

**Etablierung konditionaler Knock-out Mäuse für ERAB
(endoplasmic reticulum-associated amyloid β -peptide
binding protein):**

**Funktionelle Analysen zur Bedeutung für die
T-Zellentwicklung und den Stoffwechsel**

Inaugural-Dissertation

Cordula Rumig

Inaugural – Dissertation

**Zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen Gesamtfakultät
der Ruprecht – Karls – Universität
Heidelberg**

vorgelegt von
Diplom-Biochemikerin Cordula Rumig
aus Waibstadt

Tag der mündlichen Prüfung: _____

**Etablierung konditionaler Knock-out Mäuse für
ERAB (endoplasmic reticulum-associated amyloid
β-peptide binding protein):**

**Funktionelle Analysen zur Bedeutung für die
T-Zellentwicklung und den Stoffwechsel**

Gutachter:

Prof. Dr. Günter J. Hämmerling
Prof. Dr. Herbert Steinbeisser

Angefertigt in der Abteilung
Molekulare Immunologie
(Leiter: Prof. Dr. G.J. Hämmerling)
im
Deutschen Krebsforschungszentrum
Heidelberg

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Cordula Rumig

Heidelberg, im Herbst 2006

***Was wir wissen, ist ein Tropfen.
Was wir nicht wissen, ist ein Ozean.***

(Isaak Newton)

Für Jürgen

Dank seiner unendlichen Geduld, seiner Fähigkeit zum Zuhören und seinem Verständnis für meine kleinen und großen Sorgen und Nöte sowie der moralischen und finanziellen Unterstützung wurde mir diese Doktorarbeit ermöglicht.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank geht an Bernd Arnold, unter dessen Betreuung die vorliegende Arbeit entstand. Er hat sich stets Zeit für Fragen und Diskussionen genommen. Besonders freute mich seine Bereitschaft, dieses Projekt trotz aller Anfangsschwierigkeiten weiterzuführen und mir so die Möglichkeit zu geben, an einem sehr interessanten Thema zu arbeiten.

Günter Hämmerling, in dessen Abteilung die Arbeit durchgeführt wurde, danke ich für die kritische Durchsicht und konstruktive Kritik dieser Arbeit.

Prof. Herbert Steinbeisser vom Institut für Humangenetik der Universität Heidelberg danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Ein ganz besonderer Dank geht an Günter Küblbeck für das Konstrukt „ERAB KO IV“ zur Herstellung der Knock-out Mäuse und für die Durchführung unendlich vieler Southern Blot Analysen. Seine Hilfsbereitschaft hat die Arbeit an diesem Projekt um einiges leichter gemacht und zu einer entspannten Arbeitsatmosphäre beigetragen.

Alexandra Klevenz danke ich herzlich für ihre unermüdliche Hilfe bei der ES-Zellkultur und für ihre Bereitschaft, mich auch an vielen Wochenenden dabei zu unterstützen. Von ihr habe ich sehr viele Methoden gelernt und sie war stets bereit, bei allen dringenden Problemen zu helfen. Die Zusammenarbeit war immer mit sehr viel Spaß verbunden.

Sabine Schmitt danke ich für ihre außerordentliche Geduld bei der Injektion der ES-Zellklone und für die Hilfe bei vielen Experimenten. Als Laborkollegin und Schreibtischnachbarin hat sie immer gemerkt, wann Hilfe notwendig war.

Ludmila Umansky und Sanela Paljevic danke ich für die Präparation der Blastocysten. Sanela Paljevic hat mir auch in der Endphase dieser Arbeit bei einigen Experimenten geholfen.

Herzlicher Dank geht an Gorana Hollmann und Simone Stahl, die mir durch Tipps bei vielen Experimenten die Arbeit erleichtert haben.

Carmen Henrich und Christine Schmitt-Mbamunyo danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und für ihre Freundschaft.

Ein ganz besonderer Dank geht an Stella Kretschmer, die mir eine sehr große Hilfe bei der Mausearbeit war und viele RNA-, cDNA- und Real Time PCR-Analysen durchgeführt hat. Die Zusammenarbeit hat mir sehr viel Spaß gemacht.

Für die Pflege der vielen Mäuse danke ich Angelika Frenznick, Andrea Hagmann, Marika Krudwig, Kevin Hüfner und Elke Deibel. Danke, dass ihr immer den Überblick hattet!

In Kooperation mit Prof. Johannes Zschocke und Prof. Herbert Steinbeisser vom Institut für Humangenetik der Universität Heidelberg und Dr. Jörn Oliver Sass vom Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Freiburg wurden die Analysen zum Isoleucinstoffwechsel durchgeführt.

Prof. Gröne und seine Abteilung haben die histologischen Präparate angefertigt und bei deren Bewertung geholfen.

Meinen Laborkolleginnen/-kollegen der Labors „770“ und „772“ danke ich für die schöne und lustige Zeit.

Allen Mitgliedern der Abteilung danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die nette Atmosphäre im 7. Stock!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das Immunsystem	1
1.1.1. Die angeborene und die erworbene Immunität	1
1.1.2. Die Entwicklung und Reifung von T-Zellen	3
1.1.3. Aktivierung von T-Zellen und Generierung von Gedächtniszellen	5
1.1.4. Zentrale und periphere Toleranz	6
1.2. Apoptose	8
1.2.1. Glucocorticoide	8
1.2.1.1. Glucocorticoide und ihre Rolle in der Apoptose von Lymphozyten	9
1.2.2. Caspasen	11
1.2.3. Die Bcl-2 Familie	11
1.2.4. Die CD95-vermittelte Apoptose (der extrinsische Weg)	12
1.2.5. Mitochondrien und ihre Rolle in der Apoptose (der intrinsische Weg)	13
1.3. 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenasen	16
1.3.1. ERAB (endoplasmic reticulum-associated amyloid β -peptide binding Protein)	16
1.3.2. Scully, das homologe Gen zu ERAB in Drosophila	19
1.3.3. ERAB und seine Funktion im Isoleucin-Stoffwechsel	20
1.3.4. ERAB und seine Funktion im Steroid- und Fettsäure-Metabolismus	22
1.3.5. ERAB und seine Rolle in der Alzheimer Krankheit und der Apoptose	23
1.3.6. ERAB und seine Rolle in der Parkinson Krankheit	25
1.4. Möglichkeiten zur Herstellung genetisch veränderter Mäuse	26
1.4.1. Die Rekombinasen Cre und Flp	26
2. Fragestellung	29
3. Material und Methoden	30
3.1. Material	30
3.1.1. Bezugsquellen	30
3.1.1.1. Chemikalien	30
3.1.1.2. Enzyme	30
3.1.1.3. Gebrauchswaren	30
3.1.2. Verwendete Kits	30
3.1.3. Geräte	31
3.1.4. Puffer und Lösungen	31
3.1.5. Medien und Lösungen für die Zellkultur	33
3.1.6. Zelllinien	35
3.1.7. Mauslinien	36

3.1.8. PCR-Primer	36
3.1.8.1. Primer für die RT-PCR	36
3.1.8.2. Primer für die Real Time PCR	37
3.1.9. Antikörper	37
3.2. Methoden	38
3.2.1. Molekularbiologische Arbeitstechniken	38
3.2.1.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
3.2.1.2. DNA-Präzipitation mittels Alkoholfällung	38
3.2.1.3. Restriktionsverdau	39
3.2.1.4. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	39
3.2.1.5. DNA-Präparation aus ES-Zellen in Kultur	40
3.2.1.6. Isolierung von DNA aus der Schwanzspitze und Organen	41
3.2.1.7. Neutraler Kapillartransfer von DNA auf Membranen und Filter (Southern Blot)	41
3.2.1.8. Herstellung nicht-radioaktiver Digoxigenin DNA-Sonden	42
3.2.1.9. DNA-DNA-Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden	43
3.2.1.10. Signaldetektion nach der DNA-DNA-Hybridisierung	43
3.2.1.11. RNA-Isolierung	44
3.2.1.11.1. RNA-Isolierung aus Geweben der Maus	44
3.2.1.11.2. RNA-Isolierung aus Zellen	45
3.2.1.11.3. Pellet Paint	45
3.2.1.12. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	46
3.2.1.12.1. First Strand cDNA-Synthese mit SuperScript II RT	46
3.2.1.13. Polymerasekettenreaktion (PCR)	47
3.2.1.13.1. Quantitative Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	48
3.2.1.14. Quantitative Real Time PCR (Quantitative Echtzeit-PCR)	48
3.2.2. Arbeiten mit Embryonalen Stammzellen	50
3.2.2.1. Kultivierung embryonaler Stammzellen	50
3.2.2.2. Präparation neo-resistenter primärer embryonaler Fibroblasten	50
3.2.2.3. Auftauen primärer embryonaler Feederzellen (PEF)	51
3.2.2.4. Trypsinieren von adhärenenten Fibroblasten	52
3.2.2.5. Mitotische Inaktivierung von Fibroblasten	52
3.2.2.6. Auftauen und Einfrieren von ES-Zellen	53
3.2.2.7. Elektroporation von embryonalen Stammzellen	54
3.2.2.8. Isolierung stabil transfizierter ES-Zellklone	55
3.2.2.9. Auftauen und Expandieren positiver ES-Zellklone	56
3.2.2.10. Vorbereitung positiver ES-Zellen für die Blastocysteninjektion	57

3.2.3. Methoden zur Herstellung von Knock-out Mäusen	58
3.2.3.1. Gewinnung von Blastocysten aus trächtigen C57Bl/6 N-Mäusen	58
3.2.3.2. Injektion von ES-Zellen in Blastocysten	58
3.2.3.3. Blastocystentransfer in scheinschwangere NMRI-Ammenmäuse	59
3.2.4. Methoden zur Arbeit mit Mäusen	60
3.2.4.1. Isolierung von Organen für die RNA-Synthese und die Histologie	60
3.2.4.2. Organentnahme für die Analyse der Oberflächenmarker von T-Zellen	60
3.2.4.3. Zellseparation mittels magnetbeadgekoppelter Antikörper	61
3.2.4.4. Durchflusszytometrie	61
3.2.4.4.1. Färbung der Zellen für die FACS-Analyse	62
3.2.4.5. In vitro Proliferationstest	62
3.2.4.6. Apoptoseinduktion in Thymozyten mit Dexamethason und FasL	63
3.2.4.7. Fibroblastenpräparation aus Mäuseohren	63
4. Ergebnisse	64
4.1. Klonierung, ES-Zellkultur und Blastocysteninjektion zur Herstellung von Knock-out Mäusen	64
4.1.1. Klonierung des Konstruktes zur Generierung der ERAB Knock-out Mäuse	66
4.1.2. Herstellung stabil transfizierter ES-Zellklone für das ERAB-Konstrukt	66
4.1.3. Injektion der positiven ES-Zellklone ERAB 183 und ERAB 303 in Blastocysten von C57Bl/6 N Mäusen	67
4.2. Die Kontrolllinie ERAB/Flp	72
4.2.1. Verpaarungsschema zur Generierung der Linie ERAB/Flp	72
4.2.2. Nachweis der Expressionshöhe von ERAB in verschiedenen Organen der ERAB/Flp Mäuse	74
4.3. Verpaarung zur Herstellung der ERAB Knock-out Mäuse	76
4.3.1. Verpaarung der Linie ERAB/Flp mit Cre deleter Tieren	76
4.4. Die Linie ERAB/neo	80
4.4.1. Verpaarungsschema zur Generierung der ERAB/neo Linie	80
4.4.2. Phänotypbeschreibung der ERAB/neo Männchen	81
4.4.3. Genexpressionsanalysen verschiedener Organe	85
4.4.4. Histologische Untersuchungen	86
4.4.5. Untersuchungen verschiedener Organe von ERAB/neo Männchen auf Apoptose	88
4.4.6. Der 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase Mangel (MHBD-Mangel)	90

4.5. Die Linie ERAB/Tie2	95
4.5.1. Verpaarungsschema zur Herstellung der Mauslinie ERAB/Tie2	95
4.5.2. Phänotypbeschreibung der ERAB/Tie2 Männchen Knock-out Männchen	96
4.5.3. Histologische Untersuchungen der ERAB/Tie2 Männchen Knock-out Männchen	97
4.5.4. Untersuchung der Oberflächenmarker von T-Lymphozyten der ERAB/Tie2 Knock-out Männchen	99
4.5.5. Verpaarung der heterozygoten ERAB/Tie2 Weibchen mit homozygoten ERAB/Flp Männchen zur Generierung homozygoter ERAB/Tie2 Knock-out Weibchen	102
4.6. Die Linie ERAB/lck	103
4.6.1. Expressionsanalysen von ERAB in T-Zellen von C57Bl/6 N Mäusen	103
4.6.1.1. Expression von ERAB in naiven und aktivierten T-Zellen von C57Bl/6 N Mäusen	104
4.6.2. Verpaarungsschema zur Herstellung der ERAB/lck Knock-out Mäuse	105
4.6.3. Test der Rekombination auf genomischer- und mRNA-Ebene	106
4.6.4. Zellzahlbestimmungen von Milz und Thymus der ERAB/lck Knock-out Mäuse	108
4.6.5. Untersuchung der Oberflächenmarker homozygoter ERAB/lck Knock-out Mäuse	110
4.6.5.1. Verteilung der CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ T-Zellen	110
4.6.5.2. Untersuchung der Gedächtniszellen in der Peripherie von ERAB/Flp- und ERAB/lck Knock-out Mäusen	112
4.6.5.3. Untersuchung der Thymozyten von ERAB/Flp- und ERAB/lck Mäusen auf Vorläuferzellen	114
4.6.6. Die ERAB/lck Knock-out Linie und ihr Verhalten in Bezug auf Apoptose in Thymozyten	115
4.6.6.1. Die Apoptoseinduktion mit Dexamethason	115
4.6.6.2. Die Apoptoseinduktion mit CD95L	117
5. Diskussion	120
5.1. Injektion der positiv rekombinierten ES-Zellklone in Blastocysten und Verpaarung der Chimären mit C57Bl/6 N Weibchen	120
5.2. Generierung von ERAB Knock-out Mäusen	121
5.2.1. ERAB und seine Homologie zu scully	121
5.2.2. Mögliche Ursachen für den letalen Phänotyp der ERAB Knock-out Mäuse	122
5.3. Die Mauslinie ERAB/neo	123
5.3.1. Genexpressionsanalysen und Phänotyp der ERAB/neo Männchen	123
5.3.2. Histologische Untersuchungen der ERAB/neo Männchen	124
5.3.2.1. ERAB und seine Rolle im Androgenmetabolismus	124

