgeschätzt. Identifizierte Chimären wurden nach Bielefeld überführt und die Tiere mit den höchsten Chimaritätsgraden, der zwischen 10 und 15% lag, mit C57BL/6J und (*wr/+*) Mäusen verpaart.

Zur Identifizierung von *gene-trap* Allel-tragender Tiere in der F₁ Generation wurden zu Beginn der Zucht spezifische Primer verwendet, welche spezifische die im *gene-trap* Allel enthaltene LacZ-Kassette erkennen. Aus so identifizierten Tieren konnte DNA gewonnen werden, welche zur genauen Bestimmung der Insertionsstelle diente. Von BayGenomics werden die genauen Insertionsstellen nicht bestimmt, es wird über RACE-Reaktionen die stromaufwärts liegende Exonsequenz ermittelt. In der Dissertation von Carsten Drepper konnte ein PCR-Produkt generiert werden, das mit einer Größe von ca. 950 bp die Insertionsstelle überspannt. Durch die anschließende Sequenzierung konnte der Integrationsort bestimmt werden. Er liegt 369bp stromabwärts des fünften Exons, wobei die ersten 21 bp des Trap-Vektor pGT0lxf fehlen. Mit diesen Informationen konnte eine PCR-Diagnostik etabliert werden, die durch Southern-Blot-Untersuchungen bestätigt wurde. Durch die Southern-Blot-Untersuchungen konnte weiterhin gezeigt werden, dass nur eine β -geo-LacZ-Kassette in das Genom integriert ist (Drepper, 2005).

3.5.1 Expression von *Vps54* und des *Vps54* ^{β -geo}-Allels

3.5.1.1 Analyse der *Vps54* Expression in *Vps54* ^{β -geo}-Tieren

Um sicher zustellen, dass es durch die Integration der β -geo-LacZ-Kassette tatsächlich zu einer vollständigen Ausschaltung des Gens *Vps54* kommt, muss überprüft werden, dass keine *fulllength* mRNAs mehr transkribiert werden. Dazu wurde aus Embryonen vom Embryonaltag 10,5 (E10,5) total RNA aufgereinigt und durch eine reverse Transkriptase in cDNA übersetzt. Mit dieser als Template wurde durch Standard-PCR und Real-Time PCR die mRNA nachgewiesen.

Wie erwartet, waren die beiden kurzen Spließe-Isoformen von *Vps54* nicht von der Integration der LacZ-Kassette betroffen, da der Transkriptionsstart der kurzen Splice-Isoformen nicht von der Integration der LacZ-Kassette betroffen ist. Über eine PCR-Reaktion konnten beide Formen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Für die beiden langen Spließe-Isoformen sollten theoretisch durch die Integration der LacZ-Kassette eine Unterbrechung des Leserasters erzielt werden. Allerdings konnte ich durch Real-Time PCR zeigen, dass noch eine Restaktivität von den langen Spließe-Isoformen vorliegt. Im Vergleich zum Wildtyp ist bei dem *Vps54* ^{β -geo}-mRNA die Expression um den Faktor $6,3 \times 10^4$ reduziert.

Die Integration der LacZ-Kassette stellt also keinen vollständigen knock-out dar, aber bewirkt eine drastische Reduktion der Transkription von *Vps54*. Da bisher kein geeigneter Antikörper zur Verfügung steht, kann keine Aussage über die Auswirkungen des *Vps54* ^{β -geo}-Allels auf Proteinebene getroffen werden.

3.5.1.2 Expression der β -geo-LacZ-Kassette

Durch die Integration der β -geo *gene-trap* Kassette innerhalb eines Gens wird die im Vektor enthaltene LacZ-Kassette abgelesen. Zur Untersuchung der Expression des *Vps54* ^{β -geo}-Allels wurde die LacZ-Kassette von heterozygoten Tieren genutzt, um unterschiedliche Gewebe hinsichtlich der Expression zu klassifizieren. Jedoch ist die Nachweisgrenze der Blau-Färbung durch die LacZ-Kassette relativ hoch im Vergleich zu anderen Methoden, besonders wenn, wie in diesem Fall, das Protein im Zytoplasma lokalisiert ist. Für die Färbungen wurden heterozygote Tiere im Alter von 49 Tagen, Embryonen vom Embryonaltag 10,5 (E10,5) und die entsprechende Plazenta eingesetzt. Von allen Proben wurden Gefrierschnitte angefertigt, eine β -Galaktosidase-Färbung durchgeführt und diese im Lichtmikroskop bewertet.

| Gewebe | Expressionslevel |
|----------------------------|------------------|
| Großhirn | (+) |
| Kleinhirn | + |
| Rückenmark | - |
| Bulbus oculi | - |
| Magen | (+) |
| Dünndarm | ++ |
| Zunge | - |
| Herz | - |
| Skelettmuskel | - |
| Thymus | + |
| Pankreas | + |
| Leber | + |
| Milz | ++ |
| Niere | +++ |
| Lunge | + |
| Leydigschen Zwischenzellen | +++ |
| Embryo E10,5 | - |
| Plazenta E10,5 | - |

Tab.3.2: Expressionsniveau des *Vps54* ^{β -geo}-Allels

An Gefrierschnitten an ausgewählten Geweben von heterozygoten Tieren (*Vps54* ^{β -geo/+}) wurde eine β -Galaktosidase-Färbungen durchgeführt. Die Färbung erfolgte jeweils über Nacht. Die Expressionsniveau des *Vps54* ^{β -geo}-Allels wurden in den verschiedenen Geweben an Hand der Färbung durch die β -Galaktosidase bestimmt. Die Stärke der Färbung wurden eingeteilt in nicht sichtbar (-), sehr schwach ((+)), schwach (+), mittel (++) und stark (+++).

In Geweben, wie Skelettmuskels, Herz, Rückenmark, Zunge, Plazenta, Embryonalstadium E10,5 und dem Bulbus oculi, konnte durch keine Blaufärbung festgestellt werden (Tab.3.2), obwohl in den meisten Fällen auf RNA-Ebene *Vps54* nachgewiesen werden konnte (Hahn 2004). Dies ist vermutlich auf den Umstand zurückzuführen, dass β -Galaktosidase im Zytoplasma lokalisiert ist und nur sehr gering exprimiert wird. Somit kommt es zur Synthese von einer geringen Menge an Enzym und einer zu starken Verdünnung im Zytoplasma. Daher liegt die Färbung in diesen Fällen wahrscheinlich unterhalb der Nachweisgrenze der von mir verwendeten lichtmikroskopischen Methoden. Gerade in den Geweben, in denen nur

eine geringe Anfärbung beobachtet wurde, waren nicht alle Zellen, sondern nur ein Teil der Zellen angefärbt (Abb.3.13).

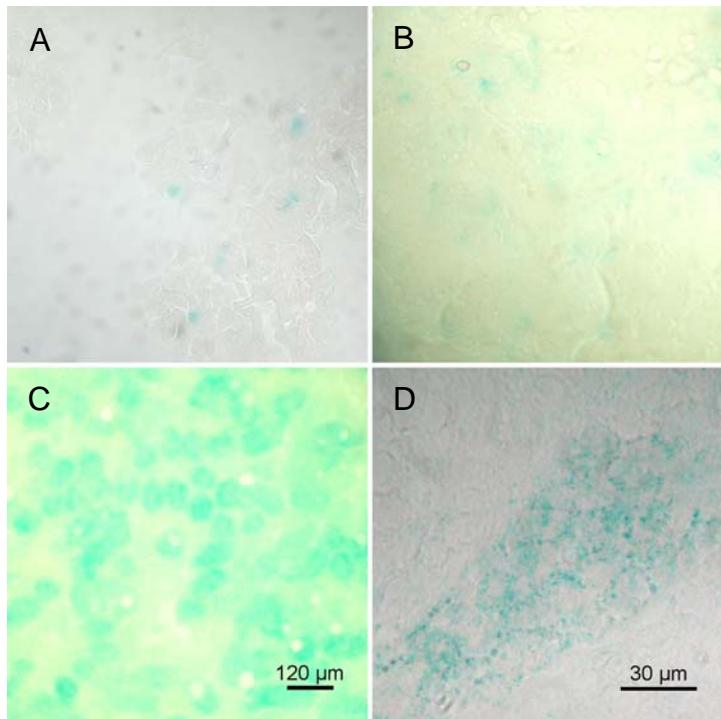


Abb.3.13: β -Galaktosidase Färbung von $Vps54^{\beta-geo/+}$ Geweben

An Gefrierschnitten von heterozygoten Tieren ($Vps54^{\beta-geo/+}$) wurde eine β -Galaktosidase-Färbungen durchgeführt. Die Färbung erfolgte jeweils über Nacht. D: eigener Maßstab.

Exemplarische zeigt die Färbungen von der Lunge (A), dem Magen (B), der Niere (C) und den Leydigschen Zwischenzellen (D). Die Färbungen weisen sehr unterschiedliche Intensitäten auf und betreffen besonders bei geringerer Anfärbung nicht alle Zellen im Gewebe sondern nur einen kleineren Teil.

Eine mittlere bis starke Färbung konnte in der Niere, den Epithelzellen des Dünndarms, der Milz und den Leydigschen Zwischenzellen des Testis nachgewiesen werden (Tab.3.2, Abb.3.13). Alle diese Gewebe weisen eine hohe Stoffwechselrate und Exozytoserate auf. Hieraus leitet sich die mittlere bis starke Färbung in diesen Geweben ab, da diese Gewebe einen erhöhten Bedarf an Vesikeltransport haben. Walter und Mitarbeiter (Walter et al., 2002) haben gezeigt, dass $Vps54$ auf RNA-Ebene besonders hoch in der Leber exprimiert wird. Dieses konnte ich auf Proteinebene durch die LacZ-Färbungen nicht bestätigen. Die Expression konnte zwar in der Leber nachgewiesen werden, aber die höchste Expression fand sich in der Niere und in den Leydigschen Zwischenzellen (Tab. 3.4, Abb.3.6). Für diese Gewebe konnte in der Ratte auch auf RNA-Ebene eine Expression bestätigt werden (Walter et al., 2002).

3.5.2 Komplex-hetereozygote Tiere

Es konnte durch das BAC115F6 eine vollständige Kompensation des Wobbler Phänotyps erreicht werden. Ein eindeutiger Beweis konnte aber nicht geführt werden, ob es sich bei der gefunden Punktmutation im Gen *Vps54* um die Wobbler-Mutation handelt. Denn das BAC115F6 könnte unter Umständen bisher unbekannte Gene oder regulatorische Elemente enthalten, die für den Wobbler-Phänotyp verantwortlich sein könnten. Zu diesem Zweck wurden von mir die von unserem Kooperationspartner erhaltenen Chimären mit für die Wobbler-Mutation heterozygoten Tieren (*wr/+*) verpaart. So kann die Frage geklärt werden, ob sich die Wobbler-Mutation und *Vps54*^{*β-geo*} allelisch zueinander verhalten und somit die Punktmutation in *Vps54* die Wobbler-Mutation ist.

Im Verlauf der Zucht konnten sieben Tiere identifiziert werden, die vom Genotyp aus sowohl für das Trap-Allel (*Vps54*^{*β-geo*}/*+*) als auch für die Wobbler-Mutation heterozygot (*wr/+*) waren. Diese komplex-heterozygoten Tiere (*Vps54*^{*β-geo*}/*wr*) zeigten den Wobbler-Phänotyp mit Tremor der Kopf- und Halsregion, Gewichtsreduktion, Atrophie der Vorderbeine (Abb.3.14, A) und eine Globozoospermie (Abb.3.14, D₂). Die Gewichtsreduktion verlief ähnlich wie bei anderen Hybridlinien, die im Vergleich zu Wobbler-Mäuse aus dem C57Bl6-Stamm eine größere Schwankung aufweisen. In einem Fall betraf die Atrophie nicht nur die Vorderbeine sondern auch im geringen Maße die Hinterbeine. Dies äußerte sich in leichten Koordinationsdefiziten und Kraftverlust der Hinterbeine. Der Grad der Atrophie entsprach nicht dem der Vorderbeine. Phänotypvariationen der Wobbler-Mutation sind aus anderen Hybridlinien bekannt und beschrieben worden (Ulbrich *et al.*, 2002), so dass die Veränderung wahrscheinlich auf den heterogenen Hintergrund zurückzuführen ist.

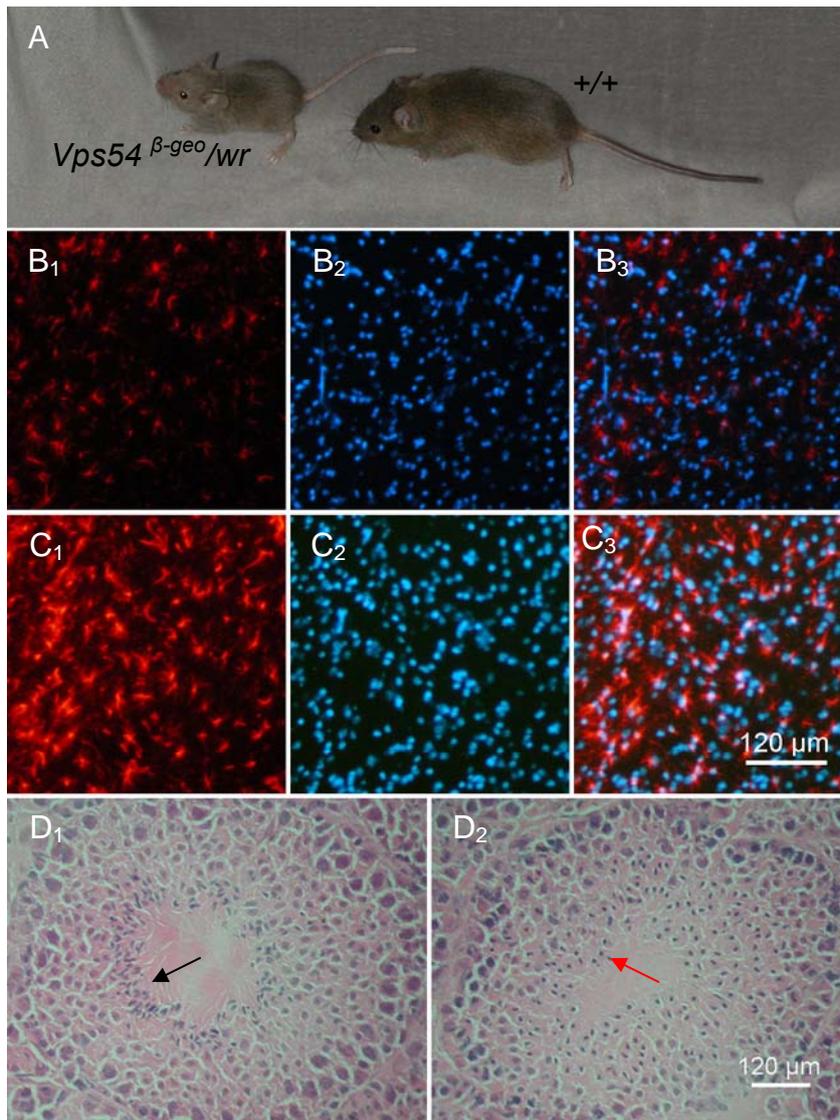


Abb.3.14: Komplex-heterozygote Tiere ($Vps54^{\beta-geo/wr}$)

Optischer Vergleich zwischen Wildtyp und komplex-heterozygtem Tier im Alter von 49 Tagen (A). An Gefrierschnitten des ventralen Vorderhorns des zervikalen Rückenmarks wurde eine Antikörper-Färbung mit GFAP durchgeführt. Es wurden vergleichend ein Wildtyp (B) und ein komplex-heterozygtes Tier (C) gefärbt. Die GFAP-Färbung ist in rot dargestellt (B₁, C₁), Hoechst-Färbung in blau (B₂, C₂). B₃ und C₃ sind die jeweiligen Überlagerungen der beiden Aufnahmen. Vom Testis wurden lichtmikroskopische Aufnahmen von Gefrierschnitten mit Nissl-Färbungen durchgeführt, jeweils von Wildtyp (D₁) und einem komplex-heterozygten Tiere (D₂) im Alter von 49 Tagen. Der schwarze Pfeil weisen auf die Sichelform der Wildtypspermien und der rote Pfeil auf die Rundkopfspermien der komplex-heterozygten Tiere.

Der Gewichts- und Größenunterschied zwischen Komplex-Heterozygoten ($Vps54^{\beta-geo/wr}$) und Wildtypen (+/+) entspricht dem für andere Hybridlinien bekannten Verhältnis zwischen Wobblern und Wildtypen (A). Auch die vermehrte Aktivierung der Astroglia (B, C), als typisches Merkmal der Wobbler-Pathologie findet sich bei den komplex-heterozygoten (B) im Vergleich zu Wildtypen (C) wieder. Im Testis finden sich bei den komplex-heterozygoten Tieren (D₂) nur Spermien mit Globozoospermie (roter Pfeil).

Eine Degeneration der Motoneurone (Daten nicht gezeigt) und eine Astrogliose (Abb.3.14, C) konnte ebenfalls für die komplex-heterozygoten Tiere gezeigt werden. Neben dem neurologischen Phänotyp zeigten die $Vps54^{\beta-geo/wr}$ Tiere auch den Spermatogenesedefekt der Wobbler-Pathologie, welcher sich in den typischen

Rundkopfspermien und der reduzierten Mobilität der Spermien zeigt. Die Veränderte Kopfform der Spermien ist schon während der Entwicklung im Testis sichtbar (Abb.3.14, D).

Durch die komplex-heterozygoten Tiere konnte gezeigt werden, dass es bei der gefundenen Punktmutation in *Vps54* um die ursächliche Mutation von Wobbler handelt, da sich beide als Allele zu einander verhalten. Es kann außerdem ausgeschlossen werden, dass die beiden kurzen Spließe-Isoformen in die Wobbler-Pathologie involviert sind, da beide nicht von dem *Vps54* ^{β -geo}-Allel betroffen sind und weiterhin exprimiert werden. Sowohl der neurologische als auch der Spermatogenesedefekt wird also von der Punktmutation im letzten Exon von *Vps54* verursacht (Schmitt-John et al., 2005).

3.5.3 Heterozygote *Vps54* ^{β -geo} Tiere

In der laufenden Zucht zur Erzeugung von komplex-heterozygoten Tieren traten Tiere auf, welche lediglich heterozygot für *Vps54* ^{β -geo}-Allel (*Vps54* ^{β -geo/+}) waren. Der Großteil der *Vps54* ^{β -geo/+} Tiere ist phänotypisch unauffällig und zeigten keine Unterschiede zu Wildtypen. Die Tiere entwickeln normales Wachstum und Gewicht, genauso wie normale Reproduktionsraten (Daten nicht gezeigt). Bei ca. 20% der heterozygoten Tiere zeigte sich sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen ab der vierten Lebenswoche ein auffälliger Phänotyp, der sich durch eine Atrophie der Hinterbeine und eine Reduktion des Gewichts auszeichnete. Die Hinterbeine dieser auffällig heterozygoten Tiere werden nach hinten gerade weggestreckt und zeigen bei einer fortschreitenden Atrophie ein Abknicken der Pfoten, wie es sowohl Wobbler-Mäusen als auch für ALS-Patienten typisch ist (Abb.3.15, A, B). Im Gegensatz zum Wobbler-Phänotyp zeigten nicht alle der betroffenen Tiere einen Tremor, der zudem noch zwischen einzelnen Individuen an Stärke variiert. Eine ähnliche Beobachtung dieser Variationsbreite konnte an Wobbler-Tiere aus unterschiedlichen Hybridlinien gemacht werden, so dass sich hier wahrscheinlich nur der heterogene genetische Hintergrund der Tiere widerspiegelt.