5.3.2.2. <i>ERAB/neo</i> Männchen haben verkleinerte Milzen	125
5.3.3. <i>Der 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (MHBD)-Mangel</i>	126
5.3.3.1. <i>Urinanalysen der ERAB/neo Männchen</i>	126
5.3.3.2. <i>Der MHBD-Mangel und seine Parallelen zur Alzheimer Krankheit</i>	127
5.4. <i>Die Mauslinie ERAB/Tie2</i>	128
5.4.1. <i>Phänotyp der ERAB/Tie2 Knock-out Männchen</i>	128
5.4.2. <i>Histologische Untersuchungen der ERAB/Tie2 Knock-out Männchen</i>	129
5.5. <i>Die Mauslinie ERAB/lck</i>	129
5.5.1. <i>Die Thymusrückbildung: Analyse der Zellzahlen in den Thymi von ERAB/lck- und ERAB/Flp Tieren verschiedenen Alters</i>	130
5.5.1.1. <i>Die Thymusrückbildung und ihr Einfluss auf die Struktur des Organs</i>	131
5.5.1.2. <i>Welche Faktoren beeinflussen die Thymusrückbildung?</i>	131
5.5.1.2.1. <i>Glucocorticoide und ihr Einfluss auf die Thymusrückbildung</i>	132
5.5.2. <i>Analyse der Oberflächenmarker</i>	134
5.5.2.1. <i>Verteilung der T-Zellpopulationen in den Thymi von ERAB/lck- und ERAB/Flp Mäusen</i>	134
5.5.2.2. <i>Verteilung der T-Zellpopulationen in der Peripherie von ERAB/lck- und ERAB/Flp Mäusen</i>	135
5.5.3. <i>ERAB in der Apoptose</i>	136
5.5.3.1. <i>ERAB und seine Rolle in der durch Glucocorticoide ausgelösten Apoptose</i>	136
5.5.3.2. <i>ERAB und seine Rolle in der durch CD95-Ligand ausgelösten Apoptose</i>	138
5.6. <i>Ausblick</i>	139
6. Literaturverzeichnis	140
7. Abkürzungsverzeichnis	167

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	<i>Die Entwicklung von T-Zellen (adaptiert nach Sebzda et al., 1999)</i>	4
Abb. 2:	<i>Aufbau und mögliche Inhibitoren der PT-Pore</i>	15
Abb. 3:	<i>ERAB/MHBD und seine Rolle im Isoleucinstoffwechsel, adaptiert nach Sass et al., 2004</i>	21
Abb. 4:	<i>Konstruktaufbau zur Generierung der ERAB Knock-out Mäuse</i>	65
Abb. 5:	<i>Southern Blot Analyse von angereicherten ES-Zellklonen Nachweis des positiv rekombinierten ES-Zellklons ERAB 183</i>	67
Abb. 6:	<i>Southern Blot Analyse der chimären Mäuse nach der zweiten Injektionsrunde des Klons ERAB 303 (siehe Tabelle 5)</i>	70
Abb. 7:	<i>Typisierung der weiblichen Nachkommen auf Keimbahntransmission Southern Blot Analyse der Verpaarung der Chimären Nr. 8 und Nr. 10 mit C57Bl/6 N Männchen</i>	71
Abb. 8:	<i>Verpaarungsschema zur Generierung der Kontrolllinie ERAB/Flp</i>	73
Abb. 9:	<i>Expressionsanalysen einzelner Organe von ERAB/Flp Mäusen</i>	75
Abb. 10:	<i>Verpaarungsschema zur Generierung der ERAB Knock-out Mäuse</i>	76
Abb. 11:	<i>Southern Blot Analyse der Verpaarungen mit Flp- und Cre deleter Tieren</i>	78
Abb. 12:	<i>RT-PCR-Analysen von C57Bl/6 N Embryonen zum Nachweis der ERAB-Expression</i>	79
Abb. 13:	<i>Verpaarungsschema zur Generierung der ERAB/neo Mäuse</i>	80
Abb. 14:	<i>Darstellung von einem C57Bl/6 N- und zwei ERAB/neo Männchen</i>	82
Abb. 15:	<i>Darstellung des Phänotyps der ERAB/neo Männchen</i>	83
Abb. 16:	<i>Vergleich der Milzgrößen von ERAB/Flp Männchen und ERAB/neo Männchen</i>	84
Abb. 17:	<i>Genexpressionsanalysen von Organen der ERAB/neo Männchen mit Hilfe der quantitativen Real Time PCR</i>	85
Abb. 18:	<i>Histologischer Vergleich der Milzen von C57Bl/6 N- und ERAB/neo Männchen</i>	87
Abb. 19:	<i>Histologischer Vergleich der Hodengewebe von C57Bl/6 N- und ERAB/neo Männchen</i>	87
Abb. 20:	<i>DNA-Analysen von Organen der ERAB/Flp- und ERAB/neo Männchen zur Untersuchung der Apoptose</i>	89
Abb. 21 A:	<i>Urinanalysen von ERAB/Flp Mäusen zur Untersuchung des MHBD-Mangels</i>	92
Abb. 21 B:	<i>Urinanalysen von ERAB/neo Mäusen zur Untersuchung des MHBD-Mangels</i>	93
Abb. 22:	<i>Verpaarungsschema zur Generierung der Mauslinie ERAB/Tie2</i>	95
Abb. 23:	<i>Histologischer Vergleich der Milzen von C57Bl/6 N- und ERAB/Tie2 Männchen</i>	97
Abb. 24:	<i>Histologischer Vergleich der Hodengewebe von C57Bl/6 N- und ERAB/Tie2 Männchen</i>	98

Abb. 25 A:	<i>Untersuchung der Verteilung von CD4- und CD8 T-Zellen in den lymphatischen Organen eines ERAB/Tie2 Knock-out Männchen</i>	100
Abb. 25 B:	<i>Untersuchung der Gedächtniszellen in der Peripherie eines ERAB/Tie2 Knock-out Männchens</i>	101
Abb. 26:	<i>ERAB-Expression in T-Zellen von Milz, Thymus und Lymphknoten von C57Bl/6 N Mäusen</i>	103
Abb. 27:	<i>ERAB-Expression in naiven und aktivierten T-Zellen</i>	104
Abb. 28:	<i>Verpaarungsschema zur Generierung der Mauslinie ERAB/lck</i>	105
Abb. 29:	<i>Nachweis der Rekombination in genomischer DNA von CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen von ERAB/lck Knock-out Mäusen</i>	106
Abb. 30:	<i>Quantitative Real Time PCR zum Nachweis der Rekombination auf mRNA-Ebene in ERAB/lck Knock-out Tieren</i>	107
Abb. 31:	<i>Graphische Darstellung der Zellzahlen von Thymi der Linien ERAB/Flp und ERAB/lck</i>	109
Abb. 32:	<i>Verteilung der CD4- und CD8 T-Zellen in den lymphatischen Organen der ERAB/Flp- und ERAB/lck Tiere</i>	111
Abb. 33:	<i>Analyse der Gedächtniszellen in der Peripherie der ERAB/Flp- und ERAB/lck Tiere</i>	113
Abb. 34:	<i>Untersuchung der Vorläuferzellen in den Thymi von ERAB/Flp- und ERAB/lck Tieren</i>	114
Abb. 35:	<i>Graphische Darstellung der lebenden Zellen 22 Stunden nach Dexamethasonbehandlung von ERAB/Flp- und ERAB/lck Tieren</i>	
	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten</i>	116
Abb. 36:	<i>Graphische Darstellung der Annexin V positiven Zellen drei bzw. fünf Stunden nach Apoptoseinduktion mit CD95L</i>	118

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	<i>Chronologische Auflistung der verschiedenen Namen für ERAB (adaptiert nach Yang et al., 2005 b)</i>	18
Tabelle 2:	<i>Verwendete Zelllinien</i>	35
Tabelle 3:	<i>Verwendete Mauslinien</i>	36
Tabelle 4:	<i>Zellzahlen für die Beschichtung mit Feederzellen</i>	53
Tabelle 5:	<i>Zusammenfassung der Injektionen der Klone ERAB 183 und ERAB 303 in Blastocysten von C57Bl/6 N Tieren</i>	68
Tabelle 6:	<i>Verpaarungen der ersten sechs agouti Männchen (*) mit C57Bl/6 N Weibchen Anzahl der Nachkommen</i>	69
Tabelle 7:	<i>Verpaarungen der nächsten fünf agouti Männchen des Klons ERAB 303 mit C57Bl/6 N Weibchen Anzahl der weiblichen Nachkommen</i>	70
Tabelle 8:	<i>Anzahl und Genotyp der Nachkommen aus den Verpaarungen von homozygoten ERAB/Flp Tieren mit homozygoten Cre deleter Tieren</i>	77
Tabelle 9:	<i>Untersuchte organische Säuren im Urin der ERAB/Flp- und ERAB/neo-Männchen und ihre Funktionen im Stoffwechsel</i>	91

Zusammenfassung

Toleranz gegenüber körpereigenem Gewebe wird durch Deletion/Inaktivierung selbstreaktiver T-Zellen erreicht. Sind Mechanismen der Selbst-Toleranz unwirksam, können T-Zellreaktionen gegen körpereigene Antigene zu Autoimmunerkrankungen führen. Dabei können T-Effektorzellen lokale Entzündungsreaktionen hervorrufen und Gewebezellen schädigen. Eine Klärung der molekularen Mechanismen, die zur Brechung von Toleranz führen, ist für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte bei Autoimmunerkrankungen und zur Eliminierung von Tumoren von großem Interesse.

Erste Studien unseres Kooperationspartners D. Stern zur Funktion des X-chromosomalen ERAB („endoplasmic reticulum-associated amyloid β -peptide binding protein“) deuteten darauf hin, dass dieses Protein in Entzündungsreaktionen und in der T-Zell-Apoptose involviert sein könnte. In der vorliegenden Arbeit wurden daher konditionale Knock-out Mäuse für ERAB hergestellt. Der komplette Knock-out in den Mäusen zeigte einen letalen Phänotyp.

Eine gestörte Expression des ERAB Gens durch das Neomycin-Resistenz-Gen führte zu Bewegungsstörungen und Krämpfen der Tiere, zu einer erhöhten Apoptoserate in den Organen Milz, Thymus, Darm, Gehirn, Hoden, Leber und Niere und schließlich zum Tod der Tiere im Alter von ca. 5 Monaten. Männchen dieser ERAB/neo Linie zeigten einen Phänotyp, der vergleichbar mit den Auswirkungen einer Isoleucinstoffwechselkrankheit des Menschen ist, die durch Punktmutationen im entsprechenden menschlichen Gen hervorgerufen wird. Eine ERAB-Defizienz ausschließlich in Endothelzellen und hämatopoetischen Stammzellen führte zu ähnlichen Symptomen wie bei ERAB/neo Männchen beobachtet wurden. Jedoch starben die Tiere erst im Alter von 6-7 Monaten. Die beiden erhaltenen Knock-out Weibchen dieser Linie hingegen sind lebensfähig. Der Grund für den Tod der männlichen Tiere konnte noch nicht gefunden werden. In ersten Experimenten mit T-zellspezifischen Knock-out Tieren für ERAB konnte eine normale T-Zellentwicklung und eine verzögerte Thymusrückbildung nachgewiesen werden. Glucocorticoid-induzierte, aber nicht CD95-vermittelte Apoptose führte in ERAB-defizienten Thymozyten zu einer erhöhten Apoptoserate im Vergleich zu Wildtyp-Thymozyten.

Da ERAB bei Alzheimer- und Parkinson-Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt, sind die hier generierten Knock-out Mäuse für ERAB auch für entsprechende neurologische Untersuchungen sehr interessant.

Summary

Tolerance to self is maintained by clonal deletion/inactivation of self-reactive T cells. When the state of self tolerance is disrupted, T cell reactions against self-antigens can lead to autoimmunity and effector T cells are able to cause local inflammation and to damage tissue. To know the molecular mechanisms which lead to reversal of tolerance is important with regard to treatment of autoimmunities and for the elimination of tumors. First studies of our collaboration partner D. Stern about the X-chromosomal gene ERAB ("endoplasmic reticulum-associated amyloid β -peptide binding protein") refer to a role for this protein in inflammation processes and T cell apoptosis. Therefore, we developed conditional knock-out mice for ERAB. The complete knock-out in mice showed a lethal phenotype.

A disturbed ERAB gene expression, caused by the neomycin-resistance gene, resulted in impaired movement and convulsion in mice and led to higher apoptosis in spleen, thymus, gut, brain, testis, liver and kidney. The mice died at the age of ~ 5 month. The male mice of this ERAB/neo line showed a phenotype, comparable with a defect in isoleucine-metabolism in humans, which is caused by point mutations in the homologous human gene. Mice with a specific gene knock-out in endothelial cells and hematopoietic stem cells showed a similar phenotype like the ERAB/neo male mice. Nevertheless, this mice died not before the age of 6-7 month. However, the two knock-out females we received from this line, are viable. The reason for the death of the male mice is yet not known. In first experiments with the T cell specific knock-out mice for ERAB we found normal T cell development and delayed thymic involution. Glucocorticoid-induced, but not CD95-mediated apoptosis, led to higher apoptosis in ERAB deficient thymocytes in comparison to wildtype thymocytes.