Ab dem fünften Monat breitete sich die Atrophie auf die Vorderbeine aus. Auch die Wobbler-Mäuse zeigen eine fortschreitende Atrophie, die sich im Endstadium auf die Hinterbeine ausdehnt. Bei den auffällig heterozygoten *Vps54* ^{β -geo/+} Tieren lag ebenfalls eine progressive Ausbreitung der Atrophie vor, die jedoch schneller

voranschritt als bei den Wobbler-Mäusen. Die Pfotenstellung der Vorderbeine ist im Gegensatz zu den Wobbler-Tieren nicht in der abgeknickten Känguruhaltung, sondern gerade nach vorne gestreckt (Abb.3.15, A). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass andere Muskelgruppen als bei der Wobbler-Erkrankung betroffen sind, oder ein anderer Verlauf der Atrophie vorliegt.

Die Lebenserwartung der Tiere war, ähnlich wie bei Wobbler Mäusen, nicht einheitlich. Der früheste Todeszeitpunkt wurde mit 8 Wochen beobachtet, die ältesten Tiere wurden bis zu einem Jahr alt. Dieses Alter entspricht der maximalen Lebenserwartung der von der Wobbler-Mutation betroffenen Mäuse. Der Allgemeinzustand der betroffenen Tiere ist im Anfangsstadium im Vergleich zu Wobbler-Mäusen besser, da die Tiere noch in der Lage sind sich selbstständig zu putzen und ohne größere Probleme zu fressen. Mit zunehmendem Alter verschlechterte sich der Allgemeinzustand der Tiere im Vergleich zu Wobbler-Tieren deutlich schneller, was mit der beginnenden Atrophie der Vorderbeine zeitlich korrelierte.

Der Phänotyp der auffällig heterozygoten Tiere entspricht dem der Wobbler-Mäuse in vielen Punkten und ist im Bezug auf die Atrophie wie ein Spiegelbild, da bei den auffällig heterozygoten Tieren zunächst die Hinterbeine betroffen sind. Aus diesem Grund wurden diese auffällig heterozygoten Tiere auf histologischer Ebene untersucht. Zunächst wurde überprüft, ob die Atrophie der Heterozygoten ebenfalls auf eine Neurodegeneration der Motoneuronen beruht. Hierfür wurden Schnitte vom lumbalen Rückenmark von fünf Monate alten Tieren angefertigt und durch histologische Färbungen untersucht. Mittels Nissl-Färbung konnte gezeigt werden, dass auch bei den auffällig heterozygoten Tieren eine Degeneration der Motoneuronen vorliegt. Die degenerierenden Motoneurone zeigten dabei eine Vakuolisierung der Zellen, welche sich zu den so genannten „Ghosts“ entwickeln und dann endgültig absterben (Abb.3.15, C). Dieser Verlauf ist ein typisches Merkmal der Wobbler-Tiere.

Eine weitere Ähnlichkeit ist die Aktivierung der Astroglia, welche eine typische Erscheinung in vielen neurodegenerativen Prozessen ist. Dies konnte an den auffällig Heterozygoten mittels GFAP-Färbungen gezeigt werden. Die Aktivierung betrifft das lumbale Rückenmark (Abb.3.15, D) und bei Fortschreiten der Degeneration auch das zervikale Rückenmark und das Stammhirn (Daten nicht gezeigt). Da die Atrophie sowohl die Muskulatur der Vorderbeine so wie der

Hinterbeine betrifft, kann so eine Aktivierung im zervikalen als auch im lumbalen Rückenmark erklären werden.

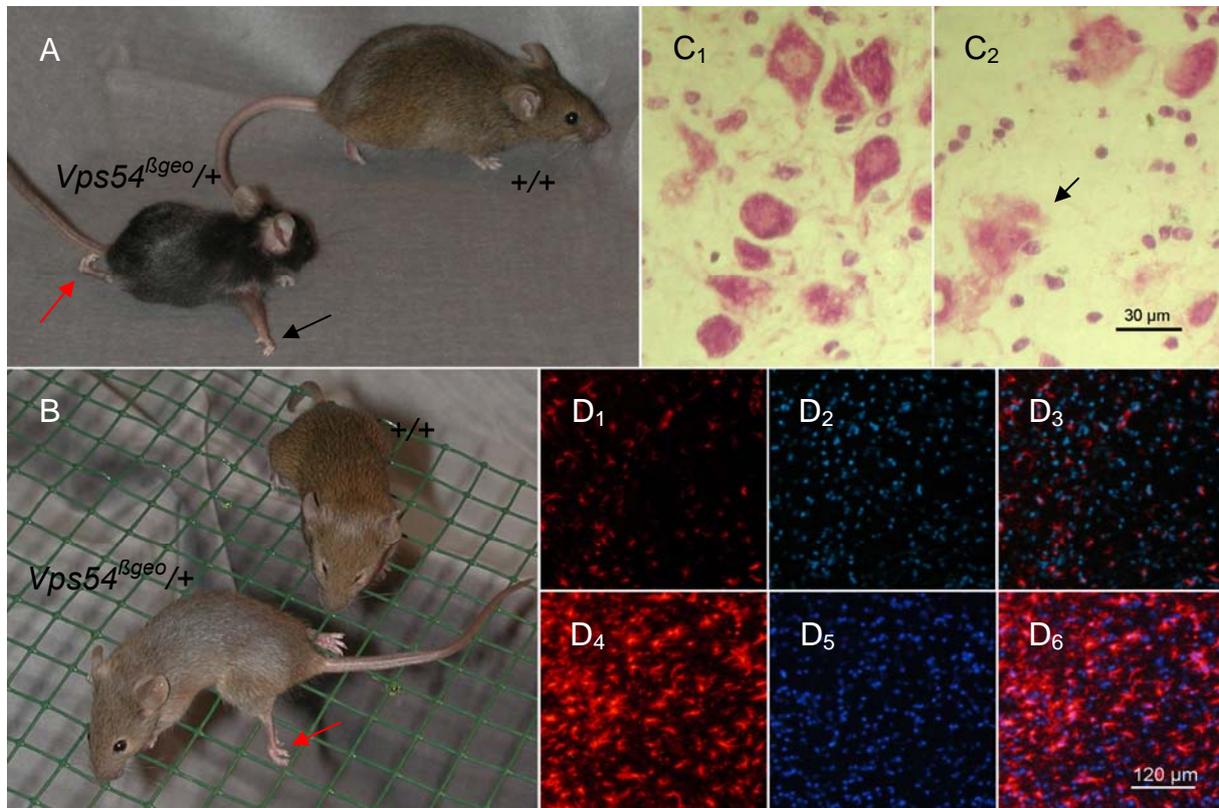


Abb.3.15: Phänotypisch auffällig heterozygoten Tiere

Größenvergleich zwischen auffällig heterozygoten Tieren und nicht betroffenen Geschwister Tieren im Alter von fünf Monaten (A) und zwei Monaten (B). Nissl-Färbung von Gefrierschnitten des lumbalen Rückenmarks von auffällig heterozygoten (C₂) und Wildtypen (C₁), der schwarze Pfeil weist auf einen „Ghost“. Antikörper-Färbung gegen GFAP von Gefrierschnitten des lumbalen Rückenmarks, Wildtyp D₁-D₃, und auffällig heterozygoten D₄-D₆. GFAP ist in rot dargestellt, Hoechst in blau. D₃ und D₆ sind die Überlagerungen beider Aufnahmen.

Die auffällig heterozygoten Tiere sind nicht in der Lage mit den Hinterpfoten (rote Pfeile) zu benutzen, noch damit zu greifen. Mit fünf Monaten breitet sich die Atrophie auf die Vorderpfoten aus, so dass diese ebenfalls nicht mehr aufgesetzt werden können (schwarzer Pfeil). Die Atrophie der auffällig heterozygoten Tiere beruht ähnlich wie bei den Wobbler-Mäusen auf einer Degeneration der Motoneurone. Die Zellen auffällig heterozygoter Tiere zeigen so genannte „Ghosts“. Wildtypen zeigen keine derartigen Degenerationen (C₁). Mittels GFAP-Färbungen zeigt sich eine deutlich größere Anzahl an aktivierten Astrozyten im Vorderhorn des lumbalen Rückenmarks von zwei Monate alten Tiere bei auffällig heterozygoten Tieren (D₄-D₆) als bei nicht betroffenen Geschwistertieren (D₁-D₄).

Die Spermien der auffällig heterozygoten Tiere weisen wie die Spermien der Wobbler eine defekte Spermatogenese auf. Die typischen Rundkopfspermien der Globozoospermie finden sich auch bei den auffällig heterozygoten Tieren. Man findet ähnlich wie bei Wobbler-Spermien verschiedene Arten der Kopfdefekte, wie z.B. große Zytoplasmareste am Kopfbereich, abgeknickte Köpfe oder Kopfverluste. Im Gegensatz zu der Neurodegeneration, die bei den auffällig heterozygoten Tieren im Vergleich zu Wobbler im lumbalen Rückenmark beginnt und bei der später folgenden

Vorderbeinatrophy eine andere Pfotenhaltung verursacht, entspricht der Spermatogenesedefekt auf histologischer Ebene exakt dem Wobbler-Phänotyp (Daten nicht gezeigt).

In der laufenden *Vps54* ^{β -geo}-Zucht fielen einzelne Zuchtpaare auf, die einen höheren Anteil als 20% an auffällig heterozygoten Tieren hervorbrachte. Bei der Verpaarung ihrer Nachkommen konnte in zwei Generationen eine Steigerung des Anteils der auffällig heterozygoten Tiere auf ca. 35% beobachtet werden.

In einem weiteren Zuchtprojekt wird das *Vps54* ^{β -geo}-Allel in den C57Bl6-Stamm zurück gekreuzt, um für das Allel einen einheitlichen Stammhintergrund zu erzielen. Bis jetzt wurde insgesamt fünfmal in den C57Bl6-Stamm zurück gekreuzt. Es traten die auffällig heterozygoten Tiere bis in diese letzte, fünfte Generation auf. In der Rückkreuzungszucht wurde bisher noch keine ausreichende Anzahl an heterozygoten Tieren erreicht, um eine statistische Aussage hinsichtlich des Anteils der auffälligen Heterozygoten zu machen.

3.5.4 Homozygote *Vps54* ^{β -geo}-Tiere

Da ein Teil heterozygoter Tiere schon einen auffälligen, dem Wobbler sehr ähnlichen Phänotyp aufweisen, ist es zu erwarten, dass die homozygoten *Vps54* ^{β -geo} Tiere (*Vps54* ^{β -geo/ β -geo}) einen gravierenden Phänotyp zeigen. Um homozygote Tiere zu erhalten wurden diejenigen Tiere, welche in der F₁-Generation aus der Verpaarung von C57Bl6 mit den Chimären hervorgegangen waren und heterozygot für *Vps54* ^{β -geo} waren, miteinander zur F₂-Generation verpaart. Es zeigte sich, dass in der F₂-Generation keine homozygoten Tiere geboren wurden, obwohl weit über 100 Nachkommen hinsichtlich ihres Genotyps klassifiziert wurden. Dies entspricht nicht der mendelschen Verteilung und legt den Schluss nahe, dass die komplette Ausschaltung von *Vps54* embryonal letal ist. Unklar war jedoch, zu welchem Zeitpunkt die Tiere versterben oder ob überhaupt eine Entwicklung bis zu einem bestimmten Stadium erfolgt.

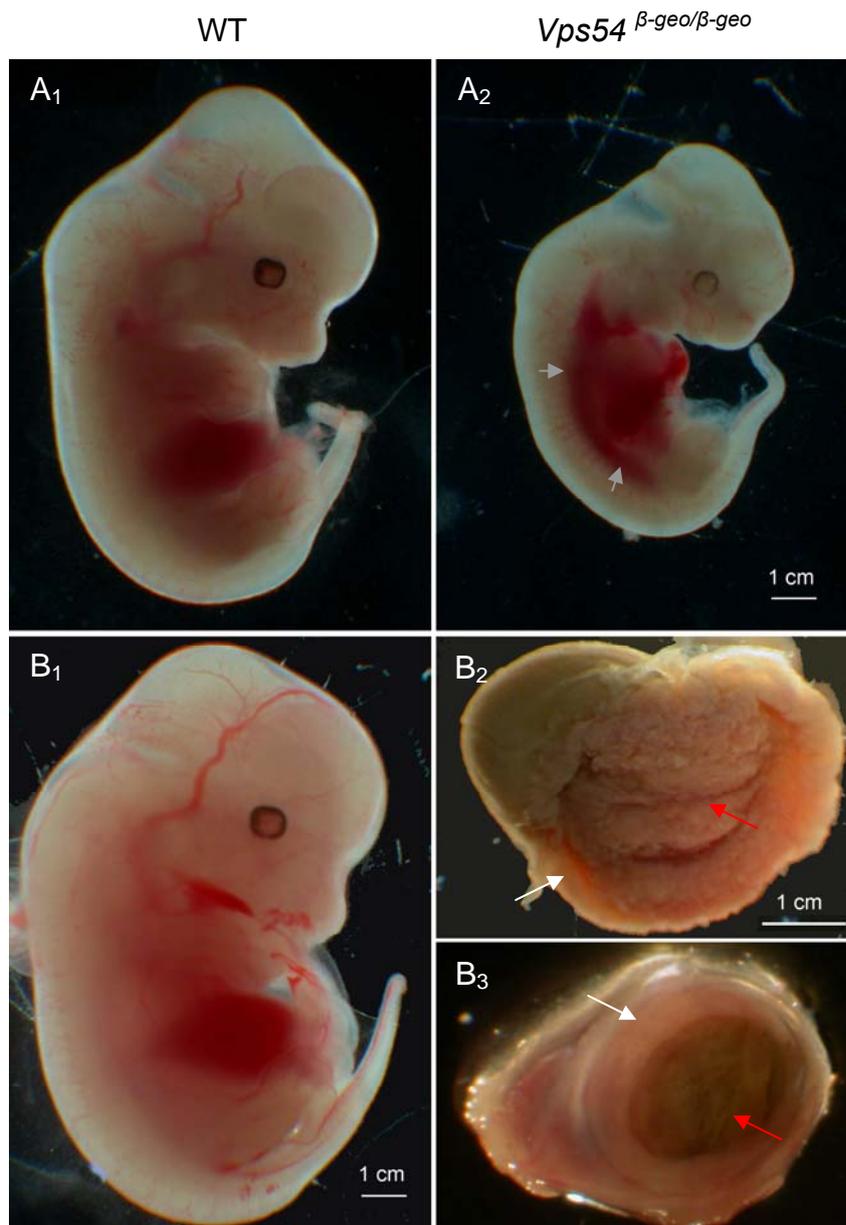


Abb.3.16: Embryonalstadien E11,5 und e12,5 von Wildtyp- und *Vps54* ^{β -geo/ β -geo}-Embryonen

Lichtmikroskopische Aufnahmen von den Entwicklungsstadien E11,5 (A) und E12,5 (B). Der Vergleich zwischen Wildtyp- (A₁) und *Vps54* ^{β -geo/ β -geo}-Embryonen (A₂) zeigen deutlich die Entwicklungsdefizite des *Vps54* ^{β -geo/ β -geo}-Embryos, was Größe und Differenzierung betrifft. Blutungen im Gewebe sind bei vielen *Vps54* ^{β -geo/ β -geo}-Embryonen zu finden, was auf Absterbeprozesse hindeutet (A₂, graue Pfeile).

Im Alter E12,5 sind nur noch stark degradierte Abbauprodukte der *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Embryonen (B₂, B₃) durch die geöffnete Uteruswand und Dottersack (weiße Pfeile) zu erkennen. Meist weisen diese gerade in der Resorption befindlichen Reste eine dunkle, braune bis grüne Färbung auf (rote Pfeile) der Wildtyp als Vergleich mit eigenem Maßstab dargestellt (B₁).

Um aufzuklären, ob die homozygoten Tiere während der Embryonalentwicklung versterben, wurden Embryonen in unterschiedlichen Stadien präpariert. Das Aminosäure- und der Dottersack der Embryonen wurden für eine DNA-Extraktion verwendet, um durch PCR-Diagnostik den Genotyp der Embryonen zu bestimmen. Auf diese Weise

konnten *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Tiere bis zum Embryonaltag 12,5 (E12,5) nachgewiesen werden. In diesem Stadium war die Resorption der Embryonen durch die Mutter schon sehr weit fortgeschritten und häufig bereits abgeschlossen (Abb.3.16). In der Nähe der Plazenta fanden sich nur noch abgestorbene Reste der Embryonen. Dies legt den Schluss nahe, dass der Todeszeitpunkt der *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Embryonen vor dem Embryonaltag 12,5 liegen muss. Zum Zeitpunkt E13,5 und E14,5 fanden sich im Uterus keine *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Embryonen mehr.

Um den Zeitpunkt des Absterbens der *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Embryonen besser eingrenzen zu können, wurden ausgehend vom Tag E12,5 frühere Stadien der Embryonen untersucht. Zum Zeitpunkt E11,5 ist eine deutliche Reduktion der Größe im Vergleich zu Wildtyp-Tieren und eine generelle Wachstumsretardierung der Organe zu erkennen. Ein schlagendes Herz und ein funktionierender Blutkreislauf, wie es für Wildtypen in diesem Stadium typisch ist, war bei den *Vps54* ^{β -geo/ β -geo}-Embryonen nicht zu erkennen, wobei Erythrozyten sich gut sichtbar in den Blutgefäßen befanden. Häufig konnte man auch Blutungen in den Embryonen feststellen, welche ein typisches Zeichen für Absterbeprozesse sind (Abb.3.16).

Im Alter von E10,5 ist keine morphologische Veränderung an den *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Embryonen zu erkennen. Fast alle zeigen ähnlich den Wildtypen einen Herzschlag und eine Zirkulation von Erythrozyten in den Blutgefäßen (Daten nicht gezeigt). In einzelnen Fällen wurden auch bei Wildtypen ein Ausbleiben des Herzschlages und eine Wachstumsretardierung beobachtet. Dies ist nicht ungewöhnlich, da bei einigen Inzuchtstämmen bis zu 30% der Embryonen ver stirbt und resorbiert werden (Ruge, 1964). Vermutlich lassen sich damit die bei den Wildtypen gemachten Beobachtungen erklären. Die makroskopisch sichtbaren Veränderungen der *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Embryonen treten erst zwischen den Stadien E10,5 und E11,5 auf.

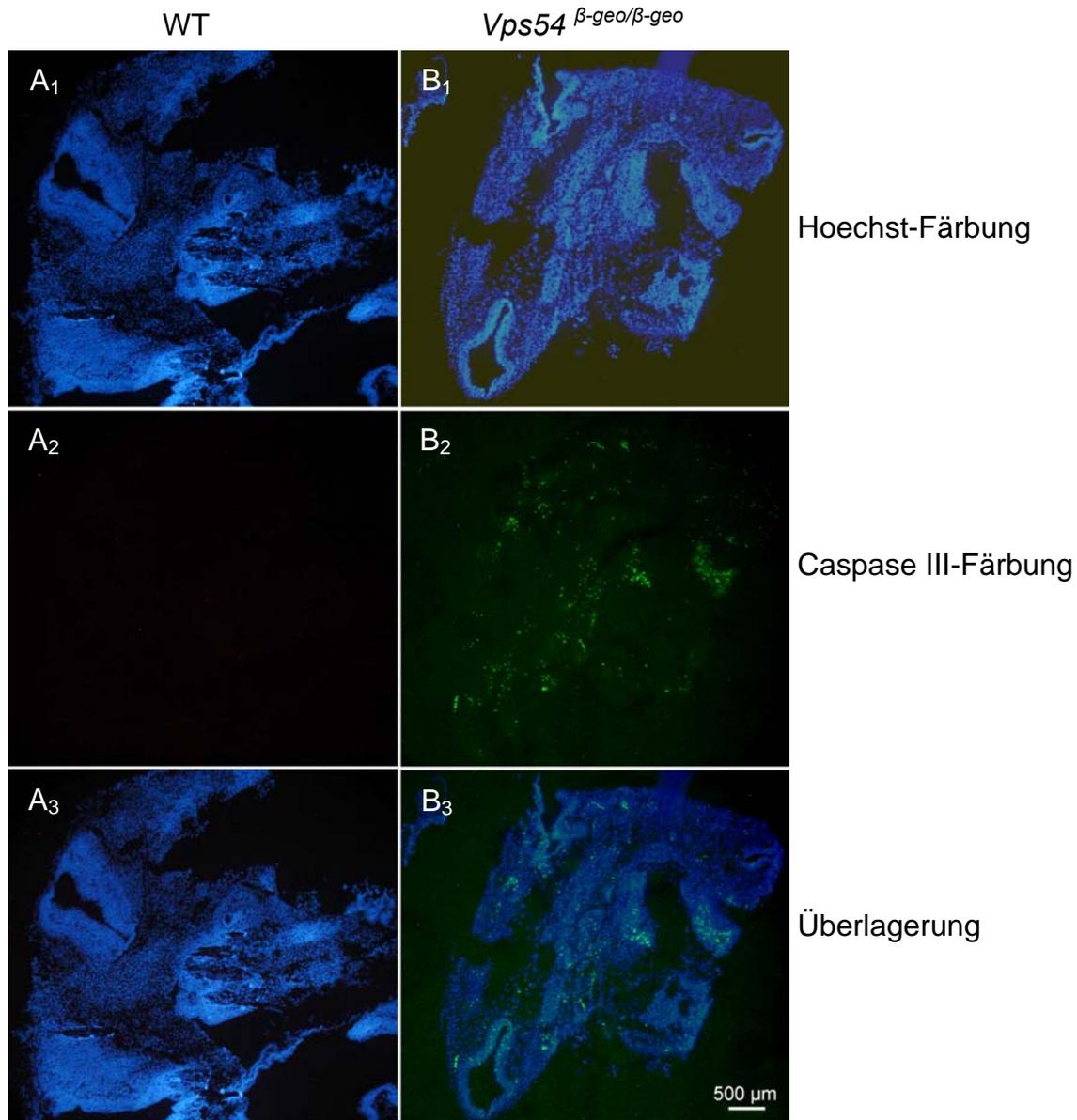


Abb.3.17: Apoptose-Nachweis in E10,5 *Vps54* ^{β -geo/ β -geo}-Embryonen

Antikörper-Färbung mit Caspase III und eine Hoechst-Färbung von Gefrierschnitte von Wildtyp (A) und *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Embryonen (B) im Alter von E10,5.

Beim Wildtyp (A) wurden im Gegensatz zu den *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Embryonen (B) keine Caspase III-positiven Zellen gefunden. Dies wird besonders in der Einzelfärbung (A₂, B₂) deutlich. In der Überlagerung der Hoechst und Caspase III-Färbung (A₃, B₃) wird ersichtlich, dass sich in fast alle Bereichen apoptotische Vorgänge im *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Embryonen finden lassen.

Da nicht klar war, ob es sich bei dem Sterben der Embryonen um nekrotische oder apoptotische Prozesse handelt, wurden von Embryonen mit dem Entwicklungsstadium E10,5 Gefrierschnitte angefertigt und mit einem Antikörper gegen die phosphorylierte Form der Caspase III gefärbt. Caspase III wird durch Phosphorylierung aktiviert und nimmt eine entscheidene Schalterstellung in der Einleitung des Apoptoseweges ein und wurde daher als Marker verwendet. In den *Vps54* ^{β -geo/ β -geo}-Embryonen im Stadium E10,5 waren fast alle Gewebe von

apoptotischen Vorgängen betroffen. Es fanden sich überall einzelne Zellen oder kleinere Anhäufungen von Zellen, die Caspase III-positiv waren. Daher konnte zum Zeitpunkt E10,5 kein bestimmtes Organ als Ausgangspunkt für die apoptotischen Vorgänge identifiziert werden (Abb. 3.17).

Um die Frage zu beantworten, ob die apoptotischen Vorgänge in einem bestimmten Gewebe oder zu einem bestimmten Entwicklungsschritt einsetzen, wurden frühere Stadien auf Apoptose untersucht. Ein ähnlicher Phänotyp wie bei den Embryonen E10,5 ließ sich auch für das Stadium E9,5 beobachten. In fast allen Bereichen des Embryos konnten apoptotische Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Für das Stadium E8,5 fanden sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp Embryonen und *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Embryonen. Beide zeigten lediglich für die Entwicklung typische Apoptose in bestimmten Bereichen wie z.B. der Ohrplakode (Daten nicht gezeigt).

Die ersten Unterschiede waren im Stadium E9,0, in dem sich bei den *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Embryonen an verschiedenen Stellen erste, nicht entwicklungsbedingte apoptotische Zellen zeigten, zu erkennen (Abb.3.18). Bei vier verschiedenen *Vps54* ^{β -geo/ β -geo}-Embryonen zeigten sich in ganz unterschiedlichen Regionen erste Caspase III- positive Zellen. Als einzige Gemeinsamkeit fanden sich in zwei Fällen in der Nähe des Herzmuskels im Bindegewebe apoptotische Zellen, die diesem Stadium keine bekannte Differenzierung durchlaufen (Abb.3.18). Es konnte somit keine Region oder Entwicklungsschritt als für die *Vps54* ^{β -geo/ β -geo}-Embryonen kritisch eingegrenzt werden.

Als Ursache für den Tod der Embryonen kommt auch ein Plazentadefekt in Frage. In der Literatur sind für verschiedene Knock-out Mäuse, als Ursache für embryonale Letalität, Plazentadefekte beschrieben (Rossant und Cross, 2001; Hemberger und Cross, 2001). Es wurden daher Parafinschnitte von Plazenten der *Vps54* ^{β -geo/ β -geo}- und Wildtyp-Embryonen angefertigt und mit Hematoxylin und Eosin gefärbt. Es konnten keine größeren Defekte oder Entwicklungsdefizite in der Plazenta gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Alle Schichten und Zelltypen waren vorhanden und wiesen die normale Organisation der Zellschichten auf. Vakuolisierungen von Zellen, wie sie im Zusammenhang mit Plazentadefekten berichtet wurden (Willecke et al., 2001), konnten nicht beobachtet werden.

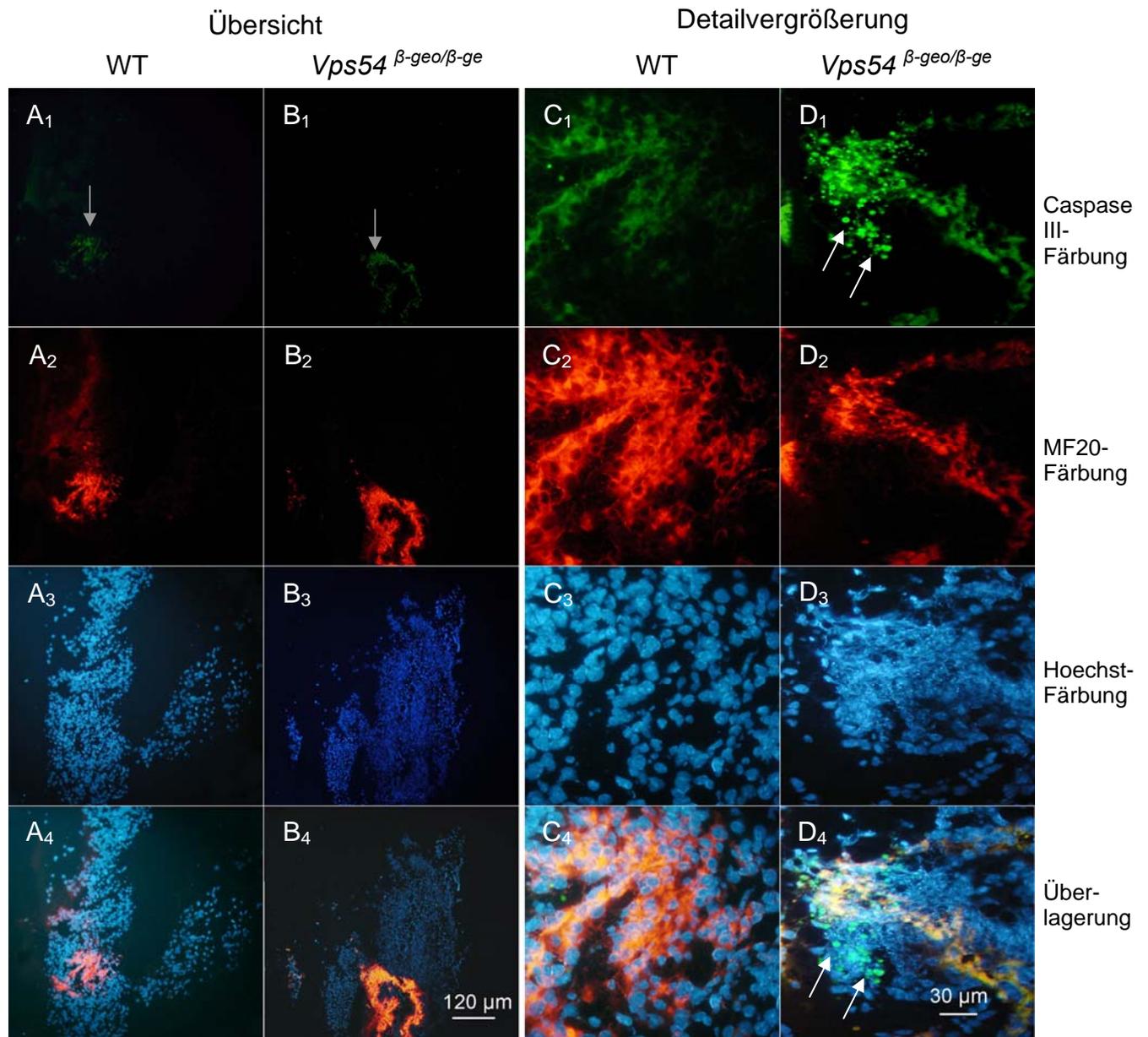


Abb.3.11: Apoptose-Nachweis in E9,0 *Vps54* ^{β -geo/ β -geo}-Embryonen

Von Gefrierschnitten von Wildtypen (A, C) und *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} (B, D), E9,0, wurden Antikörperfärbungen gegen Caspase III (grün) und MF20 (rot) und eine Hoechst-Färbung (blau) angefertigt. In A und B sind Übersichten gezeigt, die das Herz und die angrenzende Rumpfregeion der Embryonen zeigen, in C und D ist eine Detailvergrößerung der Herzregion.

Es konnten erste nicht entwicklungsbedingte apoptotische Zellen bei den *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Embryonen (B, D) im Vergleich zum Wildtyp (A, C) nachgewiesen werden. Diese Caspase III-positiven Zellen befinden sich in der Nähe der Myosin-positiven Zellen (weiße Pfeile). Durch eine ungenügende Filterung erhält man falsch positive Signale, die aus dem Roten Kanal stammen (graue Pfeile). Dies sind gut von den eigentlichen Signalen zu unterscheiden (weiße Pfeile), besonders in der Überlagerung (A₄, B₄, C₄, D₄).

3.5.5 Geplanter konditionaler Knockout von *Vps54*:

Da die *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Tiere während der Embryonalentwicklung versterben, ist es von großem Interesse das Gen *Vps54* gezielt auszuschalten. Von besonderem

Interesse ist eine Ausschaltung von *Vps54* in neuronalem Geweben, hier besonders die separate Ausschaltung in Neuronen, Astro- und Mikrogliazellen. Ebenso ist eine postnatale Ausschaltung interessant, da das homozygote *Vps54* ^{β -geo}-Allel embryonal letal ist. Hierfür ist ein konditionaler Knockout geplant. Dazu wird das Exon3 mit loxP-Elemente flankiert und zur weiteren Selektion eine Resistenzkassette eingebracht, die ebenfalls von loxP-Elementen flankiert ist. Die loxP-Elemente bestehen aus zwei 13 Basenpaare langen *inverted-repeats*, welche durch eine acht Basenpaar langes *spacer*-Element voneinander getrennt sind. Die lokusspezifische Cre-Rekombinase erkennt die loxP-Elemente und katalysiert eine Rekombinationsreaktion zwischen diesen beiden Elementen, was zu einer Deletion der Region zwischen den loxP-Elementen liegenden Sequenzen führt. Wenn 3 loxP-Elemente kombiniert werden, loxP-Exon3-loxP-*neo*-loxP, sind drei Deletionsereignisse möglich. Es kann ein loxP-Element, die Neomycin-Resistenzkassette oder das Exon 3 im Genom verbleiben. Dazu wird zunächst nach dem Einbringen des Knockout-Konstruktes auf die mitgebrachte Resistenz selektiert und anschließend die Cre-Rekombinase in ES-Zellen transient exprimieren. Zuletzt werden einzelnen Klone mit einer spezifischen Sonden durch Southern-Blots auf die unterschiedlichen Rekombinationsereignisse klassifiziert. Geeignete Klone werden expandiert und mittels Injektion in Blastozyten eingebracht.

In unserer Arbeitsgruppe stand mir ein Vektor zu Verfügung, der das Rückrad des pBluescript (Stratagene) und eine über die Schnittstellen *Bam*HI und *Not*I eingebrachte Neomycin-Resistenzkassette trägt, die von zwei loxP-Elementen flankiert wird, die aus dem pTV-0 Vektor (C. Birchmeier, MDC Berlin) stammt. Das dritte loxP-Element und weitere Restriktionsschnittstellen wurden über Oligonukleotidlinker eingefügt. Der so entstandene Vektor erhielt die Bezeichnung pBS-*neo*-link-Vektor (Drepper, 2005).

Für die Erstellung des Targeting-Vektors sollten zwei flankierenden mit der genomischen Sequenz, homologe Arme eingefügt werden. Die entsprechenden stromauf- und -abwärts gelegenen Arme des Exons 3 wurden mittels PCR amplifiziert, wobei über Primer jeweils die Restriktionsschnittstellen *Sac*II und *Not*I für das stromaufwärts gelegene, *Eco*147I und *Sal*I für das Exon 3 und *Sal*I und *Kpn*I für das stromabwärts gelegene Fragment mitgebracht wurden (Primer *Vps54*-up-a und b, *Vps54*-exon3-a und b, *Vps54*-down-a und b). Die Länge der einzelnen Fragmente betrug 3087 bp für das stromaufwärts, 3091 bp für das stromabwärts gelegene

Fragment und 1046 bp das Fragment, welches das Exon 3 enthält. Die so erhaltenen DNA-Fragmente wurden in den pCR4-TOPO Vektor (Invitrogen) kloniert.

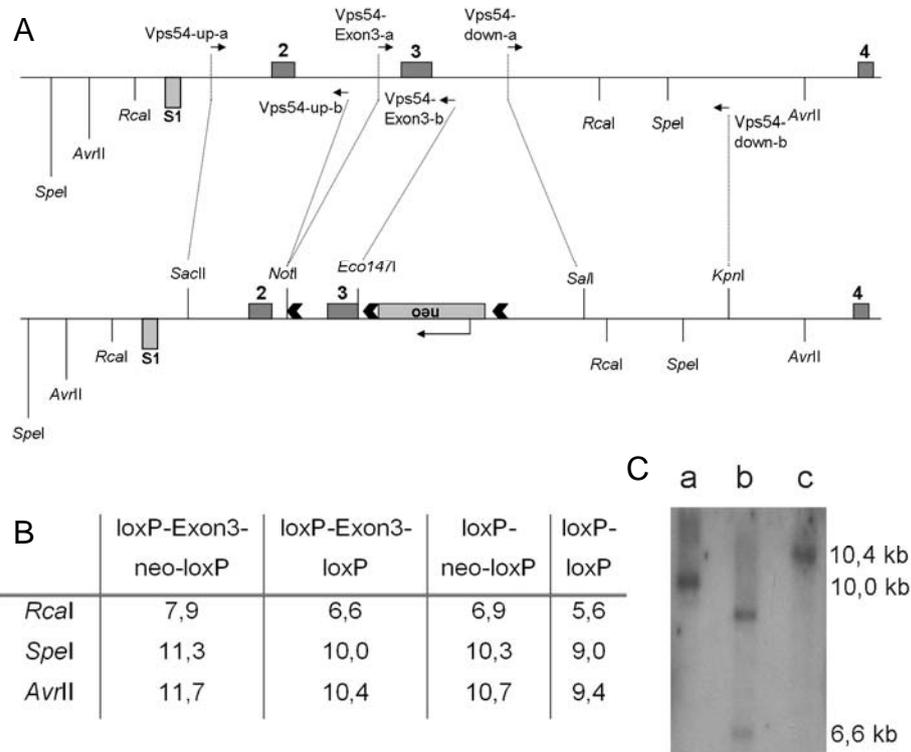


Abb.3.19: Konditionaler Knockout von *Vps54*

Um *Vps54* ausschalten zu können, wird das dritte Exon jeweils von lox-P-Elementen flankiert, so dass die Cre-Rekombinase eine Rekombination dieser Elemente katalysieren kann, wo durch das Exon 3 verloren geht. Zur Selektion auf Integrationsereignisse wird außerdem noch eine Neomycin-Resistenzkassette eingebracht (A). Es sind auf Grund der drei vorhandenen lox-P-Elementen noch weitere Rekombinationen möglich, die jeweils zum Verlust der Neomycin-Resistenzkassette (loxP-Exon3-loxP) oder zum Verlust des Exons 3 (loxP-neo-loxP) und der Neomycin-Resistenzkassette (loxP-loxP) führen. Durch den Verlust des Exons 3 kommt es zu einem Stopp der Transkription durch die Entstehung eines Stoppkodons nach 153 Basenpaaren, das im vierten Exon liegt.

Die unterschiedlichen Rekombinationsereignisse (B, Größenangaben in Kilobasen) mit der spezifischen Sonde S1 mit Hilfe eines Southern-Bolt-Experimentes identifiziert werden (C, a: *SpeI*, b: *RcaI*, c: *AvrII*).