Because ERAB plays an important role in Alzheimer- and Parkinson-disease, the generated knock-out mice are very important for respective neurological studies.

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

1.1.1. Die angeborene und die erworbene Immunität

Das Immunsystem verteidigt den Organismus gegen Infektionen. Durch das angeborene Immunsystem wird ein erster Schutz gewährleistet. Dessen phagozytische Zellen, die Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, können eingedrungene Mikroorganismen durch Phagozytose aufnehmen und vernichten. Ebenso kann das Komplementsystem mit seinen Proteinen extrazelluläre Krankheitserreger angreifen. Einerseits können die Komplementproteine den Krankheitserreger einhüllen und so dessen Vernichtung durch Phagozytose fördern, andererseits sind die Komplementproteine selbst in der Lage, den Erreger abzutöten (Frank *et al.*, 1991; Tomlinson, 1993). Des weiteren exprimieren die Zellen des angeborenen Immunsystems, die Monozyten, Makrophagen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und dendritischen Zellen (DCs) konservierte molekulare Strukturen, die unter dem Begriff PAMPs („pathogen-associated molecular patterns“) zusammengefasst werden (Janeway *et al.*, 2002). Zu den Rezeptoren für PAMPs gehören die Toll-like Rezeptoren (TLRs) (Kopp *et al.*, 1999; Medzhitov *et al.*, 2000; Takeda *et al.*, 2003). Diese erkennen z. B. Lipopolysaccharide (LPS), Mannose auf der Bakterienzellwand, doppelsträngige RNA oder bakterielle DNA (Akira, 2003).

Die Systeme und Zellen des angeborenen Immunsystems können jedoch nicht spezifisch auf Pathogene reagieren. Es stellt für den Organismus nur einen unspezifischen Schutz dar und kann kein immunologisches Gedächtnis ausbilden. Nach der Erkennung des Pathogens durch die Toll-like Rezeptoren kommt es zur Induktion proinflammatorischer Zytokine, Chemokine, Interferon- α oder - β und zur Reifung von DCs, die das adaptive Immunsystem aktivieren.

Das adaptive Immunsystem, auch erworbenes Immunsystem genannt, bietet dem Körper einen spezifischen Schutzmechanismus gegen Fremdstoffen. Es besteht aus den antigenspezifischen B- und T-Zellen, die aus einer gemeinsamen hämatopoetischen Vorläuferzelle im Knochenmark entstanden sind. Während die B-Zellreifung im Knochenmark stattfindet, wandert ein Teil der Knochenmarkszellen in den Thymus und entwickelt sich dort zu T-Zellen. Thymus und Knochenmark sind die zentralen oder primären lymphatischen Organe.

T-Zellen verlassen nach ihrer Reifung den Thymus als naive Zellen und zirkulieren im Blutgefäß- und Lymphsystem, um den Organismus nach Antigenen abzusuchen. Die Antigene werden den T-Zellen von professionellen antigenpräsentierenden Zellen in den sekundären lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten, Peyersche Plaques im Darm) präsentiert. Dazu müssen die naiven T-Zellen das Blutgefäßsystem verlassen und in die sekundären lymphatischen Organe einwandern, wo sie erstmals in Kontakt mit dem Antigen kommen und eine Immunantwort auslösen können. Dabei differenzieren die T-Zellen zu antigenspezifischen Effektorzellen. Aus einem Teil der Effektorzellen entstehen Gedächtniszellen, die bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Antigen schnell reagieren und den Körper schützen können.

T-Zellen werden in zwei Gruppen eingeteilt, in CD4- und CD8 T-Zellen. Während die CD4 T-Zellen als Helfer T-Zellen bezeichnet werden, nennt man die CD8 T-Zellen auch zytotoxische T-Zellen. Beide T-Zellarten erkennen mit Hilfe ihres T-Zellrezeptors intrazelluläre Antigene, die ihnen in Form von Peptidfragmenten von MHC-Molekülen („major histocompatibility complex“) präsentiert werden. So wie bei den T-Zellen gibt es auch bei den MHC-Molekülen zwei Klassen (Neefjes *et al.*, 1993; Hämmerling *et al.*, 1999). Die MHC I-Moleküle erkennen vornehmlich Peptide aus dem Zytosol und präsentieren diese den CD8 T-Zellen. Peptide in zellulären Vesikeln hingegen werden hauptsächlich von MHC II-Molekülen erkannt und den CD4 T-Zellen präsentiert.

Die B-Zellen werden der sogenannten humoralen Immunantwort zugeordnet. Mit Hilfe ihres B-Zellrezeptors, der aus zwei schweren und zwei leichten Ketten besteht, sind sie in der Lage, direkt extrazelluläre Krankheitserreger zu erkennen. Durch somatische Rekombination von DNA-Fragmenten können viele verschiedene Rezeptorspezifitäten gebildet werden. Nach ihrer Reifung zu Plasmazellen sezernieren sie diesen Rezeptor als löslichen Antikörper in das Blut, die Lymphe oder den Verdauungstrakt und tragen so zur Bekämpfung von Infektionen bei.

1.1.2. Die Entwicklung und Reifung von T-Zellen

Für ihre weitere Entwicklung wandern die Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in den Thymus ein. Dieser liegt im oberen Brustbereich, direkt über dem Herzen, und besteht aus einer äußeren, kortikalen Region, dem Thymuskortex, und einer zentralen Region, dem Thymusmark (Thymusmedulla). Zur Veränderung ihres Phänotyps und ihrer Funktion wandern die Thymozyten vom Kortex in das Mark ein (Bommhardt *et al.*, 2004). Das epitheliale Thymusstroma ist ein wichtiger Bestandteil für die Reifung der Thymozyten.

Für das spätere Erkennen von Pathogenen müssen die T-Zellen ihren T-Zellrezeptor (TZR) ausbilden. Dieser ist ein Heterodimer aus einer α - und β -Kette. Um eine breit gefächerte Antigenpezifität zu erlangen, müssen die Gene für den TZR umgelagert werden. Dies geschieht durch Rekombination sogenannter **V-** (variable), **D-** (diversity), und **J-** (joining) Segmente (Davis *et al.*, 1988).

Den unterschiedlichen Reifezustand der T-Zelle erkennt man an der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle, den „cluster of differentiation“ („**CD**“). Zu Beginn ihrer Entwicklung gehören alle T-Zellen der dreifach negativen Thymozytenpopulation an, da sie weder den CD3-T-Zell-Rezeptor-Komplex noch die Korezeptoren CD4 und CD8 tragen ($\text{CD3}^-\text{CD4}^-\text{CD8}^-$). Durch die Expression von CD3 auf der Zelloberfläche kommt es zur Bildung einer funktionsfähigen β -Kette, einer prä-T α -Kette und der Entwicklung zu doppelt negativen Zellen ($\text{CD4}^-\text{CD8}^-$). Dies ist der erste Kontrollpunkt in der T-Zellentwicklung, da die fehlerhafte Bildung der prä-T α -Kette mit der Apoptose dieser Zellen endet (von Boehmer *et al.*, 1999). Nach der Bildung der doppelt positiven Zellen, d. h. der $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ T-Zellen, kommt es zur Ausbildung einer reifen α -Kette und damit zu einem funktionsfähigen TZR (Rodewald *et al.*, 1998).

Die oben erwähnte dreifach negative Thymozytenpopulation, die als erste im Thymus vorliegt, kann in der Maus noch in vier weitere Untergruppen eingeteilt werden, die sich durch ihre Expression der Oberflächenmoleküle CD44 und CD25 (α -Kette des IL-2 Rezeptor) unterscheiden. Die am wenigsten entwickelte Thymozytenpopulation stellt die Gruppe der $\text{CD25}^-\text{CD44}^+$ T-Zellen dar. Durch die Hochregulation des CD25 entwickeln sie sich zu $\text{CD25}^+\text{CD44}^+$ Zellen. Die weitere Entwicklung zu $\text{CD25}^+\text{CD44}^-$ Zellen ist mit der Umlagerung der β -Kette für den TZR verbunden. Nach der erfolgreichen Ausbildung der α -Kette entstehen die $\text{CD25}^-\text{CD44}^-$ doppelt negativen

Zellen. Aus diesen entwickeln sich zuerst die doppelt positiven $CD4^+CD8^+$ T-Zellen, und daraus dann die einzeln positiven $CD4^+$ - oder $CD8^+$ T-Zellen (Godfrey *et al.*, 1993; Godfrey *et al.*, 1994; Shortman *et al.*, 1996; Bhandoola *et al.*, 2006).

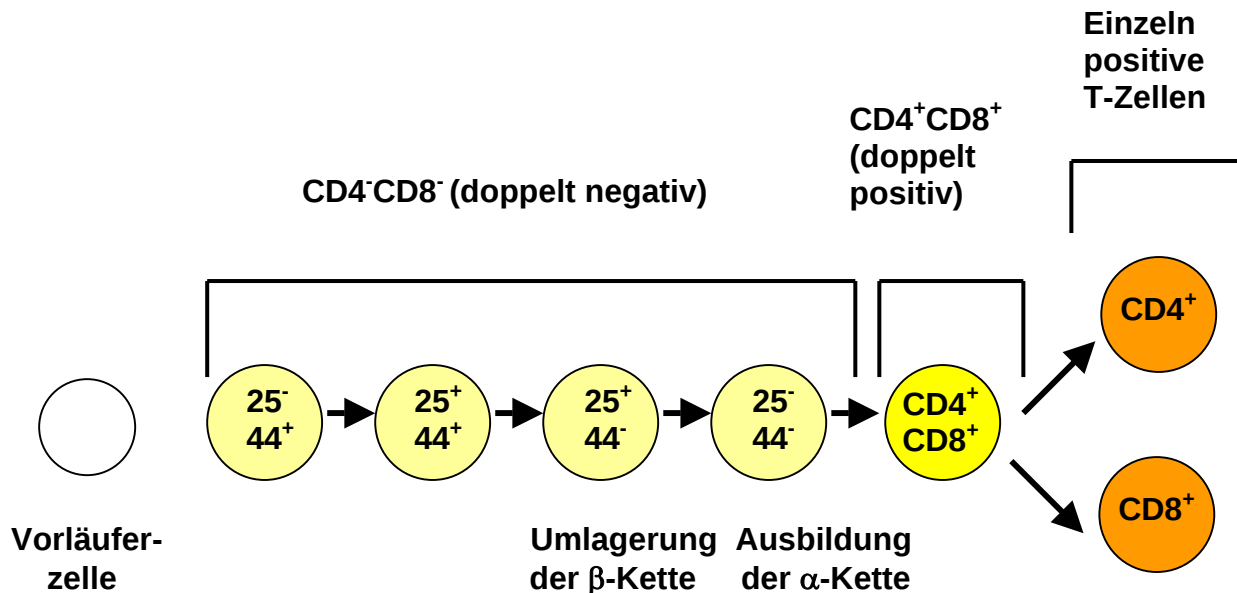


Abb. 1: Die Entwicklung von T-Zellen (adaptiert nach Sebzda *et al.*, 1999)

Aus einer Vorläuferzelle entwickeln sich zunächst die $CD4^-CD8^-$ negativen T-Zellen. Diese doppelt negative T-Zellpopulation wird in Untergruppen unterteilt, die sich durch unterschiedliche Expressionsmuster der Oberflächenmoleküle CD25 und CD44 auszeichnen. Mit der Expression von $CD25^+CD44^-$ ist die Umlagerung der β -Kette des T-Zellrezeptors verbunden und nach der Bildung der $CD25^-CD44^-$ Population kommt es zur Expression der α -Kette für den TZR und zur Bildung der $CD4^+CD8^+$ T-Zellen. Aus diesen entwickeln sich schließlich die einfach positiven $CD4^+$ - und $CD8^+$ T-Zellen.

Nach ihrer Entwicklung zu einzeln positiven $CD4^+$ - und $CD8^+$ T-Zellen unterliegen die Zellen der positiven und negativen Selektion im Thymus, dem zweiten Kontrollpunkt ihrer Entwicklung. T-Zellen, deren Rezeptor eine geringe Affinität gegenüber Selbst-MHC-Molekülen zeigt, unterliegen der positiven Selektion. Diese Zellen können den Thymus als reife naive T-Zellen verlassen. T-Zellen mit einem Rezeptor, der eine zu hohe Affinität gegenüber Selbst-MHC-Molekülen hat, werden im Thymusmark durch Apoptose der negativen Selektion unterzogen. Dadurch werden potentiell autoreaktive T-Zellen eliminiert (Marrack *et al.*, 1988; Murphy *et al.*, 1990; Sebzda *et al.*, 1999; Santori *et al.*, 2002; Bommhardt *et al.*, 2004; Siggs *et al.*, 2006).

T-Zellen, die einen MHC-II-restringierten Rezeptor exprimieren, werden durch die positive Selektion der Linie der $CD4^+$ T-Zellen, den Helferzellen zugeordnet. T-Zellen

mit einem MHC-I-restringierten Rezeptor gehören der Linie der CD8⁺ T-Zellen, den zytotoxischen T-Zellen, an (Germain, 2002).

Eine weitere Gruppe der CD4⁺ T-Zellen im Thymus ist die Gruppe der CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{reg}). Sie können durch die Expression der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25), dem zytotoxischen T-Lymphozytenantigen 4 (CTLA 4), GTR („glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor“) sowie anhand von CD5^{hoch} und CD45RB^{niedrig} identifiziert werden (Sakaguchi, 2000, 2004).