Über die eingebrachten Schnittstellen wurden die Fragmente aus dem pCR4-TOPO Vektor ausgeschnitten, aufgereinigt und mit dem pBS-*neo*-link-Vektor ligiert (Abb.3.19, A). Nach Fertigstellung des Vektors soll dieser in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) eingebracht und die Klone mittels der Resistenskassette auf Integrationsereignisse selektiert werden. Durch eine transient Expression der Cre-Rekombinase werden die Klone mittels Southern-Blot hinsichtlich der Rekombinationsereignisse klassifiziert. Zur Identifizierung der unterschiedlichen Rekombinationsereignisse wurde eine spezifische Sonde etabliert. Mittels dieser

Sonde können bei einer Spaltung der zu testenden genomischen DNA mit den Restriktionsenzymen *SpeI*, *RcaI* und *AvrII* die verschiedenen Fragmentgrößen den einzelnen Rekombinationsereignissen zugeordnet werden. Die Klone, die das Exon 3 mit je einem flankierenden loxP-Element tragen werden für die Blastozysten-Injektion ausgewählt. Das so flankierte Exon3 kann durch eine erneute Cre-Rekombinase Expression heraus rekombinierten. Dies wird durch die Verpaarung mit Cre-Rekombinase-transgenen Mäusen erreicht. Je nach Wahl des Promotor für die Cre-Rekombinase kann so das Exon 3 in unterschiedlichen Geweben oder Zeitpunkten durch Rekombination entfernt werden. Durch den Verlust des Exons 3 und dem daraus resultierenden Frame-Shift entsteht nach 153 bp, 51 Aminosäuren, ein Stoppkodon, das zu einem Abbruch der Translation führt. Die beiden kleineren Spließe-Isoformen sind auch bei diesem konditionalen Knock-out nicht betroffen und sollten normal exprimiert werden.

Im Rahmen meiner Arbeit konnte aus zeitlichen Gründen nur ein Teil des Vektors fertiggestellt werden. Die stromabwärts und das Exon 3 enthaltende Fragment wurden in den pBS-*neo*-link-Vektor eingesetzt. Der stromaufwärts gelegene Arm ist noch nicht in den Vektor eingesetzt worden. Eine spezifische Sonde (S1), zur Identifizierung der unterschiedlichen Integrationsereignisse konnte von mir etabliert werden und auf Wildtyp-DNA erfolgreich getestet werden (Abb.3.19, B, C).

4 Diskussion

In dieser Arbeit ist es gelungen zu beweisen, dass es sich bei der Punktmutation im *Vps54*-Gen um die Wobbler-Mutation der Maus handelt. *Vps54* spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung und ich konnte zeigen, dass homozygote *Vps54* ^{β -^{geo}} Mäuse um den Embryonaltag 10-11,5 versterben. Diese neue Erkenntnis kann dazu beitragen die mögliche Rolle des retrograden Transportes von den späten Endosomen zum Golgi-Apparat in der Pathologie von Neurodegenerationen, in der Spermatogenese und während der Embryonalentwicklung aufzuklären.

In der nachfolgenden Diskussion werden die bisher unbekannt Phänotypen der Wobbler-Maus, die Kompensation des Wobbler-Phänotyps durch den *Vps54* tragenden BAC115F6 und die unterschiedlichen Ausprägungen des *Vps54* ^{β -^{geo}}-Allels vorgestellt und diskutiert. Im Ausblick werden weiterführende Versuche vorgeschlagen, um die Rolle von *Vps54* in der Wobbler-Pathologie und während der Embryonalentwicklung aufzuklären.

4.1 Charakterisierung der Wobbler-Mäuse

4.1.1 Die Gametogenese

Für die Wobbler-Maus ist in der Literatur ein Defekt in der Spermatogenese beschrieben (Leetsma und Szepeswol, 1980, Heimann et al., 1991) bei der die Elongation des Kopfes und die Akrosomenanlagerung nicht stattfindet, so dass die letzten Schritte der Spermatogenese unterbrochen sind. Die Oogenese der Weibchen ist in der Literatur bisher nicht weiter beschrieben worden.

Ich konnte zeigen, dass der Ovarialzyklus der Wobbler-Weibchen unterbrochen ist, die Oogenese an sich aber vollfunktionsfähige Oozyten hervorbringen kann. Die Zyklusunterbrechung rührt aller Wahrscheinlichkeit nach vom schlechten Allgemeinzustand der Tiere her und könnte daher als reiner Sekundäreffekt angesehen werden. Ob der Uterus der Weibchen funktionsfähig ist, konnte von mir nicht eindeutig geklärt werden. Es gibt bisher keine Hinweise in der Literatur, dass die Wobbler-Mutation in irgendeiner Weise die Glattmuskulatur oder auch Drüsengewebe beeinträchtigt und man so daraus eine Funktionsstörung des Uterus vermuten könnte. In histologischen Untersuchungen wurden keine Auffälligkeiten im

Uterus gefunden, so dass ein morphologischer Defekt auszuschließen ist (Kapitel 3.1.1). Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass im Uterus ein direkter Defekt vorliegt, der die Funktionsfähigkeit beeinträchtigt.

Somit beeinträchtigt die Wobbler-Mutation allein die Gametogenese der männlichen Wobbler-Mäuse. Für keines der gängigen Mausmodelle für Globozoospermie, wie z.B. *Csnk2a2*⁻, *Jam3*⁻, *Pms2*⁻, *Poll*⁻, *Styx*⁻, *Tnp2*⁻, *Hrb*⁻, *Gopc*-defiziente und *Azh*-Maus, ist eine Beeinträchtigung der Oogenese beschrieben worden (Xu et al., 1999, Gliko et al., 2004, Baker et al., 1995, Kobayashi et al., 2002, Wishart et al., 2002, Adham et al., 2001, Kang-Decker 2001, Yao et al., 2002, Hugenholtz et al., 1984).

Dies lässt den Schluss zu, dass die Wobbler-Mutation ausschließlich Auswirkungen auf die Spermatogenese hat, nicht aber in der Oogenese, die keinen Defekt aufweist.

4.1.2 Futterakkumulation im Magen

Es konnte von mir ein weiterer Phänotyp, der bei der Wobbler-Maus auftritt, beschrieben werden. Sowohl bei weiblichen als auch männlichen Wobbler-Tieren akkumuliert Futter im Magen, was in einer deutlichen Erhöhung des Magengewichtes inklusive des Inhalts resultiert. Für den Darm konnten keine ungewöhnlichen Akkumulationen oder Gewichtszunahmen nachgewiesen werden. Größere, lichtmikroskopisch sichtbare Defekte in der Magen- oder Darmwand konnten nicht gefunden werden und, wie auch schon in frühen Untersuchungen festgestellt wurde, gibt es keine Reduktion der peripheren Nerven in der Darmwand (Daten nicht gezeigt und Schitek, 2005). Die Akkumulation von Futter im Magen von Wobbler-Tieren ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden. Es gibt allerdings auch keine Hinweise auf eine Beeinträchtigung des Verdauungssystems oder eines Stoffwechseldefektes.

Die Erkrankung, die eine Akkumulation von Nahrung in den Verdauungsorganen verursacht ist die Morbus Hirschsprung Erkrankung oder auch Megakolon (engl. *Hirschsprung disease*, Omim-Nummer: 142623). Eine Reduktion oder Funktionsverlust der peripheren Nerven verursacht eine Aufstauung des Darminhaltes durch verminderte Darmperistaltik, was zu einer abnormen Erweiterung des Darms führt. Die humane Morbus Hirschsprung Erkrankung wird durch ein Fehlen von parasymphatischen Nervenzellen in der Darmwand verursacht (Carrasquillo et al., 2002; Robertson et al., 1997). Für keines der Mausmodelle für

die Morbus Hirschsprung, lethal spotting (*Edn3^{ls}*, Baynash et al., 1994), die *glial cell line derived neurotrophic factor (Gdnf)*-defiziente Maus (Sanchez et al., 1996) und *ret proto-oncogene (ret)*-defiziente Maus (Schuchardt et al., 1994), ist ein dem Wobbler-Phänotyp vergleichbare Pathologie der Futterakkumulation im Magen beschrieben worden. Der Wobbler-Phänotyp entspricht eindeutig nicht der Megakolon-Pathologie, da die typischen Akkumulationen im Darm nicht vorhanden sind und die parasymphatischen Nervenzellen nachweisbar sind. Es gibt auch keine Hinweise, dass die Innervation der Muskulatur des Darms beeinträchtigt ist.

Die Darmperistaltik wird nicht nur von den peripheren Nerven, sondern auch durch Bewegungen der Bauchmuskulatur angeregt. Ein sekundärer Effekt könnte durch die eingeschränkte Lokomotion aufgrund der Atrophie der Vorderbeine als Ursache für die Futterakkumulation in Frage kommen. Verminderte Darmperistaltik würde aber auch eine Akkumulation des Futters im Darm erwarten lassen, was bei dem von mir beschriebenen Phänotyp nicht der Fall ist. Für andere Mausmutanten, die eine Einschränkung der Bewegung zeigen, sind nicht immer Akkumulationen von Futter im Magen beschrieben, so dass die Akkumulation wahrscheinlich kein typischer Effekt einer Bewegungseinschränkung ist. Der Phänotyp der Wobbler-Maus müsste sich, wenn die verminderte Lokomotion ursächlich ist, mit dem Fortschreiten der Wobbler-Pathologie verschlimmern. Eine Untersuchung von Tieren unterschiedlichen Alters, könnte diese Frage klären.

4.1.3 Metabolomanalyse

Die Messungen des Glukosegehaltes des Blutes ergaben insgesamt eine leichte Reduktion des Blutglukosegehaltes bei den Wobbler-Mäusen und eine starke Streuung der Einzelwerte im Vergleich zu Wildtypen. Die Maximal- und Minimalwerte der Wobbler-Tiere übertrafen jeweils die Werte der Wildtypen. Weder durch die tägliche Zufütterung von energiereichem Futter, noch durch die Atrophie der Vorderbeine oder den schlechten Allgemeinzustand der Tiere lässt sich eine ausreichende Erklärung für diese Beobachtung finden.

Für die G93A *SOD1*-Maus, einem der Tiermodelle für die Amyotrophe Lateralsklerose, konnte gezeigt werden, dass noch vor den ersten Anzeichen einer Motoneurondegeneration der Glukosemetabolismus beeinträchtigt ist (Browne et al., 2005). Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass Fehlfunktionen im

Metabolismus einen Rolle in der Frühphase der Motoneurondegeneration spielen könnten (Ames et al., 2000). Eine Beeinträchtigung der Atmungskettenphosphorylierung könnte in einer Reduktion von ATP resultieren, was wiederum eine Beeinträchtigung aller ATP-abhängigen Prozesse nach sich ziehen würde. Daraus könnte sich ein geringerer Bedarf an Glukose ergeben (Browne et al., 2005). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Beeinträchtigungen von Atmungsketten-Enzymen bei den G93A SOD1-Mäusen vorliegt (Kirkinezos et al. 2005). Neben diesem sind auch andere Modelle in der Diskussion, so wäre z.B. auch ein direkter Einfluss von *mSod1* auf den Glukosemetabolismus denkbar (Browne et al., 2005). Ebenso könnte ein genereller Defekt im Energiehaushalt der Zelle ausgelöst durch die G93A SOD1-Variante zum Motoneuronentod führen (Dupuis et al., 2004). Die Schwankungen im Glukosehalt könnten ein Hinweis auf eine Störung des Stoffwechsels sein. Eine solche Störung würde eine Motoneurondegeneration in ihrer Progression begünstigen oder eventuell auch verursachen.

Es ist möglich, dass die Glukose nicht in der Metabolomanalyse der Gewebe Testis und Rückenmark als verändert aufgefallen ist, da durch die Streuung der Effekt insgesamt kompensiert würde. Die Streuungen könnten allerdings auch nur den Gehalt der im Blut befindlichen Glukose betreffen, so dass der Glukosegehalt in den untersuchten Geweben keinen Schwankungen oder Veränderungen im Vergleich zu Wildtypen aufweist.

In der Metabolomuntersuchung des Testis zeigten sich jeweils drei bzw. zwei veränderten Metabolite. Im Alter von 21 Tagen waren es alpha-Ketoisocaproate, Homoserin und Adenin, mit 49 Tagen alpha-Ketoisocaproate und Isoleuzin. Nur ein Metabolit ist vermehrt im Wobbler-Testis zu finden, nämlich Homoserin im Alter von 21 Tagen. Alle anderen veränderten Metabolite waren reduziert, sowohl bei 21 als auch bei 49 Tagen (Kapitel 3.2.2). Einzig alpha-Ketoisocaproate liegt in beiden Alterstufen als verändert vor. Es fällt auf, dass die Mehrzahl der veränderten Metabolite aus dem Aminosäurestoffwechsel stammt. Bei einer ähnlichen Untersuchung des Rückenmarks der Wobbler-Mäuse (laufendes Projekt) wurden ebenfalls mehrere Metabolite als verändert identifiziert, die in den Aminosäuremetabolismus involviert sind.

Dieser Umstand wirft die Frage auf, ob sich die Wobbler-Mutation nicht nur, wie bisher angenommen, auf die Motoneuronen und die Spermatogenese auswirkt, sondern auch noch in anderen Geweben zu Defekten führen könnte. Besonders die

Organe des Verdauungsapparates weisen eine hohe Transportrate auf und daraus resultierend ein höheres Expressionslevel von *Vps54* im Vergleich zu anderen Geweben, was ich durch die Expressionsuntersuchungen des *Vps54* ^{β -geo}-Allels zeigen konnte (Kapitel 3.5.1, 3.5.2). Es wäre daher denkbar, dass sich ein Transportdefekt ausgelöst durch die Wobbler-Mutation auch in diesen Geweben niederschlägt.

Bisher wurde der schlechte Allgemeinzustand der Wobbler-Mäuse allein der Atrophie und dem Tremor zugeschrieben. Gewichtsverlust und Neurodegeneration treten allerdings eher selten zeitgleich auf, so dass man sie nicht als typische Begleiterscheinung betrachten kann. Nicht zu erklären ist die seit der Erstbeschreibung der Mutation (Falconer et al., 1956) bekannte Tatsache, dass die Gewichtsreduktion der Wobbler-Mäuse ein paar Tage vor Beginn der ersten Anzeichen der Atrophie der Vorderbeine einsetzt. Auch ein vermuteter erhöhter Energiebedarf der Tiere durch den Tremor kann die vor dem Tremor einsetzende Gewichtsreduktion nicht erklären. Zudem zeigen Wobbler-Mäuse, die aus Hybridlinien stammen, unterschiedliche Schweregrade des Tremors, was sich nicht in einer veränderten Gewichtsreduktion niederschlägt. Des Weiteren sind die Tiere im Anfangsstadium der Wobbler-Erkrankung noch in der Lage normal Futter aufzunehmen und werden zudem noch von der Mutter gesäugt, da das Absetzen in der Haltung in der Regel mit 4 Wochen erfolgt. Erste Einschränkungen bei der Futteraufnahme setzen erst deutlich später ein, wenn die Atrophie weiter vorangeschritten ist. Die Gewichtsreduktion verläuft zeitlich gesehen interessanterweise parallel zur Nahrungsumstellung der Mäuse. Kurz nach dem Öffnen der Augen um den 14. Tag beginnen die Jungen festes Futter aufzunehmen. Im Alter von ca. 19 Tagen sind die Jungen vollständig in der Lage sich selbst, unanhängig von der Mutter, zu ernähren. Zum Ende dieser Phase, um den zwanzigsten Tag, ist die Gewichtsreduktion der Wobbler-Mäuse nachweisbar.

Für viele neurodegenerative Erkrankungen ist in der Pathologie eine Cachexia beschrieben. Allerdings ist die Gewichtsreduktion der Wobbler-Mäuse keine Cachexia, da sie nicht als Folge der Neurodegeneration auftritt. Gewichtsreduktionen, die parallel zu einer Neurodegeneration verlaufen sind dagegen eher selten. Gewichtsverluste sind ansonsten nur für wenige Maus-Mutanten beschrieben, die gleichzeitig eine Neurodegeneration aufweisen, z.B. ist für die Niemann-Pick-C (*Npc1*)-Maus, die ein Modell für die Niemann-Pick

Erkrankung Typ C1 (engl. *Niemann-Pick disease*, NPC1, Omim-Nummer: 257220, Neufeld et al., 1999, Chang et al., 2005) darstellt. Hierbei handelt es sich um eine autosomal rezessive vererbte Erkrankung des Lipidstoffwechsels, die zur Neurodegeneration führt (Loftus et al. 2002). Eine Gewichtsreduktion in Verbindung mit einer Neurodegeneration ist ebenfalls für die *Cathepsin F*-defiziente Maus beschrieben. Die Mutante zeigt eine Schwächung der Hinterbeine und ein Gewichtsverlust ab 6 Monaten, sowie Akkumulationen in den Neuronen (Tang et al., 2006). Viele Eigenschaften der *Cathepsin F*-defizienten Mäuse ähneln der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen (engl. *neuronal ceroid lipofuscinosis*, NCL, Omim-Nummer: 256730). NCL ist eine neurodegenerative Erkrankung, die eine Akkumulation von Lipofuszin, einem eisenfreien Abbaupigment aus dem Fettstoffwechsel, in den Neuronen aufweist (Mole, 2005). Außerdem sind für die *MILON-* (*mitochondrial late-onset neurodegeneration*) Maus (Sorensen et al., 2001) Gewichtsreduktionen und Neuronendegenerationen beschrieben. Die postnatale Unterbrechung der oxidativen Phosphorylierung durch die Ausschaltung des Gens *transcription factor A, mitochondrial (Tfam)* in neuronalen Geweben bewirkt bei der *MILON*-Maus eine Neurodegeneration, was diese Maus zu einem Modell für Defekte in der Atmungskettenphosphorylierung und Alterungsprozessen macht (Sorensen et al., 2001). Diese aufgeführten Maus-Mutanten weisen allerdings wenige weitere Gemeinsamkeiten mit der Wobbler-Maus auf.

Eine zu klärende Frage ist, ob die Wobbler-Maus ein bisher unerkanntes Modell für Stoffwechselstörungen darstellt. Ein Defekt, der den Aminosäurestoffwechsel oder die Aufnahme von Stoffen aus der Nahrung beeinträchtigt, könnte zu einer Unterversorgung und so zu einer Gewichtsreduktion führen. Als Folge dieser Unterversorgung wäre bei den betroffenen Tieren eine erhöhte Futteraufnahme zu erwarten und eventuell eine Futterakkumulation im Magen. Um den Phänotyp näher zu charakterisieren, ist eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Magenwände sinnvoll. Auch eine Untersuchung des Magenmilieus und seiner Enzyme könnte die Frage beantworten, ob die Gewichtsreduktion auf einem Defekt im Verdauungssystem beruht.

4.1.4 Vimentinablagerungen

Für degenerative Prozesse in Motoneuronen werden in vielen Fällen Ablagerungen oder Akkumulationen von verschiedenen Proteinen beschrieben (Wood et al., 2003). Häufig werden in diesem Zusammenhang Neurofilamente oder Zytoskelettbestandteile genannt. Auch für die Wobbler-Maus sind eine Reihe von Akkumulationen in den Motoneuronen bekannt, wie Neurofilament mittlere Kette (Nfm), Amyloid Precursor Protein (App) und Ubiquitin-positive Einschlüsse (Boillee et al., 2003). In einem Microarray-Experiment konnte auf Transkript-Ebene eine Fehlregulierung von *Vimentin* (*Vim*) gezeigt werden (Drepper, 2005). In den Motoneuronen von Wobbler-Mäusen konnten mittels Antikörperfärbungen vermehrte punktförmige Ablagerung von Vimentin gezeigt werden. Auch in den Axonen ließen sich Ablagerungen von Vimentin nachweisen (Kapitel 3.3).