1.1.3. Aktivierung von T-Zellen und Generierung von Gedächtniszellen

Nach der Reifung verlassen die naiven T-Zellen den Thymus und wandern in der Peripherie in die sekundären lymphatischen Organe ein (Mackay, 1993). Auch dort sind sie von Überlebenssignalen, die durch eine niederaffine Interaktion des TZR mit Selbst-Peptid-MHC-Komplexen vermittelt werden, abhängig (Ernst *et al.*, 1999).

In der Peripherie wird das Antigen der T-Zelle von einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle („antigen presenting cell, **APC**“) präsentiert. APCs sind vorwiegend dendritische Zellen. Für die Aktivierung der naiven T-Zelle werden zwei Signale benötigt. Das erste Signal ist das Antigen selbst, das zweite Signal wird durch kostimulatorische Moleküle vermittelt. Dazu gehören die Moleküle B7.1/CD80 und B7.2/CD86 der antigenpräsentierenden Zelle und das CD28 der T-Zelle (Harding *et al.*, 1992; Boise *et al.*, 1995 b; Radvanyi *et al.*, 1996). Die Aktivierung der APCs resultiert in erhöhter Antigenpräsentation, der Produktion inflammatorischer Zytokine und der erhöhten Expression von B7.1 und B7.2. Durch die Interaktion von B7.1 und B7.2 mit dem CD28 der T-Zellen werden diese aktiviert. Dadurch erhöht sich die Proliferation der T-Zellen, die Produktion von IL-2 (Fraser *et al.*, 1991) und die Expression des anti-apoptotischen Moleküls Bcl-x_L. Bcl-x_L sichert das Überleben der T-Zellen und aktiviert eine weitere Kaskade von kostimulatorischen Molekülen, die ebenfalls zum Überleben der Zellen beitragen (Boise *et al.*, 1995 a).

Während einer Infektion kommt es zur Aktivierung und klonalen Expansion von naiven T-Zellen. Die T-Zellen verlassen die lymphatischen Gewebe und wandern zum Ort der Entzündung. Dabei kommt es zu Veränderungen in der Expression ihrer Oberflächenmoleküle. Das L-Selektin/CD62L, welches für die Einwanderung der T-Zellen aus dem Blut in die Lymphknoten benötigt wurde, wird herunterreguliert, während Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 und VLA-4 hochreguliert werden. Ein Teil der Zellen wandelt sich in Effektorzellen um, die zum Großteil nach der Eliminierung des

Antigens durch Apoptose zugrunde gehen. Dies geschieht in Anwesenheit von IL-2 durch den aktivierungsinduzierten Zelltod („activation induced cell death, **AICD**“) (Lenardo *et al.*, 1991; Nakajima *et al.*, 1997; Van Parijs *et al.*, 1998). Ein kleiner Teil der Effektorzellen wandelt sich jedoch in Gedächtniszellen um. Diese können dann bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Erreger schneller reagieren.

Die Gedächtniszellen unterliegen einem homöostatischen Kontrollmechanismus. In Abwesenheit des Antigens ist ihre Proliferations- und Zellteilungsrate vermindert (Sprent *et al.*, 2001 a, b). Für ihr Überleben benötigen sie Zytokine wie IL-4, IL-7 und IL-15 (Goldrath *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2002; Kieper *et al.*, 2002). Die Zahl der naiven T-Zellen in der Peripherie bleibt aber trotz einer Infektion konstant, da diese Zellen, wie die Gedächtniszellen, einer homöostatischen Kontrolle unterliegen (Rocha *et al.*, 1991; Tanchot *et al.*, 1997 a, b). Dazu benötigen die Zellen den niederaffinen Kontakt mit Selbst-MHC-Molekülen und IL-7 (Schluns *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2001; Keach *et al.*, 2003).

1.1.4. Zentrale und periphere Toleranz

Als Toleranz bezeichnet man die Unfähigkeit, auf ein Antigen zu reagieren. Der Thymus ist Ort der zentralen Toleranz. Hier werden T-Lymphozytenvorläufer, die eine hohe Affinität gegenüber Selbst-Antigenen zeigen, durch klonale Deletion entfernt (Fowlkes *et al.*, 1993; Sprent, 1995; Jameson *et al.*, 1998; Kishimoto *et al.*, 2000; Starr *et al.*, 2003; Kyewski *et al.*, 2006). Diese Antigene, die entweder im Thymus selbst produziert werden oder aber aus der Zirkulation stammen, werden den T-Zellen als Peptid-MHC-Komplexe von dendritischen Zellen präsentiert. Dieser Vorgang wird als Kreuzpräsentation bezeichnet. In der Zwischenzeit wurden auch thymische Epithelzellen (TECs) als Vermittler der zentralen Toleranz identifiziert. Die medullären thymischen Epithelzellen (mTECs) können gewebespezifische Antigene exprimieren und somit zur Deletion autoreaktiver Zellen führen (Smith *et al.*, 1997; Hanahan *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 1998, 2000; Derbinski *et al.*, 2001). Jedoch kann die Expression eines Autoantigens in diesen thymischen Epithelzellen anstelle von Deletion auch zur Anergie der autoreaktiven Thymozyten führen (Schönrich *et al.*, 1992).

Des weiteren können autoreaktive Zellen durch regulatorische CD4 T-Zellen (CD4⁺CD25⁺), die im Thymus entstehen, kontrolliert werden (Sakaguchi, 2000; Sakaguchi *et al.*, 2001; Sakaguchi, 2004). Werden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in

immundefiziente Mäuse transferiert, kommt es nach Rekonstitution mit diesen Zellen zu Autoimmunerkrankungen in den Tieren (Itoh *et al.*, 1999; Sakaguchi, 2000).

Es gibt auch Antigene, die im Thymus nicht vorhanden sind oder aber in zu geringen Mengen exprimiert werden, um eine T-Zellantwort auszulösen (Kurts *et al.*, 1998). Außerdem werden nur T-Zellen mit einer hohen Aktivität gegenüber Selbst-MHC-Molekülen eliminiert (Liu *et al.*, 1995). Daher ist die zentrale Toleranz nicht ausreichend. Auch in gesunden Individuen kann man selbstreaktive T-Zellen in der Peripherie finden, die jedoch nur einen T-Zellrezeptor mit einer niedrigen Affinität für Selbstantigene exprimieren (Lohmann *et al.*, 1996; Semana *et al.*, 1999; Bouneaud *et al.*, 2000). Da der Schwellenwert für die Aktivierung der Antigene bei der thymischen Deletion niedriger ist als der Schwellenwert für ihre Aktivierung in der Peripherie (Pircher *et al.*, 1991), kann es vorkommen, dass T-Zellen mit einer niedrigen Avidität für Selbst-Antigene auch in der Peripherie nicht aktiviert werden. Daher bleiben sie gegenüber ihrem Antigen ignorant. Ignoranz bedeutet, dass die T-Zellen durch das Autoantigen weder aktiviert noch tolerisiert werden (Ohashi *et al.*, 1991; Oldstone *et al.*, 1991).

Die T-Zellen der peripheren Gewebe sind durch die Herunterregulation ihres TZR oder des Korezeptors CD4/CD8 *in vivo* tolerant (Schönrich *et al.*, 1991; Tafuri *et al.*, 1995). Dies stellt einen reversiblen Prozess der Tolerisierung dar. Durch die gleichzeitige Stimulation mit IL-2 und dem Autoantigen verlieren die T-Zellen ihre Toleranz (Toleranzbrechung) (Schönrich *et al.*, 1991; Limmer *et al.*, 1998). Somit kann die Toleranz durch mehrere Prozesse ausgelöst werden, wie die Herunterregulation des TZR und/oder des Korezeptors, die Anergie (Unfähigkeit einer T-Zelle, auf einen Antigenstimulus in irgend einer Form zu reagieren) oder aber die Deletion (Arnold *et al.*, 1993; Ferber *et al.*, 1994).

1.2. Apoptose

Der auch als programmierter Zelltod bezeichnete Prozess der Apoptose spielt sowohl bei der Embryogenese, der Metamorphose, der Zellerneuerung in Geweben als auch der Eliminierung unerwünschter Zellen eine bedeutende Rolle. Er dient der Kontrolle der Zellzahl eines Organismus. Für das Immunsystem ist die Apoptose ebenfalls ein wichtiger Vorgang, da sie die Lymphozytenreifung reguliert und bei der Auswahl des Rezeptorrepertoires und der Homöostase beteiligt ist (Opferman *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2005). Auslöser der Apoptose können der Entzug essentieller Wachstumsfaktoren, die Behandlung mit Glucocorticoiden, γ -Strahlen oder die Aktivierung bestimmter Rezeptoren und Signalketten sein.

Merkmale dieses aktiven Prozesses sind die Chromatinverdichtung, das Abschnüren von Blasen aus der Membran und der Zerfall der DNA. Die Zelle wird kompakter und bildet für die Apoptose RNA und Proteine. Die toten Zellen zerfallen in membrangebundene Stücke und werden von umliegenden Zellen resorbiert (Kerr *et al.*, 1972; Wyllie *et al.*, 1980).

Die Apoptose kann auf zwei verschiedenen Wegen ausgelöst werden, dem extrinsischen und dem intrinsischen Weg (Strasser *et al.*, 1995). Der extrinsische Weg benötigt die sogenannten Todesrezeptoren (Krammer, 2000), wohingegen der intrinsische Weg über die Mitochondrien verläuft (Orrenius, 2004). Die Apoptose wird durch verschiedene Mechanismen reguliert (Hengartner, 1997; Ferri *et al.*, 2001; Marsden *et al.*, 2003; Danial *et al.*, 2004).

1.2.1. Glucocorticoide

Die Glucocorticoide gehören zur Gruppe von Steroidhormonen, die unter Einwirkung des adrenocorticotropen Hormons in der Nebennierenrinde gebildet werden. Ihre biogenetische Vorstufe ist das Progesteron. Das häufigste Glucocorticoid der Maus ist das Corticosteron, beim Menschen ist es das Cortisol. Glucocorticoide finden aufgrund ihrer antiphlogistischen, antiallergischen und immunsuppressiven Effekte auf periphere T-Zellen eine breite therapeutische Anwendung (Reichardt *et al.*, 2001). Der letztgenannte Effekt beruht sowohl auf der Hemmung der Proteinbiosynthese in lymphatischen Geweben als auch der Leukozyteneinwanderung in die Entzündungsgebiete. Sie verhindern dadurch die

Transkription vieler proinflammatorischer Moleküle. Außerdem können sie Apoptose in Lymphozyten induzieren (Herold *et al.*, 2006).

Dexamethason ist ein von dem Nebennierenrindenhormon Cortisol abgeleitetes, synthetisches, fluorhaltiges Pregnanderivat von hoher entzündungshemmender Wirkung und geringer mineralocorticoider Nebenwirkung. Da Glucocorticoide lipophile Substanzen sind, werden sie im Blut nur mit Hilfe von Carrierproteinen transportiert, wie z. B. dem Albumin. Daher stehen nur 1-10% der Glucocorticoide als freie Substanzen zur Verfügung. Dexamethason ist jedoch *in vivo* sehr effektiv, da es eine hohe Affinität zu seinem Rezeptor aufweist und nur in geringen Mengen an Plasmaproteine gebunden wird (Meikle *et al.*, 1977; Ashwell *et al.*, 2000).

Glucocorticoide wirken über den Glucocorticoidrezeptor, ein im Zytoplasma gelöster Rezeptor, der dort mit den Hitzeschockproteinen Hsp90, Hsp70, Hsp40, dem Ko-Chaperon p23 und den Immunophilinen FKBP52 und Cyp40 assoziiert vorliegt. Der Rezeptor besteht aus drei funktionellen Domänen, von denen die nichtkonservierte Domäne die Wechselwirkung mit anderen Regulatormolekülen ermöglicht. Des weiteren besteht er aus der konservierten DNA-Bindungsdomäne und der Hormonbindungsdomäne. Diese Hormonbindungsdomäne blockiert in Abwesenheit von Hormonen die DNA-bindende Domäne, so dass keine Wechselwirkung mit der DNA stattfinden kann (Beato *et al.*, 1995; Tuckermann *et al.*, 2005). Nach der Aktivierung des Rezeptors durch Hormone kommt es zur Freisetzung der Hitzeschockproteine, der Translokation des Rezeptors in den Kern mit anschließender Rezeptordimerisierung und zur Bindung an spezifische DNA-Sequenzen, sogenannte Hormonantwortelemente („hormone response elements, **HRE**“). Diese HRE regulieren die Expression nahegelegener Gene (Beato, 1991; Mangelsdorf *et al.*, 1995). Der Glucocorticoidrezeptor kann auch die Transkription proinflammatorischer Zytokine unterdrücken, indem er mit den Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 interagiert (Tronche *et al.*, 1998; Tuckermann *et al.*, 2005).

1.2.1.1. Glucocorticoide und ihre Rolle in der Apoptose von Lymphozyten

Die Thymozytensubpopulationen unterscheiden sich sehr in ihrer Sensitivität gegenüber der durch Glucocorticoide vermittelten Apoptose (Berki *et al.*, 2002). Es wird angenommen, dass diese Apoptoseart auch in der positiven und negativen Selektion von Thymozyten eine Rolle spielt (Penninger *et al.*, 1998; Ashwell *et al.*, 2000; Vacchio *et al.*, 2000).

Die durch Glucocorticoide ausgelöste Apoptose wird über den mitochondrialen Weg vermittelt. Dabei sind Mitglieder der Bcl-2 Familie involviert. Da Bcl-2 in der äußeren Mitochondrienmembran exprimiert wird, ist eine Zerstörung der Mitochondrienintegrität mit einer Voraussetzung für die Induktion der Apoptose (Amsterdam *et al.*, 2002). Die Apoptoseinduktion durch den Glucocorticoidrezeptor führt zur Störung der Balance zwischen pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern und dadurch zur Freisetzung apoptotischer Faktoren und/oder der Aktivierung von Caspasen. Es kommt zur Spaltung von Substraten, einer Zellschrumpfung, DNA-Fragmentierung und dem Zelltod (Beato *et al.*, 1995; Mangelsdorf *et al.*, 1995; Reichardt *et al.*, 1998 a; Ashwell *et al.*, 2000).

Insbesondere unreife, doppelt positive Thymozyten ($CD4^+CD8^+$) gehören zu den wenigen Zellgruppen, die in Antwort auf Glucocorticoide in Apoptose gehen. Einzelne positive Thymozyten ($CD4^+$ und $CD8^+$) sind gegen diese Apoptoseinduktion *in vivo* resistent. Diese Resistenz wird durch das kostimulatorische Molekül CD28 vermittelt. Ein Fehlen dieses Moleküls führt zu einer erhöhten Apoptoserate (van den Brandt *et al.*, 2004). Da die doppelt positiven Thymozyten sehr empfindlich gegenüber dem durch Glucocorticoide vermittelten Zelltod sind, können auch schon physiologische Konzentrationen dieser Hormone, die während einer Stresssituation erreicht werden, zur Apoptose führen (Gruber *et al.*, 1994; Tarcic *et al.*, 1998).

Ruhende periphere T-Zellen hingegen sind verhältnismäßig unauffällig gegenüber dieser Apoptoseinduktion. Ein Grund dafür könnte die unterschiedliche Expression des anti-apoptotischen Moleküls Bcl-2 sein, das in $CD4^+CD8^-$ und $CD4^-CD8^+$ Thymozyten und peripheren T-Zellen, jedoch nicht in doppelt positiven Thymozyten exprimiert wird (Hockenbery *et al.*, 1991 a, b). Eine Überexpression von Bcl-2 bietet einen Schutz für Lymphozyten vor verschiedenen Stimuli, wie z. B. Zytokinentzug oder oxidativem Stress, die zum Zelltod führen können (Hockenbery *et al.* 1990; Hockenbery *et al.*, 1993).

Es konnte gezeigt werden, dass die Caspasen 3, 8 und 9 in dieser Apoptoseart für Thymozyten involviert sind. Jedoch zeigen Knock-out Mäuse dieser Caspasen keinen Defekt in der Apoptose. Daher müssen noch andere Mechanismen beteiligt sein, wie die schon erwähnten pro- und antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie oder das lysosomale Cathepsin B. Der Apoptoseweg für periphere T-Zellen konnte auch noch nicht vollständig aufgeklärt werden (Wang *et al.*, 2006).

Homozygote Knock-out Mäuse für den Glucocorticoidrezeptor sind nicht lebensfähig (Cole *et al.*, 1995; Cole *et al.*, 2001). In Mäusen mit verminderter Rezeptorexpression konnte eine niedrigere Apoptoserate gezeigt werden. Diese sogenannten GR^{dim} Mäuse tragen eine Mutation in ihrem Glucocorticoidrezeptor, der dessen Dimerisierung verhindert (Reichardt *et al.*, 1998 b). Somit ist die Anwesenheit des funktionellen Rezeptors essentiell für eine durch Glucocorticoide induzierte Apoptose. Denn Mäuse mit einer Überexpression des Glucocorticoidrezeptors zeigen auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber diesem Zelltod (Reichardt *et al.*, 2000).

1.2.2. Caspasen

Caspasen gehören zur Familie der Aspartat-spezifischen Cysteinproteasen. Sie werden als Proenzyme (Zymogene) synthetisiert und durch proteolytische Spaltung aktiviert. Die Spaltung und anschließende Heterodimerisierung der kleinen und großen Untereinheiten führt zu ihrer Aktivierung. Eine aktivierte Caspase kann ihrerseits andere Procaspasen aktivieren (Thornberry *et al.*, 1998; Earnshaw *et al.*, 1999).

Caspasen werden in zwei Gruppen eingeteilt, in Initiatorcaspasen (Caspase 2, 8, 9 und 10) und Effektorcaspasen (Caspase 3, 6 und 7). Initiatorprocaspasen werden mit Hilfe der Adaptermoleküle Apaf-1 und FADD/MORT durch Autokatalyse aktiviert (Li *et al.*, 1997). Diese wiederum aktivieren die Effektorprocaspasen, die Apoptose über den extrinsischen Weg auslösen (Muzio *et al.*, 1996).

1.2.3. Die Bcl-2 Familie

Die Bcl-2 Familie (Chao *et al.*, 1998) besteht aus den proapoptotischen Proteinen Bax, Bak, Bad und Bid und den anti-apoptotischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-x_L (Boise *et al.*, 1993; Nagata, 1997; Opferman *et al.*, 2003). Sie regulieren die Apoptose durch ihre Fähigkeit zur Homo- und Hetero-Oligomerisierung, durch die Möglichkeit der Kanalbildung in Membranen und ihren Einfluss auf die intrazelluläre Calciumkonzentration. Obwohl sie in verschiedenen intrazellulären Bereichen vorkommen, ist ihr Einfluss auf den intrinsischen Weg der Apoptose im Fall der proapoptotischen Mitglieder auf die mitochondriale Membranpermeabilisierung zurückzuführen. Die antiapoptotischen Mitglieder hingegen bewirken eine Stabilisierung der Barrierefunktion.

1.2.4. Die CD95-vermittelte Apoptose (der extrinsische Weg)

Die Todesrezeptoren gehören zur Familie der **TNF-Rezeptoren** (Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren). Sie bestehen aus ein bis fünf cysteinreichen Domänen in der extrazellulären Domäne, die für die Ligandenbindung erforderlich ist. Die Todesdomäne befindet sich im zytoplasmatischen Teil des Rezeptors und ist essentiell für die Weiterleitung des Todessignals (Banner *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1994; Krammer, 2000). Der CD95/Fas/Apo-1-Rezeptor ist ebenfalls Mitglied der TNF-Familie. Er ist ein Typ1 Transmembranrezeptor, dessen Expression durch Zytokine (IFN- γ und TNF) und durch die Aktivierung von Lymphozyten erhöht werden kann. Die CD95-vermittelte Apoptose wird durch den natürlichen Liganden CD95L ausgelöst, einem TNF-verwandten Typ II Transmembranmolekül (Klas *et al.*, 1993; Schulze-Osthoff *et al.*, 1998).

Zur Weiterleitung der durch einen Liganden ausgelösten CD95-vermittelten Apoptose bedarf es einer Rezeptortrimerisierung. Ein Komplex aus Proteinen assoziiert mit aktiviertem CD95 zum „**death inducing signaling complex (DISC)**“. An diesen Komplex bindet das Adaptermolekül **FADD/MORT-1** („**Fas associated death domain protein**“). FADD selbst trägt ebenfalls eine C-terminale Todesdomäne und eine N-terminale „**death effector domain (DED)**“, über die es die Procaspase 8 in den DISC rekrutieren und autokatalytisch aktivieren kann. Diese aktivierte Caspase 8 aktiviert ihrerseits die Procaspase 3, wodurch es zur Zerstörung der Zellintegrität kommt (Peter *et al.*, 2003). Sogenannte **FLIPs** („**Flice inhibitory proteins**“) können ebenfalls in den DISC rekrutiert werden. Sie inhibieren jedoch die Aktivierung der Caspase-8 (FLICE), da sie anti-apoptotische Moleküle sind (Tschopp *et al.*, 1998).

Der CD95-vermittelte Weg der Apoptose spielt auch eine Rolle in der Homöostase und der Selbsttoleranz im Immunsystem. Dies konnte in den sogenannten $lpr^{-/-}$ -Mäusen, die eine Mutation im Fas-Todesrezeptor haben und in Mäusen, die an dem autoimmunen lymphoproliferativen Syndrom („**autoimmune lymphoproliferative syndrom, ALPS**“) leiden, gezeigt werden. Bei dem ALPS handelt es sich um eine Mutation im *gld*-Gen, das einen mutierten Fas-Liganden kodiert (Takahashi *et al.*, 1994). In beiden Fällen kommt es zur Expansion der doppelt negativen T-Zellen (CD4⁻CD8⁻) und zur Produktion von Autoantikörpern, da die CD95-vermittelte Apoptose gestört ist (Itoh *et al.*, 1991; Cohen *et al.*, 1991; Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992; Fisher *et al.*, 1995; Tolosa *et al.*, 1998; Straus *et al.*, 1999; Fleisher *et al.*, 2001).

1.2.5. Mitochondrien und ihre Rolle in der Apoptose (der intrinsische Weg)

Mitochondrien sind hoch strukturierte zelluläre Organellen, die in allen eukaryontischen Zellen vorkommen und deren Anzahl von der jeweiligen Zellart abhängt. Ihre Hauptfunktion ist die aerobe Reoxidation wasserstoffübertragender Koenzyme unter Bildung von ATP. Sie sind aus einer äußeren und inneren Mitochondrienmembran aufgebaut. Der von der inneren Mitochondrienmembran umhüllte Teil ist der Matrixraum. Zwischen den beiden Membranen befindet sich der Intermembranraum.

Eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion kann zum ATP-Verlust und Zelltod führen. Während der Apoptose wird die äußere Mitochondrienmembran permeabel. Dies führt zur Freisetzung von Cytochrom c, **Smac**/Diablo („second mitochondria-derived activator of caspase“) und dem apoptoseinduzierenden Faktor („apoptosis inducing factor, **AIF**“). Diese befinden sich normalerweise zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran. Cytochrom c bildet zusammen mit **Apaf-1** („apoptotic-protease-activating factor 1“) und der Procaspase 9 das Apoptosom. Es kommt zur Aktivierung der Caspase 9 und der Caspase 3, dadurch werden weitere apoptotische Substrate gespalten, was schließlich zu den irreversiblen morphologischen Änderungen und der Spaltung der DNA führt, die die Apoptose charakterisieren (Green *et al.*, 1998; Susin *et al.*, 1999; Kroemer *et al.*, 2000; Green *et al.*, 2004). Die Freisetzung dieser proapoptotischen Moleküle kann entweder durch die Bildung neuer Kanäle in der äußeren Membran, vermittelt durch die proapoptotischen Moleküle der Bcl-2 Familie (Bax, Bad, Bak, Bid), erfolgen oder aber durch die Zerstörung der Struktur der äußeren Mitochondrienmembran (Gross *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2003).

Während des programmierten Zelltodes kommt es zu Änderungen des Mitochondrienmembranpotentials ($\Delta\psi_m$). Verantwortlich hierfür ist die **PT-Pore** („Permeability Transition Pore“), die zur Depolarisation der Mitochondrien führt. Diese Pore durchspannt die innere und äußere Mitochondrienmembran und besteht aus Proteinen beider Membranen und der Matrix. Der **Adeninnukleotidtransporter ANT** („adenine nucleotide translocator“) in der inneren Membran und der spannungsabhängige Anionenkanal **VDAC** („Voltage Dependent Anion Channel“) in der äußeren Membran sind essentielle Komponenten dieser PT-Pore (Zoratti *et al.*, 1995; Martinou, 1999; Zamzami *et al.*, 2001; Halestrap *et al.*, 2003). Der ANT ist für den Transport von Metaboliten (ATP, ADP, NADH, FADH) über die innere Membran

in das Zytosol verantwortlich. Des weiteren befinden sich in der Matrix noch das Protein Cyclophilin D, das eine Peptidyl-Prolyl-Isomerase Aktivität besitzt, und das proapoptotische Molekül Bax, die beide an den ANT binden können (Narita *et al.*, 1998; Crompton *et al.*, 1998; Crompton, 1999; Andreeva *et al.*, 1999; Marzo *et al.*, 1998; He *et al.*, 2002 b; Halestrap *et al.*, 2002, 2003). Außerdem besteht eine Interaktion zwischen dem ANT und dem VDAC (Woodfield *et al.*, 1998).

Calcium, anorganische Phosphate, reaktive Sauerstoffspezies und ein alkalischer pH fördern die Bildung und Öffnung dieser Pore (Connern *et al.*, 1994), wohingegen Phospholipaseinhibitoren und ein saurer pH die Öffnung der Pore blockieren. Cyclosporin A (CsA), ein Immunsuppressivum, wurde ebenso als ein Inhibitor der PT-Pore angenommen (Bernardi *et al.*, 1993; Woodfield *et al.*, 1998; Pacher *et al.*, 2001; He *et al.*, 2002 b), das an das Cyclophilin D binden und somit die Öffnung der Pore verhindern kann (Connern *et al.*, 1992; Waldmeier *et al.*, 2003).

Durch Informationen unseres Kooperationspartners D. Stern wissen wir, dass ERAB („endoplasmic reticulum-associated amyloid β -peptide binding protein“) (siehe 1.3.1.) ein möglicher Inhibitor der PT-Pore ist. Durch seine Bindung an Cyclophilin D wird dieses an der Interaktion mit dem ANT gehindert und dadurch wird die Öffnung der Pore blockiert. Somit scheint dieses Protein in der Regulation von Apoptose eine wichtige Rolle zu spielen (siehe Abb. 2).