Bei Motorneuronen konnten im Rahmen einer Diplomarbeit (Schitek, 2005) Akkumulationen des Amyloid Precursor Proteins (App) nachgewiesen werden. Parallel konnte eine Kolokalisation von App mit Rab7, einem Marker für späte Endosomen nachgewiesen werden. Die Akkumulationen befinden sich ganz im Gegensatz zu den Akkumulationen von Vimentin in der Nähe des Kerns und lassen sich in wenigen relativ großen Endosomen beobachten (Schitek, 2005). Vimentin dagegen akkumuliert nicht vorzugsweise in endosomalen Kompartimenten, sondern in kleineren Mengen über größere Areale verstreut. Neben Vimentin und App finden sich auch vermehrte Ablagerungen von Neurofilamenten mittlere Kette (Nfm), wie sich deutlich erkennen lässt (Kapitel 3.3). Die Akkumulationen befinden sich ähnlich wie beim App in der Nähe des Kerns (Ulbrich et al., 2003). Nfm ist jedoch genau gegensätzlich zu Vimentin reguliert (Drepper, 2005).

Es schließt sich die Frage an, ob eine zeitliche Abfolge der Ablagerungen und Akkumulationen innerhalb der Wobbler-Pathologie existiert, oder ob sich die Ablagerungen untereinander bedingen. Die Aufklärung einer solchen zeitlichen oder kausalen Abfolge könnte helfen den genauen Mechanismus der Degeneration zu verstehen. Nicht auszuschließen ist, dass es sich bei den Ablagerungen und Akkumulationen um einen Sekundäreffekt des gestörten Vesikeltransportes handelt und kein Zusammenhang oder funktionelle Verbindung der abgelagerten Proteine zueinander besteht. Die Kreuzung von heterozygoten Wobbler-Mäusen mit *Vimentin*-defizienten Mäusen kann zur Beantwortung dieser Frage beitragen und wird in einem laufenden Projekt von Robert Heinen bearbeitet.

Eine mögliche Hypothese für die Wobbler-Erkrankung leitet sich aus diesen Akkumulationen ab. Durch Fehler im Vesikeltransport könnte es zu einer Fehlverteilung von Proteinen kommen. Über einen längeren Zeitraum sammeln sich diese an und führen schließlich zum Absterben der Zelle. Da sich in den Motoneuronen der Wobbler-Mäuse verschiedene Ablagerungen und Akkumulationen finden, ist es wahrscheinlich, dass ein genereller Defekt im Transport vorliegt. Auch ist es denkbar, dass bestimmte Proteinen nicht mehr oder nicht in ausreichender Zahl an ihren Bestimmungsort gelangen. So konnte z.B. für die *neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1* (Ntrk1) gezeigt werden, dass dieser Rezeptor von der Zelloberfläche internalisiert wird und über den retrograden Transport zurück auf die Zelloberfläche gebracht wird (Delcroix et al., 2003, Tsui-Pierchala and Ginty, 1999, Watson et al., 2001, Kuruvilla et al., 2004). Ntrk1 übernimmt eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Nervensystems (Mamet et al., 2003). Durch die Störung des retrograden Transportes eines derartigen Rezeptors könnte eine als Ursache der Motoneurondegeneration bei der Wobbler-Maus in Frage kommen.

4.2 BAC-Kompensation und komplex-heterozygote Tiere

Zur Identifizierung des Wobbler-Gens wurde ein so genanntes Transgen-Komplementations-Experiment durchgeführt. Dabei soll durch das Einbringen eines genomischen Abschnittes, welcher die Wildtypsequenz ein oder mehrerer kompletter Gene samt Exons, Introns und Promotorsequenz enthält, ein zusätzliches Wildtyp-Allel zur Verfügung gestellt werden. Im Idealfall kommt so der jeweilige Krankheitsphänotyp nicht zum tragen, da das oder die eingebrachten Gene die Erkrankung kompensieren können.

Auf dem BAC115F6 liegt das Gen *Vps54*, inklusive ca. 60 kb stromauf- und 20 kb stromabwärts Sequenz. Durch eine Punktmutation im Gen *Vps54* erschien diese als der wahrscheinlichste Kandidat für die Wobbler-Mutation. Das Einbringen des BAC115F6 führte zu einer vollständigen Aufhebung des Wobbler-Phänotyps (Kapitel 3.4). Sowohl der neurologische Defekt, die Degeneration der Motoneuronen, als auch der Spermatogenesedefekt sind in den BAC-transgenen Wobbler-Tiere nicht mehr nachzuweisen und die Tiere zeigen keine Unterschiede zu den Wildtypen. Um zu klären, ob es sich bei der *Vps54*-Mutation um die Wobbler-Mutation handelt,

wurden aus der ES-Zelllinie RRI497, die einen integrierten β -geo gene-trap Vektor zwischen dem 5 und 6 Exon des Gens *Vps54* trägt, von unserem Kooperationspartner Chimären hergestellt und mit C57BL/6J-*wr* (*wr/+*) Mäusen verpaart. Die so entstandenen komplex-heterozygoten Mäuse, welche sowohl heterozygot für das Wobbler- als auch das *Vps54* ^{β -geo}-Allel waren, lieferten den Beweis für die Identität des *wr*-Gens (Kapitel 3.5.2). Diese Tiere zeigen den typischen Wobbler-Phänotyp, die Neurodegeneration und den Spermatogenesedefekt. *Vps54* ^{β -geo} und die Wobbler-Mutation verhalten sich folglich allelisch zueinander. Bei der Punktmutation von *Vps54* handelt es sich daher um die gesuchte Wobbler-Mutation.

Durch dieses Experiment konnte geklärt werden, dass es sich bei „wobbler“ um eine einzelne Mutation und nicht wie in der Vergangenheit angenommen eventuell auch um zwei nahe beieinander liegende Mutationen oder eine Mutation mit einem Effekt auf mehr als einem Gen handelt. Gestützt wurde diese Vermutung durch die Tatsache, dass es kein weiteres Mausmodell gibt, bei dem eine Motoneurondegeneration und eine Globozoospermie vorliegt. Die *Gopc*-, *Hrb*-defiziente und *Arz*-Maus wiesen eine sehr ähnliche Globozoospermie auf, aber keinen neuronalen Defekt (Kang-Decker 2001, Yao et al., 2002). Lediglich die Weaver-Maus zeigt sowohl eine Neurodegeneration als auch Spermatogenesedefekt. Allerdings unterscheiden sie sich grundlegend von dem Wobbler-Phänotyp, da die Weaver-Maus gar keine Spermien ausbildet (Harrison und Roffler-Tarlov, 1994) und die Motoneuronen nicht von der Neurodegeneration betroffen sind. Die Weaver-Maus ist zudem ein Modell für Parkinson (Goldowitz und Smeyne, 1995) und nicht wie die Wobbler-Maus für ALS oder SMA. Damit ist die Wobbler-Maus das einzige Mausmodell, das diese beiden sehr unterschiedlichen Phänotypen aufweist.

4.3 *Vps54* ^{β -geo}-Allel

4.6.1 Auffällig heterozygote Tiere

Im Rahmen der Zucht des *Vps54* ^{β -geo}-Alles fielen heterozygote Tiere auf, die einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp hatten. Diese auffällig heterozygoten Tiere zeigen eine Atrophie der Hinterbeine und eine Globozoospermie, was fast der

Wobbler-Pathologie entspricht. Auch zeigen die meisten der Tiere einen Tremor der Kopf- und Halsregion. Die Atrophie wird durch eine Degeneration der Motoneurone verursacht und wird von einer Aktivierung der Astroglia begleitet, wie es für diese Art der Degeneration von Neuronen typisch ist (Kapitel 3.5.3). Die ersten Symptome treten zwischen der dritten und vierten Woche auf. Im Gegensatz zu der klassischen Wobbler-Mutante sind bei den auffällig heterozygoten Tieren zunächst nur die Hinterbeine betroffen und die Atrophie breitet sich schneller aus als bei Wobbler-Mäusen. In der Regel atrophieren die Muskeln der Vorderbeine mit ca. fünf Monaten. Das Auftreten der wobbler-artigen Symptome betrifft nur einen Teil der heterozygoten *Vps54* ^{β -geo}-Tiere, bei etwa 20% konnte dieser beschriebene Phänotyp beobachtet werden.

Bis heute wurden in der Literatur für die heterozygoten Wobbler-Mäuse keine Defekte beschrieben. Die Wobbler-Mutation wird stets rezessiv vererbt. Hinweise, dass es sich bei *Vps54* um ein dosisabhängiges Gen handelt, konnten sich nicht in der Literatur finden lassen. Die für das BAC115F6 transgenen Wobbler-Tiere zeigten bei allen fünf etablierten Linien eine vollständige Rettung, unabhängig davon, ob das BAC115F6 heterozygot oder homozygot vorlag. Auch bei transgenen Tieren ohne das Wobbler-Allel konnte kein Effekt durch die zusätzliche Kopie des Gens *Vps54* beobachtet werden. Daher sind drastische Effekte bei einer erhöhten Kopienzahl von *Vps54* nicht zu erwarten.

Eine mögliche Erklärung für das Auftreten der auffällig heterozygoten Tiere ist eine Haploinsuffizienz. Dazu müsste allerdings ebenfalls wieder eine Dosisabhängigkeit von *Vps54* angenommen werden. Dafür gibt es aber keinen Hinweis. Eine mögliche Haploinsuffizienz hätte eine Penetranz von ca. 20%. Haploinsuffizienzen sind in der Literatur häufig beschrieben und werden auch im Zusammenhang mit Knock-out-Linien erwähnt (Val et al., 2003; Liu et al., 2003). Zur Aufklärung, ob es sich bei den auffällig heterozygoten Tieren um eine Haploinsuffizienz handelt, wäre eine quantitative Untersuchung der mRNA-Menge hilfreich, sowie eine Analyse der Proteinmenge. Im Hinblick auf die Wobbler-Mutation würde das den Schluss nahe legen, dass es sich bei der Punktmutation im letzten Exon um ein milderes Allel handelt als bei dem *Vps54* ^{β -geo}-Allel, da im heterozygoten Zustand das *Vps54* ^{β -geo}-Allel dem Phänotypen der Wobbler-Mäuse sehr ähnlich ist.

Zum jetzigen Zeitpunkt kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass das trunkierte Protein, welches noch das funktionelle *LacZ*-Gen enthält nicht ebenfalls

einen Effekt verursacht. Ob es sich dabei um einen Funktionsgewinn, „*gain of function*“, handelt, muss noch näher untersucht werden. Einen ersten Hinweis könnte das Expressionslevel bei auffällig und unauffälligen heterozygoten Tieren des trunkierten Fusionsproteins liefern.

Ein modifizierender Locus in Form eines *Quantitative Trait Loci* (QTL) kommt ebenfalls als Ursache für die auffällig heterozygoten Tiere in Betracht. Für die Wobbler-Maus sind bisher zwei QTL näher beschrieben, jeweils für die Neurodegeneration und die Spermatogenese. Eine Kartierung eines solchen QTL würde etliche Schwierigkeiten aufwerfen, da die Stämme C57Bl/6J und 129/Ola nur durch relativ wenigen genetischen Markern unterschieden werden können. Einen Hinweis auf einen möglichen QTL könnte die laufende Rückkreuzung in den C57Bl6-Stamm liefern, da ein QTL aus dem 129/Ola-Stamm ausgekreuzt würde das entsprechende Allel des C57Bl6-Stamm permanent vorhanden wäre.

Unabhängig von der Ursache für die auffällig heterozygoten Tiere sind diese den Wobbler-Mäusen phänotypisch sehr ähnlich und unterstützen die Vermutung, dass es sich bei der Wobbler-Mutation eher um einen generellen Funktionsverlust handelt aber und nicht den Verlust oder die Beeinträchtigung einer speziellen Funktion. Eine funktionelle Domäne ist für den Bereich der Punktmutation, die im C-terminalen Bereich liegt, nicht annotiert. In einem „Yeast-two-Hybrid-Screen“ (Drepper, 2005) wurden mögliche Interaktionspartner für den *wobbler*-kritischen Bereich des Proteins identifiziert. Für alle konnte eine schwächere Interaktion mit der Wobbler-Variante im Gegensatz zur Wildtyp-Variante in der Hefe für den C-terminalen Bereich gezeigt werden. Die Validierungen dieser Daten erfolgt derzeit im Rahmen einer Diplomarbeit. Als mögliche Ursachen kommen sowohl ein Verlust der Proteinstabilität von Vps54 als auch der Verlust eines bisher nicht bekannten Bindemotivs in Betracht.

4.6.2 Das homozygote *Vps54* ^{β -geo}-Allel

In der laufenden Zucht der *Vps54* ^{β -geo} Tieren (*Vps54* ^{β -geo/+}) zeigte bis auf die auffällig heterozygoten Mäuse keines der Tiere einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp. Da trotz über 100 Nachkommen kein einziges homozygoten *Vps54* ^{β -geo}-Tier diagnostiziert werden konnte, wurde überprüft, ob das homozygote *Vps54* ^{β -geo}-Allel embryonal letal ist. Dazu wurden Embryonen unterschiedlicher Stadien präpariert

und diagnostiziert. Es zeigte sich, dass die Embryonen um den Embryonaltag 11 (E11) verstarben und bis zum Tag E12,5 fast vollständig von der Mutter resorbiert wurden (Kapital 3.5.4). Am Tag E11,5 waren deutliche Größenunterschiede zwischen *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Embryonen und Wildtypen zu erkennen. Ebenso konnte man verstärkte Blutungen beobachten, was typisch für Absterbeprozesse in diesem Alter ist. Das Absterben der einzelnen Zellen beruht auf dem programmierten Zelltod, der Apoptose, und nicht auf nekrotischen Vorgängen oder anderen Wegen des Zelltods, wie sie z.B. die Motoneurone während ihrer Degeneration in der Wobbler-Maus durchlaufen (Boillee et al., 2003). Erste apoptotische Zellen, die nicht dem entwicklungsbedingten Zelltod zu zuordnen sind, fanden sich am Embryonaltag 9,0. Hier zeigt sich aber kein einheitliches Bild, da sich bei den untersuchten Tieren unterschiedliche Areale von der Apoptose betroffen waren (Kapital 3.5.4, Abb.3.17). Ein bestimmtes Gewebe oder ein Entwicklungsschritt als Ausgangspunkt der Apoptose konnte nicht eingegrenzt werden.

Der für den Embryontod kritische Zeitraum umfasst die Stadien 14 bis 20 (E8,5-12,0), besonders die Stadien 14 und 15 (E8,5 und E9,0), da diese den Beginn der Apoptose kennzeichnen. Die Embryonen haben zu Beginn des Stadiums 14 (E8,5) die Drehung noch nicht vollständig abgeschlossen und so nimmt die Vollendung der Drehung den ersten Teil des Stadiums 14 ein. Das Neuralrohr schließt sich, wobei dieser Vorgang erst zu einem späteren Zeitpunkt abgeschlossen wird und die Linsenplakode beginnt sich auszubilden. Der Herzschlag erfolgt nun regelmäßig und die Anzahl der embryonalen, kernhaltigen Erythrozyten steigt stark an, so dass die Blutzirkulation sichtbar ist. Im Stadium 15 (E9,0) erreicht das Herz eine Schlagfrequenz von 100-110 Schlägen pro Minute. Die Aorta bildet sich und vollendet die Entwicklung im Stadium 15. Die ersten Anlagen des Darms werden gebildet und die drei Hirnbläschen beginnen sich auszubilden. Im Laufe des Stadiums 15 bilden sich alle 3 Hirnbläschen aus, des Weiteren differenzieren sich die Augen und trennen sich vom darüber liegenden Ektoderm. Die Extremitätenknospen bilden sich deutlicher aus. Die größten Veränderungen im Stadium 15 betreffen die neuronalen Gewebe, die sich weiter ausdifferenzieren. Zudem wird der Synthesort der embryonalen, kernhaltigen Erythrozyten vom Dottersack in die Leber verlagert. Die Möglichkeit, dass die Entwicklung der *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Embryonen an einem bestimmten Entwicklungsschritt scheitert und so als Folge die Apoptose eingeleitet wird, erscheint unwahrscheinlich, da zu Beginn der ersten Anzeichen einer nicht

entwicklungsbedingten Apoptose (Kapitel 3.5.4, Abb.3.18) unterschiedliche Regionen im Embryo betroffen sind und die Entwicklung aller Organe weiter bis zum Tag E10,5 fortläuft. Auch betrifft die Apoptose Gewebe, die zwischen E8,5 bis E11,5 keine besonderen Entwicklungsstadien durchlaufen wie z.B. das Bindegewebe in der Nähe des Herzens. Die Entwicklung der *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Embryonen weist im Stadium E11,5 zwar abnormale Myokardialfasern in Muskeln, auch dem Herzmuskel auf, aber es gibt Anzeichen für eine eher allgemeine Retardierung, was am Fehlen der dorsalen Spinalganglien im Rückenmarkskanal und deutlich reduzierter Größe und Gewicht deutlich wird (Schmitt-John et al., 2005).

Eine weitere mögliche Erklärung wäre eine allgemeine Unterversorgung der Zellen des Embryos mit Energie und Nährstoffen. Ein besonders kritischer Zeitpunkt während der Embryonalentwicklung liegt um E10,5, da in diesem Zeitraum ein schlagendes Herz und ein funktionierender Blutkreislauf vorhanden sein muss. Eine Versorgung über Diffusionsvorgänge, wie sie bis zum Stadium 15 (E9,5) erfolgt, ist durch die Größe des Embryos ab dem Stadium 15 nicht mehr möglich. Ein Kreislaufsystem zum Transport der Nähr- und Abfallstoffe wird somit notwendig, um die Versorgung zu gewährleisten und den hohen Energiebedarf des Embryos zu decken.

Viele Embryonen mit Herzdefekten, die durch spontane Mutationen oder Knock-outs verursacht werden, versterben zwischen dem 10,5 und 14,0 Tag der Embryonalentwicklung, was mit dem Absterbezeitpunkt der *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Embryonen übereinstimmt. Häufig werden neben Herzdefekten auch von Fehlentwicklungen der Blutgefäße oder das völlige Fehlen von Erythrozyten beschrieben (Conrad et al., 2004; Yang et al., 2002; Nishii et al., 2003; Conway et al., 1997). Bei der Mehrheit der *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Embryonen konnten Erythrozyten und ein kontrahierender Herzmuskel beobachtet werden, was zusätzlich durch MF20-Färbungen mit dem Vorhandensein von Myosin bestätigt wurde. Makroskopisch waren die Erythrozyten, die durch die Blutgefäße transportiert werden, sichtbar. Ein Absterben der embryonalen Zellen durch eines Herz- oder Kreislaufdefektes erscheint daher unwahrscheinlich.