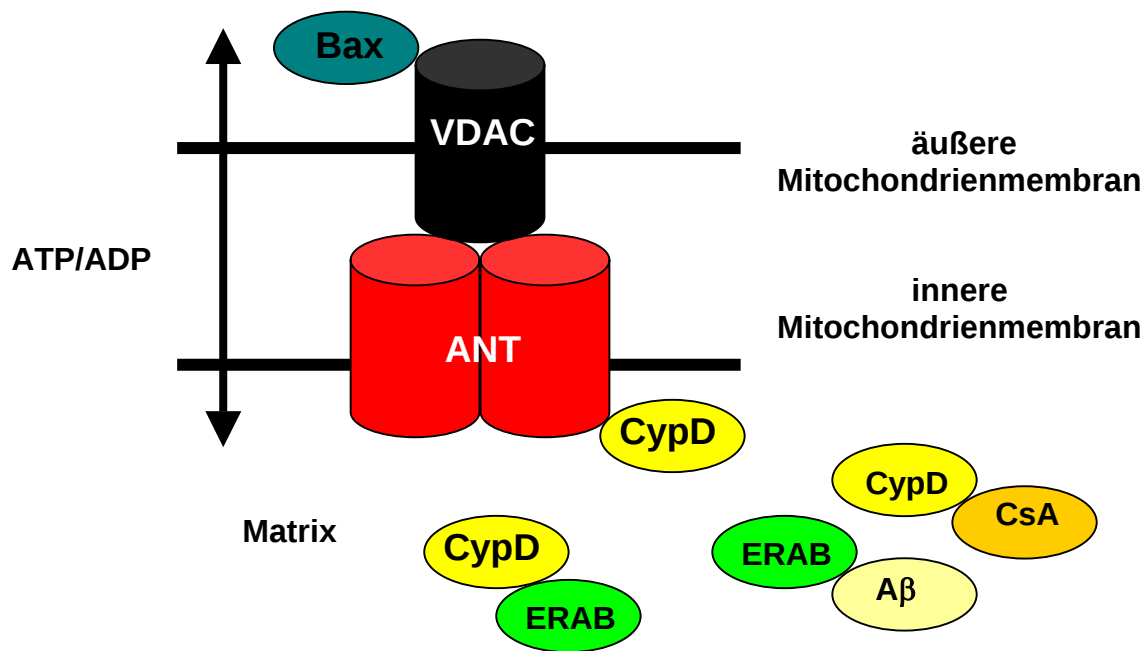


Abb. 2: Aufbau und mögliche Inhibitoren der PT-Pore

Die PT-Pore durchspannt die äußere und innere Mitochondrienmembran. Sie besteht aus dem Adeninnukleotidtransporter (ANT) in der inneren Membran und dem spannungsabhängigen Anionenkanal VDAC in der äußeren Membran. Der ANT transportiert die Metabolite ATP und ADP über die innere Membran in das Zytosol. Der ANT ist mit dem VDAC assoziiert.

Weitere Komponenten sind Cyclophilin D, eine Peptidyl-Prolyl-Isomerase, das an den ANT bindet, sowie das proapoptotische Molekül Bax, das zur Bcl-2 Familie gehört. In ruhenden Zellen liegt Bax zytosolisch vor. Es ändert seine Konformation in Antwort auf apoptotische Signale. Dabei transloziert es zum Mitochondrium und integriert sich in dessen äußere Membran.

Durch die Bindung des CsA an CypD kann dieses nicht mehr an den ANT binden und somit wird die Bildung der Pore unterdrückt. Ein weiterer möglicher Inhibitor der PT-Pore ist ERAB, das ebenfalls an CypD binden und dadurch dessen Bindung an den ANT verhindern kann. Jedoch kann in einer Aβ-reichen Umgebung dieses Molekül die Bindung von ERAB an CypD verhindern und dadurch wird die Öffnung der Pore gefördert.

1.3. 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenasen

17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenasen (17 β -HSDs) werden sowohl von niederen Organismen wie Bakterien, Hefen und Pilzen als auch von allen Vertebraten exprimiert (Mindnich *et al.*, 2004) und gehören zwei verschiedenen Proteinfamilien an. Die erste Familie ist die der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen („Short chain dehydrogenases/reductases, **SDR**“). Diese teilen sich einige Aminosäuresequenzen innerhalb der konservierten Bereiche, während außerhalb dieser Bereiche die Sequenzübereinstimmung nur ungefähr 20% beträgt (Jörnvall *et al.*, 1995; Oppermann *et al.*, 1997, 1999, 2001, 2003; Penning *et al.*, 1997). Die zweite Familie ist die der Aldo-Ketoreduktasen (AKR).

Es gibt verschiedene Formen der 17 β -HSDs, die durch enzymatische Analysen nachgewiesen werden konnten (Blomquist, 1995). Inzwischen konnten 12 verschiedene Formen charakterisiert werden, von denen die meisten Mitglieder der SDR Proteinsuperfamilie sind. Nur der 17 β -HSD Typ 5 gehört zur Familie der AKR (Mindnich *et al.*, 2004). Jedoch sind nicht alle dieser 12 17 β -HSDs in jeder Spezies vertreten. Die einzelnen 17 β -HSDs unterscheiden sich in ihrer Gewebeverteilung, der Bevorzugung für bestimmte Substrate, der intrazellulären Lokalisation und dem Mechanismus ihrer Regulation (Adamski *et al.*, 2001; Poirier, 2003; Vihko *et al.*, 2003).

1.3.1. ERAB (endoplasmic reticulum-associated amyloid β -peptide binding protein)

ERAB wurde erstmals mit Hilfe des Yeast Two-Hybrid Systems nachgewiesen, mit dem Bindungspartner für das Amyloid beta Peptid (A β), einem wichtigen Bestandteil der Alzheimer Krankheit, gesucht wurden (Yan *et al.*, 1997).

Die kurzkettige 3-Hydroxy-2-Methylacyl-CoA Dehydrogenase, die später als homologes zu ERAB erkannt wurde, konnte bereits in der Rattenleber nachgewiesen werden (Luo *et al.*, 1995). Sie wurde auch bei Studien der β -Oxidation der Fettsäuren im Rind gefunden und als mitochondriale L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase vom Typ II (HADH II) (E.C.1.1.1.35) beschrieben (Kobayashi *et al.*, 1996; Furuta *et al.*, 1997). Durch weitere Analysen wurde ERAB dann endgültig der Gruppe der kurzkettigen L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenasen/Reduktasen zugewiesen und

zusätzlich als **SCHAD** („short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase“) bezeichnet (He *et al.*, 1998; He *et al.*, 2000 b).

Bevor die Homologie zu den 17 β -HSDs bekannt war (He *et al.*, 1999), wurde das Protein ERAB genannt, da es zuerst im endoplasmatischen Retikulum detektiert werden konnte; daher sein erster Name **ERAB**, „endoplasmic reticulum-associated amyloid β -peptide binding protein“ (Yan *et al.*, 1997). Später wurde jedoch auch das Mitochondrium (genauer die mitochondriale Matrix) als Ort der Lokalisation identifiziert. Dies konnte mittels konfokaler Mikroskopie (Yan *et al.*, 1999; He *et al.*, 1999; He *et al.*, 2000 a, b; He *et al.*, 2001; Shafqat *et al.*, 2003), subzellulärer Fraktionierung (Luo *et al.*, 1995; He *et al.*, 2001), dem Proteinimport (Furuta *et al.*, 1997), der Immunhistologie (Frackowiak *et al.*, 2001) und der Elektronenmikroskopie (He *et al.*, 2002 a) bestätigt werden. In Neuronen kommt es ausschließlich in den Mitochondrien vor (Furuta *et al.*, 1997; Torroja *et al.*, 1998; He *et al.*, 2001; Takuma *et al.*, 2005). Somit ist ERAB die einzige 17 β -HSD mit einer Lokalisation im Mitochondrium.

ERAB ist auf dem X-Chromosom (Xp11.2) lokalisiert und besteht aus sechs Exons und fünf Introns. Seine molekulare Masse beträgt 108 kDa. Die aminoterminal NAD-Bindungsregion wird von den ersten drei Exons kodiert, während die Exons vier bis sechs die carboxyterminale Substratbindungsregion mit den katalytischen Bereichen kodieren (He *et al.*, 1998). Seine Aminosäuresequenz ist zu ~ 65% mit der Familie der kurzkettigen Alkoholdehydrogenasen identisch. Zu dieser Familie gehören auch die Hydroxysteroiddehydrogenasen und die Acetoacetyl CoA-Reduktasen, die alle NAD(P)H als Koenzym benötigen (Jörnvall *et al.*, 1995; Yan *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2000 a, b; He *et al.*, 2000 b; Powell *et al.*, 2000; Kallberg *et al.*, 2002). Es hat jedoch als einziges Mitglied der Familie der Hydroxysteroid Dehydrogenasen eine Affinität zum Amyloid beta-Peptid (A β) (Yan *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2000 b; Lustbader *et al.*, 2004).

Seine enzymatischen Funktionen sind sehr breit gefächert, da es sowohl mit linearen Alkoholen, verzweigtkettigen Fettsäuren, Aminosäurekataboliten als auch mit Steroiden reagieren kann (Kobayashi *et al.*, 1996; Furuta *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1997; He *et al.*, 1998; He *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2005 b). Daher wurde es dann auch in **ABAD** („amyloid β -peptide binding alcohol dehydrogenase“) umbenannt, obwohl seine Aktivität als Alkoholdehydrogenase sehr gering ist (Yan *et al.*, 1999; He *et al.*, 2000 b). Jedoch ist seine Fähigkeit, das A β zu binden, einzigartig.

Das Enzym kommt in allen Geweben vor (He *et al.*, 2000 b; He *et al.*, 2001; He *et al.*, 2003). Seine höchste Expression hat es in Leber und Herz (Yan *et al.*, 1997). Außerdem wird es in großen Mengen in Gehirnen von Alzheimer Patienten gefunden, wo es hauptsächlich in den mitochondrialen Neuronen vorliegt. Durch seine Bindung an das A β trägt es zu dieser Krankheit bei (Yan *et al.*, 1997; Beyreuther *et al.*, 1997).

In der nachfolgenden Tabelle sind, chronologisch geordnet, die verschiedenen Namen für ERAB aufgelistet. Jedoch ist bei den Publikationen keine einheitliche Linie zu finden. Daher wird in der folgenden Arbeit immer mit dem Begriff ERAB gearbeitet. Nur bei Originalzitaten aus Veröffentlichungen werden die Abkürzungen aus der Tabelle verwendet.

Tabelle 1: Chronologische Auflistung der verschiedenen Namen für ERAB
(adaptiert nach Yang *et al.*, 2005 b)

Jahr	Name	Abkürzung	Referenz
1995	Short-Chain 3-hydroxy-2-methylacyl-CoA dehydrogenase (Ratte)	SC-HMAD	Luo <i>et al.</i> , 1995
1996	3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type 2 (Leber)	HADH II	Kobayashi <i>et al.</i> , 1996; Ofman <i>et al.</i> , 2003
1997	Endoplasmic reticulum-associated amyloid β -binding protein (human)	ERAB	Yan <i>et al.</i> , 1997
1998	Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (human)	SCHAD	He <i>et al.</i> , 1998
1999	Amyloid β -peptide-binding alcohol dehydrogenase (human)	ABAD	Yan <i>et al.</i> , 1999
2001	17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 10 (human)	17 β -HSD 10	He <i>et al.</i> , 2001
2003	2-Methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (human)	MHBD	Ofman <i>et al.</i> , 2003

1.3.2. Scully, das homologe Gen zu ERAB in Drosophila

Scully konnte als homologes Gen zu ERAB in Drosophila nachgewiesen werden, wobei die Homologie ~ 65% beträgt. Seine enzymatischen Funktionen sind mit denen der humanen 17 β -HSD vergleichbar (Shafqat *et al.*, 2003), jedoch ist es in Drosophila ein zytosolisches und kein mitochondriales Enzym. Es ist außerdem das erste Enzym, das mit der β -Oxidation der Fettsäuren in Drosophila in Zusammenhang gebracht werden konnte. Die Ausschaltung des Gens scully in Drosophila führt zu einem letalen Phänotyp. Dabei konnten vier verschiedene letale Punktmutationen des sogenannten scu-Allels nachgewiesen werden, die zu einer Fettanhäufung und aberranten Mitochondrien führen. Die Mutation scu³¹²⁷ führt zu einer Veränderung am Amino-Terminus innerhalb des Exons 2, die die Koenzym-Bindungsstelle einschließt. Fliegen mit dieser Mutation sind zu Beginn der Embryonalentwicklung lebensfähig, sterben aber, sobald sie die letzte Stufe des dritten Larvenstadiums erreichen. Die Mutation scu⁴⁰⁵⁸ liegt im Bereich, der die funktionelle Domäne des Enzyms kodiert. Die Mutationen scu¹⁷⁴ und scu^{S152} führen zu einem einzelnen Aminosäureaustausch. Bei scu¹⁷⁴ liegt dieser im Bereich der Kofaktorbindungsstelle.

Die scully-Expression ist in unbefruchteten Oozyten noch gering, nimmt dann aber während der Embryonalentwicklung zu. Auch die ausgereiften Ovarien und Hoden zeigen eine hohe Expression des Gens. Da die Spermien ihre Energie hauptsächlich aus der β -Oxidation der Fettsäuren beziehen, sind die Hoden dieser einzelnen scu-Mutanten in ihrer Größe reduziert und nicht in der Lage, reife Spermien zu entwickeln. Außerdem sind die Mitochondrien nicht voll entwickelt. Auch die Eierstöcke sind nicht in der Lage, lebensfähige Eier zu produzieren (Torroja *et al.*, 1998).

Bei diesem Phänotyp in Drosophila zeichnet sich ein Vergleich zu humanen Pathologien ab, die ebenfalls durch Fehler in der β -Oxidation der Fettsäuren ausgelöst werden (Eaton *et al.*, 1996; Wanders *et al.*, 1999; Rinaldo *et al.*, 2002). Ein ganz wichtiges Charakteristikum dabei ist der mitochondriale Polymorphismus, der auch bei Drosophila beobachtet werden konnte. Denn die mutierten Photorezeptoren der Fliegen enthalten von der normalen Form abweichende Mitochondrien und eine mehrschichtige Anhäufung von membranartigem Material (Torroja *et al.*, 1998). Des weiteren kommt es bei Defekten der β -Oxidation zur zytoplasmatischen Anhäufung von Fetten, da die Fettsäuren nicht effektiv genug in die Mitochondrien transportiert

werden können. Außerdem führt die fehlende Enzymaktivität zur Zerstörung des mitochondrialen CoA-Pools. Dies konnte in den Hoden von allen scu-Mutanten nachgewiesen werden. Denn die Hoden zeigten Verfettungen (Torroja *et al.*, 1998). Es gibt zwar Isoenzyme, die gleiche Reaktionen katalysieren können, sich jedoch in ihrer Affinität für die Substrate unterscheiden oder aber nur gewebespezifisch exprimiert werden. Daher kann das Fehlen eines einzelnen Enzyms weitreichende Folgen haben.

1.3.3. ERAB und seine Funktion im Isoleucin-Stoffwechsel

ERAB ist ebenso ein Homologes zum Enzym 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (**MHBD**, EC 1.1.1.178), das eine entscheidende Rolle im Isoleucin-Stoffwechsel spielt. Das Enzym katalysiert die NAD-abhängige Oxidation von 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA, einem Zwischenprodukt im Isoleucin-Stoffwechsel, zu 2-Methyl-Acetoacetyl-CoA (Luo *et al.*, 1995). Der Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren wie Isoleucin erfolgt vorwiegend in den peripheren Organen wie Skelett- und Herzmuskulatur und den Nieren. Die Endprodukte dieses Weges sind Acetyl-CoA und sein Homologes Propionyl-CoA, die für weitere Stoffwechselwege als Ausgangsprodukte dienen.

Durch einen Mangel des Enzyms MHBD kommt es zu Anhäufungen von 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA und Tiglylglycin (siehe Abb. 3). In den betroffenen Personen sind daher erhöhte Werte dieser beiden Zwischenprodukte im Urin nachweisbar. Der vollständige Abbauweg bis zum Acetyl-CoA und Propionyl-CoA ist somit nicht möglich. Ein MHBD-Mangel führt zu einer erblichen Stoffwechselkrankheit mit neurodegenerativem Krankheitsbild (Zschocke *et al.*, 2000; Ensenauer *et al.*, 2002; Olpin *et al.*, 2002). Diese Krankheit wird durch Mutationen im HADH2 Gen ausgelöst, welches auf dem X-Chromosom (Xp11.2) lokalisiert ist. Während die Punktmutation R130C die Stabilität und die Aktivität des Enzyms beeinflusst, führt die Punktmutation L122V nur zu einer reduzierten Enzymaktivität (Ofman *et al.*, 2003). Von der Krankheit betroffene Männer zeigen schwerere Symptome als betroffene Frauen (Ofman *et al.*, 2003; Ensenauer *et al.*, 2002).

Der Zusammenhang zwischen den Mutationen im HADH2-Gen und dem neurologischen Krankheitsbild konnte bis jetzt noch nicht aufgeklärt werden.

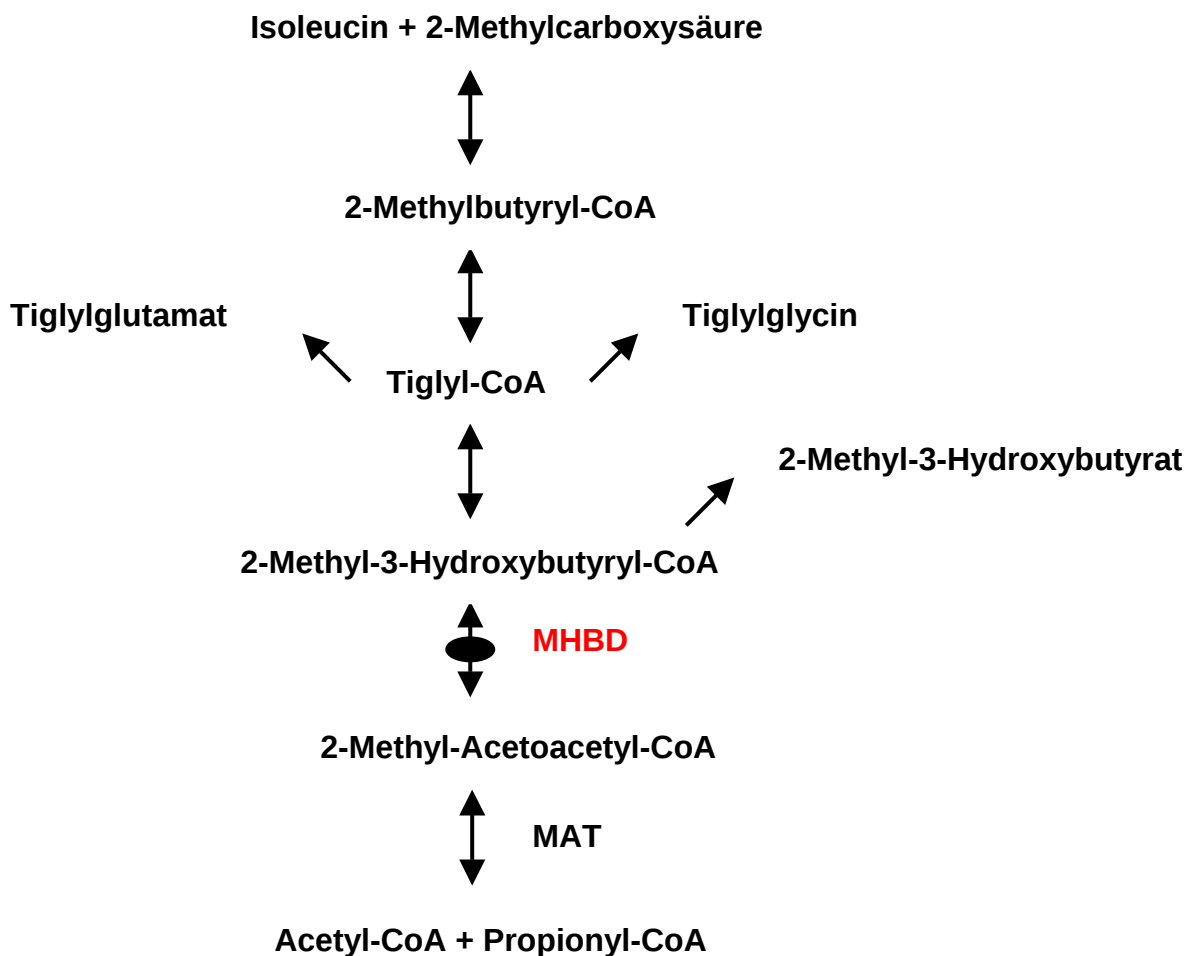


Abb. 3: ERAB/MHBD und seine Rolle im Isoleucinstoffwechsel, adaptiert nach Sass *et al.*, 2004

Die verzweigtkettige essentielle Aminosäure Isoleucin wird in mehreren Stufen durch verschiedene Enzyme zu den wichtigen Metaboliten Acetyl-CoA und Propionyl-CoA abgebaut. Diese werden für weitere Stoffwechselwege, die der Energiegewinnung dienen, als Ausgangssubstanzen benötigt.

Durch einen Mangel des Enzyms MHBD (2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA) wird der vollständige Abbauweg unterbrochen und es kommt zu Anhäufungen der Stoffe 2-Methyl-3-Hydroxybutyrat und Tiglylglycin im Urin der betroffenen Personen.

1.3.4. ERAB und seine Funktion im Steroid- und Fettsäure-Metabolismus

HSDs und ihre Isoenzyme spielen eine wichtige Rolle sowohl in der Biosynthese als auch in der Inaktivierung von Steroidhormonen (Labrie *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2005 b). In steroidhaltigen Geweben katalysieren sie die letzten Schritte der Androgen-, Östrogen- und Progesteronbiosynthese. In den peripheren Geweben, die Zielgewebe der Steroidhormone eingeschlossen, regulieren sie die Hormonmengen, die an den Steroidrezeptor binden können (Penning *et al.*, 1997). Im allgemeinen wandeln HSDs Steroide an ihren Positionen 3, 5, 11, 17 und 20 um.

17 β -HSD 10/ERAB spielt eine wichtige Rolle im Metabolismus der Geschlechtshormone. Seine Expression konnte in der Prostata und den Hoden nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass ERAB eine oxidative Hydroxysteroiddehydrogenase ist, die 3- α -adiol in das aktive Androgen Dihydrotestosteron umwandeln kann (He *et al.*, 2000 a; He *et al.*, 2001; He *et al.*, 2003). Obwohl ERAB ubiquitär in den Geschlechtszellen exprimiert wird, ist seine Expression in den Leydig Zellen der Hoden am größten (Hansis *et al.*, 1998; Ivell *et al.*, 2003). Außerdem kann es in der Plazenta und den Eierstöcken das 17 β -Östradiol inaktivieren (He *et al.*, 1999; He *et al.*, 2000 a).

Als multifunktionelles Enzym zeigt ERAB auch Aktivitäten im Metabolismus der Neurosteroiden und der Aufrechterhaltung der normalen Funktion der GABAergen Neuronen (He *et al.*, 2005 a, b).

Des Weiteren zeigt die 17 β -HSD 10 eine L-spezifische 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase-Aktivität und ist daher auch in der mitochondrialen β -Oxidation der Fettsäuren involviert. Dabei wandelt es das 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA in 2-Methyl-Acetoacetyl-CoA um (Kobayashi *et al.*, 1996; Furuta *et al.*, 1997; He *et al.*, 1998; He *et al.*, 2000 a; Powell *et al.*, 2000). Diese mitochondriale β -Oxidation der Fettsäuren dient als Energiequelle und zur Gewinnung von Acetyl-CoA, das für weitere Stoffwechselwege ein wichtiges Substrat darstellt. Wird dieser mitochondriale CoA Pool z. B. durch ein defektes oder fehlendes Enzym gestört, kommt es zu keiner weiteren Oxidation und zur Akkumulation von Fetten im Zytoplasma. Die hepatische β -Oxidation dient außerdem der Gewinnung von Ketonkörpern, die als Energiequelle für das Gehirn eingesetzt werden können, gerade dann, wenn die Glukosemengen gering sind, z. B. während einer Fastenperiode (Eaton *et al.*, 1996; Rinaldo *et al.*, 2002). Obwohl seine Aktivität im Metabolismus von Ketonkörpern *in vivo* sehr gering ist, kann ERAB unter Stressbedingungen, wie mangelnder Nahrungsaufnahme, die

Funktion der mitochondrialen β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase, die normalerweise für die Oxidation von β -Hydroxybutyrat zuständig ist, übernehmen. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Überexpression von ERAB in Neuronen sich auch dessen Aktivität gegenüber dem β -Hydroxybutyrat erhöht (Yan *et al.*, 2000 a; Yan *et al.*, 2005).

1.3.5. ERAB und seine Rolle in der Alzheimer Krankheit und der Apoptose

Wie bereits erwähnt ist ERAB die einzige bekannte 17 β -HSD mit einer Affinität zum Amyloid beta Peptid (A β). Dieses A β -Peptid trägt zur Alzheimer Krankheit bei. Durch die Bindung mit A β wird die Aktivität des Enzyms inhibiert, da A β die NAD-Bindungsstelle von ERAB blockiert (Yan *et al.*, 1999; Oppermann *et al.*, 1999; Lustbader *et al.*, 2004; Kissinger *et al.*, 2004). Eine Interaktion von SCHAD/ERAB und A β führt *in vitro* zur Generierung von Lipidperoxidaionsprodukten wie Hydroxynonenal und Malondialdehyd (He *et al.*, 1999; Oppermann *et al.*, 1999). Eine Aktivität mit Quinonen konnte nicht bestätigt werden (Salim *et al.*, 2000).

Es konnte zwar zu Beginn keine Bindung zwischen ABAD/ERAB und A β *in vivo* in den Gehirnen von Alzheimer Patienten nachgewiesen werden (Frackowiak *et al.*, 2001), doch weitere Untersuchungen widerlegten diesen Befund. Die betroffenen Gebiete in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten enthalten deutlich mehr ABAD/ERAB als die gleichaltriger Kontroll-Patienten (Yan *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 2000 b; Yang *et al.*, 2001; Lustbader *et al.*, 2004; He *et al.*, 2005 b). Die Annahme, dass ERAB in einer A β -reichen Umgebung vom ER zur Plasmamembran transloziert (Yan *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1999), konnte durch die direkte Interaktion von ABAD/ERAB mit A β im Mitochondrium widerlegt werden. Dies konnte sowohl in Gehirnen von Alzheimer-Patienten als auch in doppelt transgenen Mäusen für ABAD/ERAB und einer mutierten Form des humanen A β -Peptids (mAPP) gezeigt werden (Lustbader *et al.*, 2004). Ein weiteres Mausmodell für Alzheimer ist die sogenannte „Hsiao’s APP-Sw“ transgene Maus (Tg2576). Analysen dieser Maus ergaben, dass HSD 10/ERAB in den amyloiden Plaques, den Blutgefäßen und den Mitochondrien im Gehirn vorkommt (Wen *et al.*, 2002).