Eine Unterversorgung mit Nährstoffen kann auch aufgrund von Defekten in der Plazenta verursacht werden. Die Plazenta stellt die Schnittstelle zwischen dem Embryo und der Mutter da und ist der einzige Ort, an dem Nährstoffe von der Mutter an den Embryo und Abfallstoffe von dem Embryo an die Mutter übergeben werden

können. Ein Defekt, der eine Unterversorgung des Embryos zu Folge hat, könnte zu einem den *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Embryonen ähnlichen Phänotyp führen (Sibley et al., 2005). Morphologisch waren keine Veränderungen bei den Plazenten der *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Embryonen erkennbar. Allerdings weist der Knock-out von *Gap junction membrane channel protein beta 2 (Gjb2)* wie bei den *Vps54* ^{β -geo/ β -geo}-Embryonen morphologisch keine größeren Veränderungen an der Plazenta auf, alle Schichten sind in der korrekten Anordnung vorhanden und das Labyrinth voll ausgebildet. *Gjb2*-defiziente Embryonen zeigen neben einer Größenreduktion ab E10,5 auch ein Versterben am Tag E11,5. Im Vergleich zu Wildtypen war die Glukoseaufnahme durch die Plazenta von *Gjb2*-defiziente Embryonen um 60% reduziert (Gabriel et al., 1998). In anderen beschriebenen Fällen weisen die Plazenten häufig starke morphologische Veränderungen auf (Christie et al., 2005; Barak et al., 1999), die über lichtmikroskopische Techniken identifiziert werden können. Ein Beispiel für einen durch Unterversorgung ausgelösten Embryonentod durch Mutationen eines in Transportprozesse involviertes Gen ist das *solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4 (Slc27a4)* Gen. Der Knock-out dieses Gens führt zu einem Absterben der homozygoten Embryonen bis zum Tag E9,5 (Gimeno et al., 2003). *Slc27a4* ist einer der wichtigsten Transporter für nicht veresterte lange Fettsäureketten im Darm. Die morphologischen Veränderungen der Plazenta sind in diesem Fall lichtmikroskopisch deutlich sichtbar.

Eine nähere Untersuchung ist erforderlich um einen Plazentadefekt als Ursache für den Tod der *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Embryonen auszuschließen. Ein Antikörper gegen *Vps54* wäre in diesem Zusammenhang sehr hilfreich, ebenso wie elektronenmikroskopische Aufnahmen der Plazenta. So könnten eventuelle Transportdefekte oder Veränderungen auf zellulärer Ebene in der Plazenta aufgeklärt werden. Interessant sind die Transportvorgänge in beide Richtungen, von der mütterlichen zur embryonalen Seite und zurück.

Als Ursache für den Embryonentod der *Vps54* ^{β -geo}-Embryonen kommt auch ein zellulärer Defekt in Betracht, da der programmierte Zelltod im gleichen Zeitfenster an ganz unterschiedlichen Orten im Embryo eintritt. Ein Transportdefekt, der zwar eine anfängliche Teilungsfähigkeit und Differenzierung der Zellen ermöglicht, aber nach einem gewissen Zeitraum oder Prozessen zum Absterben der Zellen führt, wäre denkbar. In der Literatur sind bisher wenige Defekte bekannt, die aufgrund eines Transportdefektes zum Embryonentod führen. Meist versterben die betroffenen

Embryonen zum Ende der Gastrulation. So ist beispielsweise der Knock-out von *kinesin family member 5B (Kif5b)* letal und führt homozygot am Tag E9-11,5 zum Tod. Kif5b ist involviert in den Mikrotubuli-basierten Transport innerhalb der Zelle. Die Embryonen zeigen deutliche Wachstumsdefizite und weisen keine Drehung auf (Tanaka et al., 1998). Das ist im Vergleich zu den *Vps54* ^{β -geo/ β -geo} Embryonen ein Phänotyp, der deutlich eher in der Entwicklung zum Tragen kommt.

Durch eine Beeinträchtigung im retrograden Transport kann es auch zu einem zeitverzögertem Effekt kommen, da sich ein Defekt auf die Recyclingweg oder Rücktransport auswirken könnte. Nicht auszuschließen wäre ein kumulativer Effekt, wie er auch als Ursache für die Degeneration der Motoneuronen der Wobbler-Maus in Betracht kommt, für die eine Reihe von Ablagerungen und Akkumulationen beschrieben wurden. Ursächlich wäre bei einer derartigen Beeinträchtigung nicht ein konkreter Entwicklungsschritt sondern eine Akkumulation von Defekten, die schließlich im Zelltod münden.

Vps54 nimmt neben der Aufgabe im retrograden Transport von den späten Endosomen zum trans-Golgi-Apparat auch eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung ein, deren genauer Mechanismus auf zellulärer Ebene noch geklärt werden muss.

4.4 Motoneuronendegenerationen und Vesikeltransport

Vps54 wurde erstmalig in der Hefe beschreiben, wo es mit Vps53 und Vps52 den GARP-Komplex bildet (Conibear und Stevens, 2000), der in den retrograden Transport von Vesikeln vom späten Endosom zum Golgi-Apparat involviert ist (Conboy und Cyert, 2000). In Mensch, Maus und Ratte konnte Vps54 von Walter und Mitarbeitern (Walter et al., 2002) identifiziert werden und liegt ähnlich wie in der Hefe als trimerer Komplex mit Vps53 und Vps52 vor (Liewen et al., 2005). In die Hefe konnte eine weitere Bestandteil des GARP-Komplexes identifiziert werden, nämlich Vps51 (Reggiori et al., 2003), welches an der Bindung des GARP-Komplexes an t-SNARES beteiligt ist (Conibear et al., 2003). Allerdings konnte noch kein Homolog für Vps51 bei Säugern identifiziert werden. Es wird angenommen, dass Vps54 als Bestandteil des GARP-Komplexes eine Rolle im Vesikeltransport einnimmt (Liewen et al., 2005). Nach der Identifizierung der Punktmutation in *Vps54* als Wobbler-Mutation

stellt sich nun die Frage nach dem Pathomechanismus und in wieweit der Vesikeltransport in neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle spielt.

Für die Wobbler-Region konnte bisher keine neurodegenerative Erkrankung auf humaner Seite kartiert werden, auch für homologen Regionen der anderen Bestandteile des GARP-Komplexes, *VPS53* und *VPS52*, finden sich keine Loci, die mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind. Für homologen Bereich von *Vps54* ist beim Menschen der Retinitis pigmentosa (RP28, Omim-Nummer.: 606068) Locus kartiert (Kumar et al., 2004, Lord-Grignon et al., 2004). Retinitis pigmentosa ist eine degenerative Erkrankung, die die Photorezeptoren und die Epithelzellen der Retina betrifft und zur Blindheit führt (Dalke und Graw, 2005). Die ursächliche Mutation für RP28 konnte bisher nicht identifiziert werden.

Für die Amyotrophe Lateralsklerose konnten verschiedenen Gene identifiziert werden, die an entweder an Transportprozessen beteiligt sind, oder wo eine Beteiligung möglich erscheint. Mit *Alsin* konnte ein Gen für die ALS Erkrankung identifiziert werden (Yang et al., 2001, Hadano et al., 2001), welches an den endosomalen Membranen lokalisiert ist. Es besitzt eine Rab GTPase Binde- und Aktivatoraktivität und ist ein Guanin-Austausch-Faktor von Rab5 und Rac1 (Topp et al., 2004). Für Rac1 wiederum konnte eine Rolle im Anti-Apoptoseweg gezeigt werden (Kanekura et al., 2005). Funktional wird auf Grund der Lokalisation und der katalytischen Aktivität eine Rolle in der Endozytose für ALS2 vermutet. Für *Senataxin* (*SETX*), oder auch ALS4 genannt, konnte eine „missense“-Mutation festgestellt werden, die eine juvenile autosomal dominante Form der ALS auslöst (Chen et al., 2004, Omim-Nummer.: 602433). Neben ALS wird auch die Ataxia-ocular Apraxia 2 (AOA2, Omim-Nummer.: 606002) durch Mutationen in *Senataxin* ausgelöst (Chen et al., 2006, Moreira et al., 2004). AOA2 ist eine neurodegenerative Erkrankung, die Ataxie, Tremor und eine schwere distale Amyotrophie verursacht (Bouchard et al., 1980). Die betroffenen Patienten weisen eine axonale Neuropathie auf (Duquette et al., 2005). Für das homologe Gen in der Hefe, *Sen1p*, ist eine Helikase-Aktivität beschrieben worden (Kim et al., 1999), die genaue Funktion beim Menschen ist bisher nicht aufgeklärt. *Senataxin* weist eine hohe Homologie zu Regulator of nonsense transcripts 1 (*RENT1*) und Immunoglobulin mu-binding protein 2 (*IGHMBP2*) auf (Chen et al., 2006), so dass Funktion als RNA-Bindeprotein angenommen wird. Ein weiterer identifizierter ALS-Locus ist ALS8. Hierbei handelt es sich um eine „missense“ Mutation im Gen *Vesicle-associated membrane protein-*

associated protein B (VAPB), die zu einem Aminosäureaustausch an Position 56 führt (Nishimura et al., 2005). Da VAPB an Vesikel assoziiert ist, erscheint eine Funktion im Transport wahrscheinlich, zumal die beschriebene Punktmutation Proteinaggregationen auslöst (Nishimura et al., 2004).

Ein Maus-Modell für neurodegenerative Erkrankung konnte durch die Ausschaltung des *Dynactin 1*-Gens (*Dctn1*) in der Maus erzeugt werden (LaMonte et al., 2002), wodurch die Hypothese, dass eine Beeinträchtigung des axonalen Transportes Neurodegenerationen auslöst, bestätigt werden konnte. Eine Überexpression zerstört den Dynein-Dynactin-Komplex und führt so zu einer Beeinträchtigung des axonalen Transportes. In der Pathologie der Mäuse sind auch Proteinakkumulationen beschrieben (LaMonte et al., 2002). Puls und Mitarbeiter konnten innerhalb einer Familie mit einer Motoneurondegeneration, welche eine sehr langsame Progression aufwies und als „*Lower motor neuron disease*“ (LMN) klassifiziert wurde, eine Mutation im *Dynactin 1*-Gen identifizieren (Puls et al., 2003). In einer Untersuchung von ALS Patienten wurde ebenfalls bei einer Patientin eine Mutation im *Dynactin 1*-Gen gefunden (Munch et al., 2004). Mit *Dctn1* ist eine direkte Verbindung zwischen einer Motoneurondegeneration und Vesikeltransport hergestellt werden.

Spinale Muskelatrophien können ebenfalls durch Defekt im Vesikeltransport entstehen. Die vier klassischen Typen der SMN werden durch Mutationen oder Deletionen der Gene SMN1 und SMN2 in der Region 5q13 verursacht (Ogino und Wilson, 2004). Durch eine Reduktion der Proteinmenge von SMN beeinträchtigt den axonalen mRNA Transport und in das Spleißen (Jablonka et al., 2003), wobei SMN nicht allein sondern als Komplex mit anderen Proteinen in den axonalen Transport involviert ist und dort das Mikrofillamentwachstum reguliert (Sharma et al., 2005).

Bei neuronalen Erkrankungen finden sich einige Beispiele, bei denen Defekte im Transport, besonders im axonalen Transport, vorhanden sind. Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnis wird die Frage diskutiert, ob Neurodegenerationen die Folge und nicht die Ursache für gestörte Transportprozesse sind (Jablonka et al., 2003).

Dies lässt vermuten, dass auch bei der Wobbler-Erkrankung eine Störung oder Beeinträchtigung des Vesikeltransportes die Ursache für die Motoneurondegeneration ist, zumal aus der Hefe eine derartige Funktion für Vps54 bekannt ist (Fiedler et al., 2002). Der axonale Transport scheint besonders anfällig für Störungen zu sein, was in eine Neurodegeneration resultieren könnte.

Motoneurone verfügen über die längsten Axone und sind stark auf diesen Transportweg angewiesen. Es wäre somit wahrscheinlich, dass eine Beeinträchtigung des axonalen Transportes besonders in den Motoneuronen zum Tragen kommt. Ein weiterer Hinweis auf eine Verbindung zum Transport wurde in der Hefe gefunden. Es konnte für Vps54 eine Rolle bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts in der Hefe beschreiben werden (Fiedler et al., 2002). Eine weitere Möglichkeit wäre eine allgemeine Beeinträchtigung der Transportprozesse innerhalb der Neurone, die nach einer gewissen Zeit zum Neuronentod führen.

Für den N-terminalen Teil von Vps54 konnte in der Hefe gezeigt werden, dass nur dieser für die Ausbildung des GARP-Komplexes wichtig ist (Quenneville et al., 2006). Damit wäre es möglich, dass der C-terminale Teil andere Aufgaben übernimmt als der N-terminale Teil. Dafür spricht auch eine hohe Konservierung des C-terminalen Teils von Vps54 innerhalb der Säugertiere. Unklar ist bisher jedoch, welche Aufgabe der von der Wobbler-Mutation betroffene Teil von Vps54 übernimmt. Es wäre daher möglich, dass der C-terminale Teil völlig andere Aufgaben innerhalb der Transportprozesse oder auch der Zelle übernimmt.

4.5 Globozoospermien und Vesikeltransport

Die ersten Anzeichen einer Globozoospermie zeigen sich während der Spermatogenese und können durch elektronenmikroskopische Aufnahmen sichtbar gemacht werden (Vegni-Talluri et al., 1977). Defekte während der Akrosomenbildung werden für das Auftreten einer Globozoospermie verantwortlich gemacht. Da die proakrosomalen Vesikel vom Golgi-Apparat abgeschnürt werden und zum Akroplaxom transportiert werden um dort zu fusionieren, erscheint es wahrscheinlich, dass Transportprozesse eine wichtige Rolle während der Akrosombildung spielen. Jedoch sind für Patienten, die an Amyotropher Lateralsklerose (ALS) oder Spinaler Muskelatrophie (SMA) erkrankt sind, weder Globozoospermien noch andere Spermatogenesedefekte in der Literatur beschrieben. Erste Fortschritte in der Aufklärung der genetischen Ursachen für Globozoospermie beim Menschen konnten mit der Identifizierung von Polymorphismen in den *Gopc*-, *Hrb*- und *Csnk2a2*-Genen bei zwei Patienten mit Globozoospermie gemacht werden (Christensen et al. 2006). Die entsprechenden Mausmodelle, die *Gopc*-, *Hrb*- und *Csnk2a2*-defizienten Mäuse, weisen ebenfalls eine Globozoospermie auf und wurden alle vor der Identifizierung

der humanen Polymorphismen generiert (Yao et al., 2002, Kang-Decker et al., 2001, Xu et al., 1999).

Der primäre Defekt der *Gopc*-Maus ist ein Ausbleiben der Fusion der proakrosomalen Vesikel, was durch einen Fehler während des Anheftens, „*tethering*“, verursacht wird. Diese freien Vesikel können noch bis in der Stadium 16 der Spermatogenese im Zytoplasma nachgewiesen werden (Ito et al., 2004). Das humane Homolog von *Gopc* interagiert mit Syntaxin 6 (Charest et al., 2001), für das eine Funktion während des „*Tethering*“ von Post-Golgi-Vesikeln mit den frühen Endosomen angenommen wird (Simonsen et al., 1999). Ebenso wird vermutet, das *Gopc* an dem Transport der Vesikel beteiligt ist (Yao et al., 2001). Im Gegensatz zur Wobbler-Spermien, die größtenteils noch Akrosomenreste am Kopf gebunden haben, fehlt den gereiften Spermien der *Gopc*-defizienten Mäuse das Akrosom vollständig. Jedoch zeigen die Spermien beider Mutanten eine Reduktion bzw. den Verlust der gerichteten Mobilität und ein Abklappen der Köpfe. *Gopc* kann ausschließlich in perinukleären Regionen und am Golgi-Apparat der Spermien nachgewiesen werden (Yao et al., 2002).

Die Spermien der *Hrb*-defizienten Maus zeigen eine verringerte Mobilität und ihre Anzahl ist ebenfalls reduziert. Die Spermatogenese weist während des Schrittes 7 deformierte Kerne auf, ein Akrosom wird nicht angelegt. Die proakrosomalen Vesikel schnüren sich vom Golgi-Apparat ab, aber die Fusion dieser Vesikel schlägt fehl. Die unfusionierten Vesikel sammeln sich zwischen dem Kern und dem Golgi-Apparat. Die Mitochondrien des Mittelstückes weisen ebenfalls eine Fehlanordnung auf, das Akroplaxom wird jedoch angelegt (Kierszenbaum et al., 2004). *Hrb* interagiert mit *epidermal growth factor receptor pathway substrate 15* (*Eps15*), welches ein Vesikeladapterprotein mit Funktionen während der Endozytose und Vesikeltransport ist. Somit wird auch für *Hrb* eine Beteiligung am Vesikeltransport angenommen (Kierszenbaum et al., 2004, Juneja und van Deursen, 2005).

In *Drosophila melanogaster* führt der Verlust des *Vps54*-Homologs *scattered* „*scat*“ zu einem Defekt in der Spermatogenese. Hierbei wird der so genannt „*waste bag*“, welcher Reste des Zytoplasmas enthält, nicht abgestreift, da es zu Defekten in den Motorproteinen kommt (Fabrizio et al., 1998). Somit kann auch hier ein Defekt innerhalb von Transport- oder Motorprozessen angenommen werden.

Die Spermatogenese der Wobbler-Maus weist viele Parallelen zu den Phänotypen der anderen Globozoospermie-Modellen auf, wobei für *Hrb* und *Gopc* angenommen

wird, dass eine Verbindung zum Vesikeltransport besteht. Somit ist es wahrscheinlich, dass auch der Spermatogenesedefekt der Wobbler-Maus auf einen gestörten Vesikeltransport zurückzuführen ist. Die proakrosomalen Vesikel fusionieren zwar noch am Akroplaxom, aber die Streckung über den kondensierten Kern erfolgt nicht mehr. Es wäre daher annehmbar, dass *Vps54* direkt oder indirekt mit den Motorproteinen interagiert. Da *Vps54* möglicherweise an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt ist (Fiedler et al., 2002), wäre eine Verbindung zu den Transportprozessen während der Akrosomenbildung denkbar. Eine besondere Rolle des C-terminalen Teils von *Vps54* erscheint nicht unwahrscheinlich, da die genauen Funktionen bisher nicht bekannt sind (Quenneville et al., 2006). Eine spezifische Rolle während der Akrosombildung wäre somit vorstellbar.

5 Ausblick

Die Identifizierung und nähere Charakterisierung von *Vps54* als von der Wobbler-Mutation betroffenes Gen unterstreicht die Bedeutung von Vesikeltransportprozessen bei Neurodegenerativen Erkrankungen, Spermatogenese und während der Embryonalentwicklung. Basierend auf dieser Arbeit wird eine weitere Charakterisierung des *Vps54* β -*geo*-Alles und die Fertigstellung und Analyse des konditionalen Knock-outs von *Vps54* helfen, ein genaueres Bild der Bedeutung des Vesikeltransportes in unterschiedlichen Geweben und Zeitpunkten zu erhalten. So können neue Erkenntnisse über Neurodegenerationen und Transportprozesse gewonnen werden, um vielleicht einen Beitrag zu leisten neue therapeutische Ansätze zu entwickeln.

Eine der vordringlichsten Aufgaben ist die Sequenzierung humaner ALS Patienten, um aufzuklären, ob *VPS54* oder andere Komponenten des GARP-Komplexes auch beim Menschen in Neurodegeneration involviert sind. Zu diesem Zweck werden derzeit von unserem Kooperationspartner Jörg Bartsch Patientenproben hinsichtlich ähnlicher Akkumulationen wie bei der Wobbler-Pathologie untersucht.

Die Erstellung weiterer Knock-out Mäuse für die anderen Teile des GARP-Komplexes, *Vps53* und *Vps52*, könnte weitere Einblicke in die Funktion des Komplexes für den retrograden Transport liefern. Eine ES-Zelllinie, die eine Integration eines β -*geo gene-trap* Vektor in *Vps52* trägt, wird derzeit angezogen, um mittels Blastozysteninjektion Chimären zu erstellen. Die Charakterisierung des *Vps53*

β -*geo*-Allels kann, ebenso wie bei *Vps54*, dazu beitragen neue Einblicke in die Bedeutung des retrograden Transportes und der Interaktionspartner der einzelnen Komponenten des GARP-Komplexes zu erhalten.

Um die Frage zu klären, ob die Wobbler-Erkrankung auf einem defekten axonalen Transport beruht, ist eine genaue histologische Untersuchung mit geeigneten Antikörpern des Axons notwendig. Ebenso könnte Untersuchung der Endozytose und des Vesikeltransportes in Zellkultur an Wobbler- und *Vps54* ^{β -*geo*}-Zellen weitere Einblicke in die Funktion von *Vps54* ermöglichen.

6 Literaturverzeichnis

- Adham IM, Nayernia K, Burkhardt-Gottges E, Topaloglu O, Dixkens C, Holstein AF, Engel W. (2001) Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2). *Mol Hum Reprod.* 7(6):513-20.
- Augustin M, Heimann P, Rathke S, Jockusch H. (1997) Spinal muscular atrophy gene wobbler of the mouse: evidence from chimeric spinal cord and testis for cell-autonomous function. *Dev Dyn.* 209(3):286-95.
- Baker SM, Bronner CE, Zhang L, Plug AW, Robatzek M, Warren G, Elliott EA, Yu J, Ashley T, Arnheim N, Flavell RA, Liskay RM. (1995) Male mice defective in the DNA mismatch repair gene PMS2 exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. *Cell.* 82(2):309-19.
- Barsch A, Patschkowski T, Niehaus K. (2004) Comprehensive metabolite profiling of *Sinorhizobium meliloti* using gas chromatography-mass spectrometry. *Funct Integr Genomics.* 4(4):219-30.
- Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. (1999) PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell.* 4(4):585-95.
- Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, Yanagisawa M. (1994) Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell.* 79(7):1277-85.
- Berruti G, Martegani E. (2001) MSJ-1, a mouse testis-specific DnaJ protein, is highly expressed in haploid male germ cells and interacts with the testis-specific heat shock protein Hsp70-2. *Biol Reprod.* 65(2):488-95.
- Berruti G, Perego L, Borgonovo B, Martegani E. (1998) MSJ-1, a new member of the DNAJ family of proteins, is a male germ cell-specific gene product. *Exp Cell Res.* 15:239(2):430-41.
- Blondet B, Ait-Ikhlef A, Murawsky M, Rieger F. (2001) Transient massive DNA fragmentation in nervous system during the early course of a murine neurodegenerative disease. *Neurosci Lett.* 305(3):202-6.
- Boillee S, Peschanski M, Junier MP. (2003) The wobbler mouse: a neurodegeneration jigsaw puzzle. *Mol Neurobiol.* 28(1):65-106.
- Bommel H, Xie G, Rossoll W, Wiese S, Jablonka S, Boehm T, Sendtner M. (2002) Missense mutation in the tubulin-specific chaperone E (Tbce) gene in the mouse mutant progressive motor neuronopathy, a model of human motoneuron disease. *J Cell Biol.* 159(4):563-9.
- Bordet T, Lesbordes JC, Rouhani S, Castelnaud-Ptakhine L, Schmalbruch H, Haase G, Kahn A. (2001) Protective effects of cardiotrophin-1 adenoviral gene transfer on neuromuscular degeneration in transgenic ALS mice. *Hum Mol Genet.* 10(18):1925-33.
- Bossy-Wetzell E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. (2004) Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med.* 10 Suppl:S2-9.
- Brujin LI, Miller TM, Cleveland DW. (2004) Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci.* 27:723-49.
- Chance, P. F.; Rabin, B. A.; Ryan, S. G.; Ding, Y.; Scavina, M.; Crain, B.; Griffin, J. W.; Cornblath, D. R. (1998) Linkage of the gene for an autosomal dominant form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 9q34. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 633-640.
- Chang TY, Reid PC, Sugii S, Ohgami N, Cruz JC, Chang CC. (2005) Niemann-Pick type C disease and intracellular cholesterol trafficking. *J Biol Chem.* 280(22):20917-20.
- Charest A, Lane K, McMahon K, Housman DE. (2001) Association of a novel PDZ domain-containing peripheral Golgi protein with the Q-SNARE (Q-soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) attachment protein receptor) protein syntaxin 6. *J Biol Chem.* 276(31):29456-65.

- Chen, Y.-Z.; Bennett, C. L.; Huynh, H. M.; Blair, I. P.; Puls, I.; Irobi, J.; Dierick, I.; Abel, A.; Kennerson, M. L.; Rabin, B. A.; Nicholson, G. A.; Auer-Grumbach, M.; Wagner, K.; De Jonghe, P.; Griffin, J. W.; Fischbeck, K. H.; Timmerman, V.; Cornblath, D. R.; Chance, P. F. (2004) DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am. J. Hum. Genet.* 74: 1128-1135.
- Christensen GL, Ivanov IP, Atkins JF, Campbell B, Carrell DT. (2006) Identification of polymorphisms in the Hrb, GOPC, and Csnk2a2 genes in two men with globozoospermia. *J Androl.*;27(1):11-5.
- Chomczynski P, Sacchi N.(1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*;162(1):156-9.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH Jr, Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW. (2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science.* 302(5642):113-7.
- Conboy MJ, Cyert MS. (2000) Luv1p/Rki1p/Tcs3p/Vps54p, a yeast protein that localizes to the late Golgi and early endosome, is required for normal vacuolar morphology. *Mol Biol Cell.*;11(7):2429-43.
- Conibear E, Stevens TH. (2000) Vps52p, Vps53p, and Vps54p form a novel multisubunit complex required for protein sorting at the yeast late Golgi. *Mol Biol Cell.*;11(1):305-23.
- Conrad M, Jakupoglu C, Moreno SG, Lippl S, Banjac A, Schneider M, Beck H, Hatzopoulos AK, Just U, Sinowatz F, Schmahl W, Chien KR, Wurst W, Bornkamm GW, Brielmeier M. Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Mol Cell Biol.* 24(21):9414-23.
- Conway SJ, Godt RE, Hatcher CJ, Leatherbury L, Zolotouchnikov VV, Brotto MA, Copp AJ, Kirby ML, Creazzo TL. (1997) Neural crest is involved in development of abnormal myocardial function. *J Mol Cell Cardiol.* 29(10):2675-85.
- Cox GA, Mahaffey CL, Frankel WN. (1998) Identification of the mouse neuromuscular degeneration gene and mapping of a second site suppressor allele. *Neuron.* 21(6):1327-37.
- Christie GR, Williams DJ, Macisaac F, Dickinson RJ, Rosewell I, Keyse SM. (2005) The dual-specificity protein phosphatase DUSP9/MKP-4 is essential for placental function but is not required for normal embryonic development. *Mol Cell Biol.* 25(18):8323-33.
- Dalke C, Graw J. (2005) Mouse mutants as models for congenital retinal disorders. *Exp Eye Res.*;81(5):503-12.
- De Kretser DM, Baker HW. (1999) Infertility in men: recent advances and continuing controversies. *J Clin Endocrinol Metab.*;84(10):3443-50.
- Delcroix JD, Valletta JS, Wu C, Hunt SJ, Kowal AS, Mobley WC. NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron.* ;39(1):69-84.
- Drepper C, (2005) Identifizierung und Charakterisierung des krankheitsauslösenden Gens in einem Mausmodell für humane Motoneuronerkrankungen, Dissertation, *Universität Bielefeld*
- Duchen LW, Strich SJ. (1968) An hereditary motor neurone disease with progressive denervation of muscle in the mouse: the mutant 'wobbler'. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 31(6):535-42.
- Duquette, A.; Roddier, K.; McNabb-Baltar, J.; Gosselin, I.; St-Denis, A.; Dicaire, M.-J.; Loisel, L.; Labuda, D.; Marchand, L.; Mathieu, J.; Bouchard, J.-P.; Brais, B. (2005) Mutations in senataxin responsible for Quebec cluster of ataxia with neuropathy. *Ann. Neurol.* 57: 408-414.
- Escalier D. (1990) Failure of differentiation of the nuclear-perinuclear skeletal complex in the round-headed human spermatozoa. *Int J Dev Biol.* 34(2):287-97.
- Fabrizio JJ, Hime G, Lemmon SK, Bazinet C. (1998) Genetic dissection of sperm individualization in *Drosophila melanogaster*. *Development.*;125(10):1833-43.
- Falconer DS, [Wobbler (wr)], *Mouse News Lett* 1956;15:23.

- Fiedler TA, Karpova TS, Fleig U, Young ME, Cooper JA, Hegemann JH. (2002) The vesicular transport protein Cgp1p/Vps54p/Tcs3p/Luv1p is required for the integrity of the actin cytoskeleton. *Mol Genet Genomics.*;268(2):190-205.
- Forman MS., Trojanowski JQ., Lee VM. (2004) Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med.*;10(10):1055-63.
- Fuchs S, Resch K, Thiel C, Ulbrich M, Platzer M, Jockusch H, Schmitt-John T. (2002) Comparative transcription map of the wobbler critical region on mouse chromosome 11 and the homologous region on human chromosome 2p13-14. *BMC Genet.* 3:14.
- Gabriel HD; Jung D; Butzler C; Temme A; Traub O; Winterhager E ; Willecke K (1998) Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J Cell Biol.* 140(6):1453-61.
- Giess R, Beck M, Goetz R, Nitsch RM, Toyka KV, Sendtner M. (2000) Potential role of LIF as a modifier gene in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 54(4):1003-5.
- Gimeno RE, Hirsch DJ, Punreddy S, Sun Y, Ortegon AM, Wu H, Daniels T, Stricker-Krongrad A, Lodish HF, Stahl A. (2003) Targeted deletion of fatty acid transport protein-4 results in early embryonic lethality. *J Biol Chem.*;278(49):49512-6.
- Gliki G, Ebnet K, Aurrand-Lions M, Imhof BA, Adams RH. (2004) Spermatid differentiation requires the assembly of a cell polarity complex downstream of junctional adhesion molecule-C. *Nature.* 16;431(7006):320-4.
- Goldowitz D, Smeyne RJ. (1995) Tune into the weaver channel. *Nat Genet.* 11(2):107-9.
- Gonzalez L, Martin S, Houston FE, Hunter N, Reid HW, Bellworthy SJ, Jeffrey M. (2005) Phenotype of disease-associated PrP accumulation in the brain of bovine spongiform encephalopathy experimentally infected sheep. *J Gen Virol.* 86:827-38.
- Grohmann K, Schuelke M, Diers A, Hoffmann K, Lucke B, Adams C, Bertini E, Leonhardt-Horti H, Muntoni F, Ouvrier R, Pfeufer A, Rossi R, Van Maldergem L, Wilmschurst JM, Wienker TF, Sendtner M, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K, Hubner C. (2001) Mutations in the gene encoding immunoglobulin mu-binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Nat Genet.* 29(1):75-7.
- Gusella, J.F. and MacDonald, M.E. (2000) Molecular genetics: unmasking polyglutamine triggers in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, 1, 109–115.
- Hadano S, Hand CK, Osuga H, Yanagisawa Y, Otomo A, Devon RS, Miyamoto N, Showguchi-Miyata J, Okada Y, Singaraja R, Figlewicz DA, Kwiatkowski T, Hosler BA, Sagie T, Skaug J, Nasir J, Brown RH Jr, Scherer SW, Rouleau GA, Hayden MR, Ikeda JE. (2001) A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet.* 29(2):166-73.
- Hahn P, (2004) Detaillierte Sequenzanalyse der Gene im *wobbler*-kritischen Bereich und Identifikation einer Mutation in einem Kandidatengen. Diplomarbeit, *Universität Bielefeld*
- Harrison SM, Roffler-Tarlov S. (1994) Male-sterile phenotype of the neurological mouse mutant weaver. *Dev Dyn.* 200(1):26-38.
- Hawkins SA, Nevin NC, Harding AE. (1990) Pontobulbar palsy and neurosensory deafness (Brown-Vialetto-Van Laere syndrome) with possible autosomal dominant inheritance. *J Med Genet.*27(3):176-9.
- Heimann P, Laage S, Jockusch H. (1991) Defect of sperm assembly in a neurological mutant of the mouse, wobbler (WR). *Differentiation.* 47(2):77-83.
- Hilbush BS, Morrison JH, Young WG, Sutcliffe JG, Bloom FE. (2005) New prospects and strategies for drug target discovery in neurodegenerative disorders. *NeuroRx.* 2(4):627-37.
- Hirano A, Donnemfeld H, Sasaki S, Nakano I. (1984) Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 43(5):461-70.
- Ho YS; Gargano M; Cao J; Bronson RT; Heimler I; Hutz RJ, (1998) Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase., *J Biol Chem.* 27;273(13):7765-9.

- Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH, Li H. (2000) A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet.* 24(1):66-70.
- Hughenoltz AP, [Abnormal spermatazoon head shape], *Mouse News Lett* 1984;71:35.
- Ikeda K, Kinoshita M, Tagaya N, Shiojima T, Taga T, Yasukawa K, Suzuki H, Okano A. (1996) Coadministration of interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor delays progression of wobbler mouse motor neuron disease. *Brain Res.* 726(1-2):91-7.
- Irobi J, Van Impe K, Seeman P, Jordanova A, Dierick I, Verpoorten N, Michalik A, De Vriendt E, Jacobs A, Van Gerwen V, Vennekens K, Mazanec R, Tournev I, Hilton-Jones D, Talbot K, Kremensky I, Van Den Bosch L, Robberecht W, Van Vandekerckhove J, Broeckhoven C, Gettemans J, De Jonghe P, Timmerman V. (2004) Hot-spot residue in small heat-shock protein 22 causes distal motor neuropathy. *Nat Genet.* 36(6):597-601.
- La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH. (1991) Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature.* 352(6330):77-9.
- Ito C, Suzuki-Toyota F, Maekawa M, Toyama Y, Yao R, Noda T, Toshimori K. (2004) Failure to assemble the peri-nuclear structures in GOPC deficient spermatids as found in round-headed spermatozoa. *Arch Histol Cytol.* 67(4):349-60.
- Jablonka S, Sendtner M. (2003) Molecular and cellular basis of spinal muscular atrophy. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.*;4(3):144-9.
- Juneja SC, van Deursen JM. (2005) A mouse model of familial oligoasthenozoospermia. *Hum Reprod.*;20(4):881-93.
- Kanekura K, Hashimoto Y, Kita Y, Sasabe J, Aiso S, Nishimoto I, Matsuoka M. (2005) A Rac1/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt3 anti-apoptotic pathway, triggered by AlsinLF, the product of the ALS2 gene, antagonizes Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) mutant-induced motoneuronal cell death. *J Biol Chem.* 280(6):4532-43.
- Kang-Decker N, Mantchev GT, Juneja SC, McNiven MA, van Deursen JM. (2001) Lack of acrosome formation in Hrb-deficient mice. *Science.* 294(5546):1531-3.
- Kaupmann K, Simon-Chazottes D, Guenet JL, Jockusch H. (1992) Wobbler, a mutation affecting motoneuron survival and gonadal functions in the mouse, maps to proximal chromosome 11. *Genomics.* 13(1):39-43.
- Kierszenbaum AL, Tres LL. (2004) The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol.* 67(4):271-84.
- Kierszenbaum AL, Tres LL, Rivkin E, Kang-Decker N, van Deursen JM. (2004) The acroplaxome is the docking site of Golgi-derived myosin Va/Rab27a/b- containing proacrosomal vesicles in wild-type and Hrb mutant mouse spermatids. *Biol Reprod.* 70(5):1400-10.
- Kim HD, Choe J, Seo YS. (1999) The sen1(+) gene of *Schizosaccharomyces pombe*, a homologue of budding yeast SEN1, encodes an RNA and DNA helicase. *Biochemistry.*;38(44):14697-710.
- Kobayashi Y; Watanabe M; Okada Y; Sawa H; Takai H; Nakanishi M; Kawase Y; Suzuki H; Nagashima K; Ikeda K; Motoyama N, Hydrocephalus, situs inversus, chronic sinusitis, and male infertility in DNA polymerase lambda-deficient mice: possible implication for the pathogenesis of immotile cilia syndrome., *Mol Cell Biol.* 2002 Apr;22(8):2769-76.
- Kunst CB, Messer L, Gordon J, Haines J, Patterson D. (2000) Genetic mapping of a mouse modifier gene that can prevent ALS onset. *Genomics.* 70(2):181-9.
- Kumar A, Shetty J, Kumar B, Blanton SH. (2004) Confirmation of linkage and refinement of the RP28 locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa on chromosome 2p14-p15 in an Indian family. *Mol Vis.*;10:399-402.
- Kuruvilla R, Zweifel LS, Glebova NO, Lonze BE, Valdez G, Ye H, Ginty DD. A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling. *Cell.*;118(2):243-55.
- Laage S, Zobel G, Jockusch H. (1988) Astrocyte overgrowth in the brain stem and spinal cord of mice affected by spinal atrophy, wobbler. *Dev Neurosci.* 10(3):190-8.

- Lalonde L, Langlais J, Antaki P, Chapdelaine A, Roberts KD, Bleau G. (1988) Male infertility associated with round-headed acrosomeless spermatozoa. *Fertil Steril.* 49(2):316-21.
- Lane PW, Weaver, wv, Mouse News Lett 1964;30:32.
- LaMonte BH, Wallace KE, Holloway BA, Shelly SS, Ascano J, Tokito M, Van Winkle T, Howland DS, Holzbaur EL. (2002) Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron.* 34(5):715-27.
- Leestma JE, Sepsenwol S. (1980) Sperm tail axoneme alterations in the Wobbler mouse. *J Reprod Fertil.* 58(1):267-70.
- Ley L, Herdegen T (2004) Neuroprotektive Therapien für neurodegenerative Erkrankungen. *Arzneimitteltherapie* 22:328-35.
- Liewen H, Meinhold-Heerlein I, Oliveira V, Schwarzenbacher R, Luo G, Wadle A, Jung M, Pfreundschuh M, Stenner-Liewen F. (2005) Characterization of the human GARP (Golgi associated retrograde protein) complex. *Exp Cell Res.*;306(1):24-34.
- Liu W, Selever J, Lu MF, Martin JF. (2003) Genetic dissection of Pitx2 in craniofacial development uncovers new functions in branchial arch morphogenesis, late aspects of tooth morphogenesis and cell migration. *Development.* 130(25):6375-85.
- Loftus SK, Erickson RP, Walkley SU, Bryant MA, Incao A, Heidenreich RA, Pavan WJ. (2002) Rescue of neurodegeneration in Niemann-Pick C mice by a prion-promoter-driven Npc1 cDNA transgene. *Hum Mol Genet.* 11(24):3107-14.
- Lord-Grignon J, Tetreault N, Mears AJ, Swaroop A, Bernier G. (2004) Characterization of new transcripts enriched in the mouse retina and identification of candidate retinal disease genes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;45(9):3313-9.
- Mamet J, Lazdunski M, Voilley N. (2003) How nerve growth factor drives physiological and inflammatory expressions of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons. *J Biol Chem.*;278(49):48907-13.
- Manly KF, Cudmore RH Jr, Meer JM. (2001) Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mamm Genome.*;12(12):930-2.
- McManamny P, Chy HS, Finkelstein DI, Craythorn RG, Crack PJ, Kola I, Cheema SS, Horne MK, Wreford NG, O'Bryan MK, De Kretser DM, Morrison JR. (2002) A mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 11(18):2103-11.
- Meccariello R, Cobellis G, Berruti G, Junier MP, Ceriani M, Boilee S, Pierantoni R, Fasano S. (2002) Mouse sperm cell-specific DnaJ first homologue: an evolutionarily conserved protein for spermiogenesis. *Biol Reprod.* 66(5):1328-35.
- Megarbane, A.; Desguerres, I.; Rizkallah, E.; Delague, V.; Nabbout, R.; Barois, A.; Urtizbera, A. (2000) Brown-Vialetto-Van Laere syndrome in a large inbred Lebanese family: confirmation of autosomal recessive inheritance? *Am. J. Med. Genet.* 92: 117-121.
- Meistrich ML, Trostle-Weige PK, Russell LD. (1990) Abnormal manchette development in spermatids of azh/azh mutant mice. *Am J Anat.* 188(1):74-86.
- Mendoza-Lujambio I, Burfeind P, Dixkens C, Meinhardt A, Hoyer-Fender S, Engel W, Neesen J. (2002) The Hook1 gene is non-functional in the abnormal spermatozoon head shape (azh) mutant mouse. *Hum Mol Genet.* 11(14):1647-58.
- Merry DE, Korsmeyer SJ. (1997) Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 20:245-67.
- Mitsumoto H, Bradley WG. (1982) Murine motor neuron disease (the wobbler mouse): degeneration and regeneration of the lower motor neuron. *Brain.* 105 (Pt 4):811-34.
- Mitsumoto H, Ikeda K, Klinkosz B, Cedarbaum JM, Wong V, Lindsay RM. (1994) Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF. *Science.* 265(5175):1107-10.
- Mole SE. (2005) Batten's disease: eight genes and still counting? *Lancet.* 354(9177):443-5.
- Monani UR, Coovert DD, Burghes AH. (2000) Animal models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.*;9(16):2451-7.

- Moreno RD, Palomino J, Schatten G. (2006) Assembly of spermatid acrosome depends on microtubule organization during mammalian spermiogenesis. *Dev Biol.*; [Epub ahead of print]
- Munch C, Sedlmeier R, Meyer T, Homberg V, Sperfeld AD, Kurt A, Prudlo J, Peraus G, Hanemann CO, Stumm G, Ludolph AC. (2004) Point mutations of the p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in ALS. *Neurology.*;63(4):724-6.
- Mussmann A (2002) Kartierung und Charakterisierung eines Modifizierlocus für den Spermatogenesedefekt der Wobbler-Maus, Diplomarbeit, *Universität Bielefeld*
- Neufeld EB, Wastney M, Patel S, Suresh S, Cooney AM, Dwyer NK, Roff CF, Ohno K, Morris JA, Carstea ED, Incardona JP, Strauss JF 3rd, Vanier MT, Patterson MC, Brady RO, Pentchev PG, Blanchette-Mackie EJ. (1999) The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *J Biol Chem.* 274(14):9627-35.
- Nieschlag, E [Übers.],(1993) WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion, 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Deutschland
- Nishii K, Kumai M, Shibata Y (2001) Regulation of the epithelial-mesenchymal transformation through gap junction channels in heart development. *Trends Cardiovasc Med.* 11(6):213-8.
- Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HC, Richieri-Costa A, Middleton S, Cascio D, Kok F, Oliveira JR, Gillingwater T, Webb J, Skehel P, Zatz M. (2004) A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet.*;75(5):822-31.
- Ogino S, Wilson RB. (2002) Genetic testing and risk assessment for spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Genet.* 111(6):477-500.
- Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S, Prevetie D, Kuan CY, Rakic P. (2001) Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J Neurosci.* 21(13):4752-60.
- Palade G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science.*;189(4200):347-58.
- Paushkin S, Gubitza AK, Massenet S, Dreyfuss G. (2002) The SMN complex, an assemblyosome of ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol.* 14(3):305-12.
- Pringle CE, Hudson AJ, Munoz DG, Kiernan JA, Brown WF, Ebers GC. (1992) Primary lateral sclerosis. Clinical features, neuropathology and diagnostic criteria. *Brain.* 115:495-520.
- Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, Holzbaur EL, Tokito M, Mann E, Floeter MK, Bidus K, Drayna D, Oh SJ, Brown RH Jr, Ludlow CL, Fischbeck KH. (2003) Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet.*;33(4):455-6.
- Quenneville NR, Chao TY, McCaffery JM, Conibear E. (2006) Domains within the GARP subunit Vps54 confer separate functions in complex assembly and early endosome recognition. *Mol Biol Cell.*;17(4):1859-70.
- Rathke-Hartlieb S, Schmidt VC, Jockusch H, Schmitt-John T, Bartsch JW. (1999) Spatiotemporal progression of neurodegeneration and glia activation in the wobbler neuropathy of the mouse. *Neuroreport.* 8;10(16):3411-6.
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH Jr, Scott RW, Snider WD. (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet.* 13(1):43-7.
- Reggiori F, Wang CW, Stromhaug PE, Shintani T, Klionsky DJ (2003) Vps51 is part of the yeast Vps fifty-three tethering complex essential for retrograde traffic from the early endosome and Cvt vesicle completion. *J Biol Chem.*;278(7):5009-20.
- Rosen, D. R.; Siddique, T.; Patterson, D.; Figlewicz, D. A.; Sapp, P.; Hentati, A.; Donaldson, D.; Goto, J.; O'Regan, J. P.; Deng, H.-X.; Rahmani, Z.; Krizus, A.; and 21 others (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 362: 59-62.

- Sanchez MP; Silos-Santiago I; Frisen J; He B; Lira SA; Barbacid M, Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF., *Nature*. 382(6586):70-3.
- Scharf JM, Endrizzi MG, Wetter A, Huang S, Thompson TG, Zerres K, Dietrich WF, Wirth B, Kunkel LM. (1998) Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics. *Nat Genet*. 20(1):83-6.
- Schapira AH. (2005) Present and future drug treatment for Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 76(11):1472-8.
- Schitek S (2005) Immunhistologische Untersuchung der Wobbler- Maus und Identifizierung der Kolo-kalisation von APP und Rab7. Diplomarbeit, *Universität Bielefeld*
- Schmitt VC, (2002) Erzeugung von genetisch veränderten Mäusen. Versuche zur transgenen Rettung der wobbler Mutation der Maus. Dissertation, *Universität Bielefeld*
- Schmitt-John T, Drepper C, Musmann A, Hahn P, Kuhlmann M, Thiel C, Hafner M, Lengeling A, Heimann P, Jones JM, Meisler MH, Jockusch H. (2005) Mutation of Vps54 causes motor neuron disease and defective spermiogenesis in the wobbler mouse. *Nat Genet*. 37(11):1213-5.
- Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V. (1994) Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature*. 367(6461):380-3.
- Sennvik K, Fastbom J, Blomberg M, Wahlund LO, Winblad B, Benedikz E. (2000) Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett*. 278(3):169-72.
- Sharma A, Lambrechts A, Hao le T, Le TT, Sewry CA, Ampe C, Burghes AH, Morris GE. A role for complexes of survival of motor neurons (SMN) protein with gemins and profilin in neurite-like cytoplasmic extensions of cultured nerve cells. *Exp Cell Res*.;309(1):185-97.
- Sibley CP, Turner MA, Cetin I, Ayuk P, Boyd CA, D'Souza SW, Glazier JD, Greenwood SL, Jansson T, Powell T. Placental phenotypes of intrauterine growth. *Pediatr Res*.;58(5):827-32.
- Simonsen A, Gaullier JM, D'Arrigo A, Stenmark H. (1999) The Rab5 effector EEA1 interacts directly with syntaxin-6. *J Biol Chem*. 274(41):28857-60.
- Singh G. (1992) Ultrastructural features of round-headed human spermatozoa. *Int J Fertil*. 37(2):99-102.
- Szczygiel M, Kurpisz M. (1999) Teratozoospermia and its effect on male fertility potential. *Andrologia*.;31(2):63-75.
- Tanaka Y, Kanai Y, Okada Y, Nonaka S, Takeda S, Harada A, Hirokawa N. (1998) Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell*. 93(7):1147-58.
- Tang CH, Lee JW, Galvez MG, Robillard L, Mole SE, Chapman HA. (2006) Murine cathepsin F deficiency causes neuronal lipofuscinosis and late-onset neurological disease. *Mol Cell Biol*. 26(6):2309-16.
- Tippmann F, (2004) Test einer Erythropoietin-basierten Therapie der spinalen Muskelatrophie Wobbler der Maus. Diplomarbeit, *Universität Bielefeld*
- Tofaris GK, Spillantini MG. (2005) Alpha-synuclein dysfunction in Lewy body diseases. *Mov Disord*. 12:S37-44.
- Topp JD, Gray NW, Gerard RD, Horazdovsky BF. (2005) Alsln is a Rab5 and Rac1 guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem*. 279(23):24612-23.
- Tsui-Pierchala BA, Ginty DD. (1999) Characterization of an NGF-P-TrkA retrograde-signaling complex and age-dependent regulation of TrkA phosphorylation in sympathetic neurons. *J Neurosci*.;19(19):8207-18.
- Ulbrich M (2003) Genetische Analyse eines modifizierenden Gen-Locus für den neurologischen Phänotyp der Wobbler Maus. Dissertation, *Universität Bielefeld*

- Ulbrich M, Schmidt VC, Ronsiek M, Mussmann A, Bartsch JW, Augustin M, Jockusch H, Schmitt-John T. (2002) Genetic modifiers that aggravate the neurological phenotype of the wobbler mouse. *Neuroreport*. 13(4):535-9.
- Val P, Lefrancois-Martinez AM, Veyssiere G, Martinez A. (2003) SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nucl Recept*. 1(1):8.
- Vegni-Talluri M, Menchini-Fabris F, Renieri T. (1977) A possible haploid effect in acrosome malformations of human spermatozoa. *Andrologia*.;9(4):315-22.
- Walenta JH, Didier AJ, Liu X, Kramer H. (2001) The Golgi-associated hook3 protein is a member of a novel family of microtubule-binding proteins. *J Cell Biol*. 152(5):923-34.
- Wancata J, Musalek M, Alexandrowicz R, Krautgartner M. (2003) Number of dementia sufferers in Europe between the years 2000 and 2050. *Eur Psychiatry*.;18(6):306-13.
- Watson HA, Cope MJ, Groen AC, Drubin DG, Wendland B. (2001) In vivo role for actin-regulating kinases in endocytosis and yeast epsin phosphorylation. *Mol Biol Cell*.;12(11):3668-79.
- Welch HG, Walsh JS, Larson EB. (1988) The cost of institutional care in Alzheimer's disease: nursing home and hospital use in a prospective cohort. *J Am Geriatr Soc*. 40(3):221-4.
- Winter S, Ludolph AC (2004) Kapitel 2.4: Motoneuronerkrankungen. In: Winkler J, Ludolph AC Hrsg. Neurodegenerative Erkrankungen des Alters. Georg Thieme Verlag
- Wishart MJ, Dixon JE. (2004) The archetype STYX/dead-phosphatase complexes with a spermatid mRNA-binding protein and is essential for normal sperm production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(4):2112-7.
- Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL. (1995) An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*. 14(6):1105-16.
- Wood JD, Beaujeux TP, Shaw PJ.(2003) Protein aggregation in motor neurone disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol*.;29(6):529-45.
- Yamanaka K, Vande Velde C, Eymard-Pierre E, Bertini E, Boespflug-Tanguy O, Cleveland DW. (2003) Unstable mutants in the peripheral endosomal membrane component ALS2 cause early-onset motor neuron disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23;100(26):16041-6.
- Yang HT, Ren J, Laughlin MH, Terjung RL. (2002) E Prior exercise training produces NO-dependent increases in collateral blood flow after acute arterial occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 282(1):H301-10.
- Yang, W.; Dunlap, J. R.; Andrews, R. B.; Wetzel, R. (2002) Aggregated polyglutamine peptides delivered to nuclei are toxic to mammalian cells. *Hum. Molec. Genet*. 11: 2905-2917.
- Yang WX, Sperry AO. (2003) C-terminal kinesin motor KIFC1 participates in acrosome biogenesis and vesicle transport. *Biol Reprod*. 69(5):1719-29.
- Yang, Y.; Hentati, A.; Deng, H.-X.; Dabbagh, O.; Sasaki, T.; Hirano, M.; Hung, W.-Y.; Ouahchi, K.; Yan, J.; Azim, A. C.; Cole, N.; Gascon, G.; Yagmour, A.; Ben-Hamida, M.; Pericak-Vance, M.; Hentati, F.; Siddique, T. (2001) The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genet*. 29: 160-165.
- Yao R, Maeda T, Takada S, Noda T. (2001) Identification of a PDZ domain containing Golgi protein, GOPC, as an interaction partner of frizzled. *Biochem Biophys Res Commun*. 286(4):771-8.
- Yao R; Ito C; Natsume Y; Sugitani Y; Yamanaka H; Kuretake S; Yanagida K; Sato A; Toshimori K; Noda T, (2002) Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(17):11211-6.
- Xu X, Toselli PA, Russell LD, Seldin DC. (1999) Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit. *Nat Genet*. 23(1):118-21.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| °C | Grad Celsius |
| Abb. | Abbildung |
| AD | engl. <i>Alzheimer's disease</i> , Alzheimer-Erkrankung |
| ALS | Amyotrophe Lateralsklerose |
| App | engl. <i>Amyloid Precursor Protein</i> |
| BAC | <i>bacterial artificial chromosome</i> , künstliches bakterielles Chromosom |
| BLAST | Basic local alignment search tool |
| bp | Basenpaare |
| BSA | <i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin |
| cDNA | <i>copy DNA</i> |
| CH | Chorea Huntington |
| cm | Zentimeter |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| dHMN2 | TypII hereditäre Motor Neuropathie |
| DNA | engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTPs | Desoxyribonukleotide |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| et al. | latein. und andere |
| F ₁ | Erste Filialgeneration |
| F ₂ | Zweiten Filialgeneration |
| fALS | familiäre ALS |
| g | Erdbeschleunigung |
| g | Gramm |
| h | Stunde |
| IPTG | Isopropyl-beta-D-1-thiogalacto-pyranoside |
| k | Kilo |
| kDa | Kilodalton |
| l | Liter |
| LB | Luria-Bertani |
| M | molar |
| M | milli |
| Mb | Megabasen |
| ml | Milliliter |
| mRNA | Messenger RNA |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| n | Nanometer |
| OMIM | <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> |
| PBS | engl. <i>phosphate buffered saline</i> |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PD | engl. <i>Parkinson's disease</i> , Parkinson-Erkrankung |
| pH | Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration |
| p.n. | Post natal |
| pmol | Pikomol |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| Rnase | Ribonuklease |
| rpm | engl. <i>round per minute</i> |
| rRNA | ribosomale RNA |
| RT | Reverse Transkriptase |
| RT | Raumtemperatur |
| sALS | spontane ALS |
| SBMA | Spinobulbäre Muskelatrophie Typ Kennedy |
| sec | Sekunde |
| SMA | Spinale Muskelatrophie |

| | |
|-----------|--|
| SMARD1 | engl. <i>spinal muscular atrophy with respiratory distress</i> |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| U | unit (Enzymeinheit) |
| ü.N. | über Nacht |
| V | Volt |
| VPS | engl. <i>vacuolar protein sorting factor</i> |
| <i>wr</i> | Gensymbol <i>wobbler</i> |
| WR | <i>wobbler</i> Phänotyp |
| WT | Wildtyp Phänotyp |
| X-Gal | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-galactopyranoside |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |

7.2 Messdaten

7.2.1 Futterakumulation

| Wobbler-Tiere | Wildtyp-Tiere |
|---------------|---------------|
| 6,5 | 1,3 |
| 3,1 | 1,1 |
| 1,9 | 1,0 |
| 3,1 | 0,8 |
| 3,2 | 0,9 |
| 3,7 | 0,9 |
| 3,2 | 1,2 |
| 3,3 | 0,9 |
| 1,1 | 1,1 |

Tab7.1: %-Anteil des Magengewichtes mit Inhalt am gesamten Körpergewicht

7.2.2 Glukosegehalt

| Wobbler-Tiere | Wildtyp-Tiere | Adr-Wildtypen | Adr-Tiere |
|---------------|---------------|---------------|-----------|
| 100 | 108 | 103 | 74 |
| 115 | 182 | 187 | 96 |
| 123 | 96 | 116 | 63 |
| 96 | 148 | 101 | 65 |
| 124 | 73 | 140 | 84 |
| 136 | 87 | 116 | 56 |
| 117 | 119 | 110 | 95 |
| 107 | 90 | 207 | 61 |
| 168 | 75 | 106 | 108 |
| 150 | 100 | 105 | 102 |
| 121 | 115 | 157 | 91 |
| 160 | 102 | | |
| 98 | 90 | | |
| 126 | 76 | | |
| 162 | 98 | | |

Tab.7.2: Glukosegehalt (mg/dl)

7.3 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbstständig und nur mit den hier aufgeführten Materialien und Quellen angefertigt habe.

Bielefeld, den 08.05.06

Anke Mußmann

Dankesagung:

Diese Arbeit wurde am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie und molekulare Pathologie der Universität Bielefeld (Herrn Prof. Dr. Harald Jockusch) angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Thomas Schmitt-John danke ich für die Betreuung, Diskussionsbereitschaft und die wissenschaftliche Unterstützung so wie für die Möglichkeit an diesem interessanten Thema zu arbeiten. Der DFG für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit. Frau Prof. Dr. Eichenlaub-Ritter danke ich für Bereitschaft für die Übernahme meiner Betreuung in der Endphase und das Gutachtens dieser Arbeit zu übernehmen.

Weiterhin möchte ich der Gruppe von Prof. Miriam Meisler, Ann Arbor Michigan, danken für die Erstellung der BAC-transgenen Tiere. Dr. Andreas Lengeling von der GBF in Braunschweig danke ich für die Generierung der *Vps54-Gen-Trap* Tiere. Für die Durchführung der Metabolom-Analyse danke ich Aiko Batsch, Proteome and Metabolome Research, Universität Bielefeld.

Den jetzigen Mitgliedern des Lehrstuhls für Entwicklungsbiologie/Zellbiologie, besonders Carsten und Robert (auch für das Lesen), Peter (besonders für sein immer offenes Ohr), Timo und Doro danke ich ganz herzlich für die schöne Zeit und den Spaß den ich immer mit euch hatte. Auch den Ehemaligen Mitglieder, Ralf (für die Beherbergung im Labor), Melli, Cora, Dirk, Silvia, Björn, Phillip, Jana, Minne, Volker, Sandra, Thomas und allen andere, es war eine schöne Zeit mit euch. Den „Raubtierbändigern“ Fridel, Silvana und Marion und ganz natürlich ganz besonders Christiane danke ich für ihre Unterstützung und Hilfe.

Besonders möchte ich meinen Eltern und meiner Großmutter für die Unterstützung während meines gesamten Studiums und meiner Promotion danken, da ohne ihre Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.