Bei der Alzheimer Krankheit gibt es Beweise dafür, dass der Energiehaushalt des Gehirns gestört ist. Werden ABAD/ERAB und A β gemeinsam *in vitro* hochexprimiert, kommt es zur Erhöhung der zellulären Toxizität und zu einer vermehrten DNA-

Fragmentierung (Yan *et al.*, 1999). In Neuronen von doppelt transgenen Mäusen für ABAD/ERAB und humanem mAPP (TgmAPP/ABAD) konnte *in vitro* gezeigt werden, dass es zur Abnahme der COX-Aktivität (mitochondrialer Komplex IV der Atmungskette) in den doppelt transgenen Mäusen und zu einem verminderten cerebralen Glucosemetabolismus *in vivo* kommt (Yan *et al.*, 2005; Takuma *et al.*, 2005). Außerdem können *in vitro* in den Neuronen dieser Tiere erhöhte Mengen an freien Radikalen und Peroxiden (Superoxid, Wasserstoffperoxid) aus den Mitochondrien freigesetzt werden, die zu einem ATP-Verlust führen. Zusätzlich fördern die Oxide den programmierten Zelltod, der zu einer erhöhten Caspase-3 ähnlichen Aktivität in Neuronen, DNA-Fragmentierung, Cytochrom c-Freisetzung und erhöhten Lactatdehydrogenasefreisetzung aus dem Mitochondrium führt. Einfach transgene Mäuse für ABAD/ERAB (TgABAD) hingegen sind unauffällig. Des weiteren gibt es bei allen transgenen Mäusen (TgABAD, TgmAPP, TgmAPP/ABAD) keine Beeinträchtigungen hinsichtlich ihrer Entwicklung, im Fortpflanzungsverhalten und ihrer Lebenserwartung. Jedoch zeigen die doppelt transgenen Tiere ein vermindertes Lernverhalten (Lustbader *et al.*, 2004; Takuma *et al.*, 2005). Eine Überexpression von ABAD/ERAB in Neuronen führt zu einem erhöhten Acetyl-CoA-Fluss in den Zitratzyklus, dadurch erhöht sich der ATP-Gehalt des Gehirns, und es kommt zur effektiven Nutzung von β -Hydroxybutyrat, ein Substrat, das vermehrt in Stresssituationen gebildet wird (Takuma *et al.*, 2005).

So hat ERAB/ABAD zwei Seiten, einerseits kann es in einer A β -freien Umgebung zur metabolischen Homöostase beitragen, während es in Gegenwart von A β zu zellulären Fehlfunktionen, einem Verlust der Enzymaktivität, zur Anhäufung toxischer Metabolite, der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies und einem Verlust der zellulären Energie kommen kann.

1.3.6. ERAB und seine Rolle in der Parkinson Krankheit

Die Parkinson Krankheit erzeugt ein neurodegeneratives Krankheitsbild, bei dem es zum Verlust der dopaminergen Neuronen der substantia nigra pars compacta kommt. Als Folge wird die Aktivität des Komplexes I der Atmungskette (NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase) im Gehirn beeinträchtigt, was die Sauerstoffversorgung stört (Dauer *et al.*, 2003). Alternative Energiesubstrate für das Gehirn sind z. B. Ketonkörper und D- β -Hydroxybutyrat (Kashiwaya *et al.*, 2000; Tieu *et al.*, 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass ABAD/ERAB in den dopaminergen Neuronen von Parkinson-Kranken vermindert vorkommt. Ein Mausmodell mit Parkinson-ähnlichen Symptomen wurde mit Hilfe des Neurotoxins 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) erzeugt, das ebenfalls den Komplex I der Atmungskette blockiert (Lustbader *et al.*, 2004). In einer weiteren Studie zu dieser Erkrankung konnte bewiesen werden, dass die Überexpression von ABAD/ERAB die mitochondriale Atmung und die ATP-Produktion verbessert. Das Enzym ist in der Lage, die Blockade des Komplexes I durch MPTP aufzuheben, was durch seine Translokation von der Matrix zur inneren Mitochondrienmembran erfolgt (Tieu *et al.*, 2004). Daher könnte die Überexpression von ABAD/ERAB im Gehirn ein Schutz vor Parkinson sein.

1.4. Möglichkeiten zur Herstellung genetisch veränderter Mäuse

Die Untersuchung der Funktion einzelner Gene wurde mit Hilfe der beiden Verfahren zur Herstellung von transgenen Mäusen (Gordon *et al.*, 1980; Costantini *et al.*, 1981) und Knock-out Mäusen (Thomas *et al.*, 1987; Capecchi, 1989 a, b) möglich. Dadurch kann der Einfluss von Genen auf den Organismus *in vivo* verfolgt werden (Lewandowski, 2001).

Zur Generierung von Knock-out Mäusen nutzt man die homologe Rekombination, bei der ein exogenes Stück der DNA genau an der gleichen Stelle im Genom integriert, an dem sich sein endogenes Gegenstück befindet, d. h. es kommt zum Austausch einer spezifischen DNA-Sequenz. Der Austausch des interessierenden Gens erfolgt in embryonalen Stammzellen der Maus. Dies sind kontinuierlich wachsende pluripotente Zellen, aus denen sich noch alle Zelllinien entwickeln können. Nach der Injektion dieser genetisch veränderten Zellen in den 3,5 Tage alten Blastocysten einer Maus integrieren sich die ES-Zellen in diesen Blastocysten und nehmen an der Ausbildung aller Gewebe teil. Gelangt dieses veränderte Gen dabei auch in die Keimbahn, wird es auf die Nachkommen übertragen (Fung-Leung *et al.*, 1992; Hogan *et al.*, 1994).

Bei der Generierung von Knock-out Mäusen kann es allerdings auch vorkommen, dass ein Gen ausgeschaltet wird, das in der Entwicklung von so großer Bedeutung ist, so dass sein Fehlen zu einem embryonal letalen Phänotyp führt. Um dies zu umgehen, wurden konditionale Mutanten entwickelt. Dies bedeutet, dass Gene z. B. nur in bestimmten Gewebearten oder zu einem bestimmten Zeitpunkt ausgeschaltet werden können. Dafür werden die Rekombinasen Cre und Flp eingesetzt (van der Weyden *et al.*, 2002; Bockamp *et al.*, 2002).

1.4.1. Die Rekombinasen Cre und Flp

Die Locus-spezifischen Rekombinasen („site-specific recombinases, **SSRs**“) Cre („causes recombination“) und Flp sind Mitglieder der λ -Integrase Superfamilie und stellen eine Kombination aus Restriktionsenzym und Ligase dar.

Die Cre Rekombinase, ein 38 kDa Protein aus dem Bakteriophagen P1, erkennt eine 34 bp lange Sequenz auf der DNA, bestehend aus einer 8 bp langen asymmetrischen richtungsgebenden Kernsequenz, die von zwei palindromischen

Sequenzen aus 13 bp flankiert wird. Diese Sequenz wird als loxP-Sequenz („locus of crossing over“) bezeichnet (Sadowski *et al.*, 1993). Die Cre Rekombinase schneidet bei der Rekombination ein DNA-Fragment, das von zwei loxP-Stellen flankiert wird, als Ring heraus. Zurück bleibt eine einzelne 34 bp große loxP-Stelle in jedem Reaktionsprodukt. Befinden sich die beiden loxP-Stellen auf dem gleichen DNA-Strang in gegensätzlicher Orientierung zueinander, kommt es zur Inversion der dazwischenliegenden Region. Die Rekombination zwischen zwei loxP-Stellen auf unterschiedlichen DNA-Strängen führt zur Translokation (Kilby *et al.*, 1993; Kühn *et al.*, 1997). Die Exzision ist *in vivo* irreversibel, da die intramolekulare Hinreaktion gegenüber der intermolekularen Rückreaktion überwiegt (Metzger *et al.*, 1999). Die Cre-Rekombinase kann zur Einführung einer Punktmutation, zur Entfernung genomischer Sequenzen oder zum Austausch von Genen eingesetzt werden (Abuin *et al.*, 1996; Buchholz *et al.*, 2001).

Die 43 kDa große Flp-Rekombinase aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* erkennt FRT-Stellen („Flp recombination target“), die 34 bp umfassen, auf der DNA. Meistens wird jedoch die Cre-Rekombinase eingesetzt, da sie *in vivo* effektiver als die Flp-Rekombinase ist, da deren Temperaturoptimum bei 37°C liegt und nicht, wie das der Flp-Rekombinase, bei 30°C (Buchholz *et al.*, 1996; Ringrose *et al.*, 1998). Mittlerweile wurden jedoch auch mutierte Formen der Flp-Rekombinase entwickelt, die sogenannte FlpL, die temperatursensitiver ist (Buchholz *et al.*, 1998), und die Flpe, eine verstärkte Form („enhanced Flp“) (Rodriguez *et al.*, 2000).

Sowohl die Cre- als auch die Flp-Rekombinase können unter einem gewebespezifischen Promoter exprimiert werden. Kombiniert man die beiden Systeme, so können in einem System zwei unterschiedliche DNA-Sequenzen flankiert („gefloxt“) werden. Mit Hilfe der Rekombinasen kann man das zu untersuchende Gen in einem bestimmten Entwicklungsstadium entweder ein- oder ausschalten und hat somit die Möglichkeit, embryonal letale Gene auch im erwachsenen Tier zu untersuchen (Metzger *et al.*, 2001).

Es gibt mittlerweile Cre-Mauslinien, die Gene in spezifischen Zelltypen ausschalten können, wie z. B. den Endothelzellen (Constien *et al.*, 2001), in T-Lymphozyten (Gu *et al.*, 1994), B-Lymphozyten (Rickert *et al.*, 1997), Makrophagen (Takeda *et al.*, 1999), in der Leber (Postic *et al.*, 1999), in Keratinozyten (Tarutani *et al.*, 1997) oder aber auch in bestimmten Regionen des Gehirns (Kellendonk *et al.*, 1999). Um dies zu erreichen, fügt man die loxP-Stellen in das Genom ein und kreuzt jede gefloxt

Maus mit jeder beliebigen Cre-deleter Maus, die Cre unter der Kontrolle eines gewebespezifischen oder induzierbaren Promoters exprimiert (Schwenk *et al.*, 1995; Rajewsky *et al.*, 1996; Metzger *et al.*, 2001).

Eine Erweiterung der Cre-Rekombinationstechnik stellt eine chemisch induzierbare Form von Cre dar. Dies bedeutet, dass auch eine zeitlich kontrollierte Form der Rekombination möglich ist (Logie *et al.*, 1995). Die erste so induzierbare Cre-Maus konnte mit Hilfe des Mx1-Promotors generiert werden. Die Aktivierung von Cre ist in diesem Falle mittels INF- α und INF- γ möglich (Kühn *et al.*, 1995). Heute gibt es die sogenannten Formen Cre-ER^T und Cre-ER^{T2}, die die Ligandenbindungsdomäne eines mutierten humanen Östrogenrezeptors tragen, der durch die exogene Substanz Tamoxifen oder dessen Derivat 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) aktiviert werden kann (Feil *et al.*, 1996; Kellendonk *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996; Brocard *et al.*, 1997; Kellendonk *et al.*, 1999; Schwenk *et al.*, 1998; Indra *et al.*, 1999; Fuhrmann-Benzakein *et al.*, 2000; Vooijs *et al.*, 2001; Forde *et al.*, 2002). Durch die Bindung dieser exogenen Substanzen wird das Fusionsprotein aus seiner Bindung mit Hitzeschockproteinen im Zytoplasma befreit, transloziert in den Kern und vermittelt dort die Rekombination. Voraussetzung für diese Cre-Induktion ist, dass der natürliche Ligand nicht mehr an den Rezeptor binden kann. Denn nur so ist eine kontrollierte Rekombination möglich.

Eine weitere Möglichkeit zur kontrollierten Genexpression *in vivo* ist das Tetrazyklin-regulierte System (Gossen *et al.*, 1992), dessen großer Vorteil seine Reversibilität ist. Außerdem besteht die Möglichkeit, mit Hilfe von Adenoviren eine Rekombination zu erzeugen (Akagi *et al.*, 1997). Dies konnte schon erfolgreich für Hepatozyten gezeigt werden (Lee *et al.*, 1997; Wakita *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1999).

2. Fragestellung

Die Induktion peripherer T-Zelltoleranz und ihre Brechung sind zentrale Themen der Arbeitsgruppe. Dabei wurde in früheren Studien gezeigt, dass eine Aktivierung autoreaktiver T-Zellen gegen ein Gewebsantigen nicht ausreichend ist, um zu einer Gewebeerstörung in dem entsprechenden Organ zu führen. Eine „Konditionierung“ des Gewebes durch Entzündungsprozesse sowie eine hohe Frequenz autoreaktiver T-Zellen sind notwendige Faktoren für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Unser Interesse gilt daher Proteinen, die Entzündungsprozesse perpetuieren bzw. in der Apoptose von T-Zellen involviert sind. Das Gen ERAB („endoplasmic reticulum-associated amyloid β -peptide binding protein“) könnte in diesem Zusammenhang eine wichtige Funktion haben. Durch persönliche Informationen unseres Kooperationspartners D. Stern wissen wir, dass ERAB in der T-Zell-Apoptose involviert sein könnte.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher zur Untersuchung der *in vivo* Funktionen von ERAB entsprechende Knock-out Mäuse etabliert und charakterisiert werden. Da bereits Punktmutationen in *Drosophila* zu einem letalen Phänotyp führen, war dies auch für die Knock-out Mäuse zu befürchten. Daher sollten konditionale Mäuse für ERAB generiert werden. Zur Herstellung der genetisch veränderten Mäuse sollte die Genkonstruktion über homologe Rekombination in ES-Zellen eingebracht werden. Die durch Injektion positiv rekombinierter ES-Zellklone erhaltenen Keimbahnchimären sollten zunächst mit Flp deleter Mäusen verpaart werden, um das zur Selektion der rekombinierten ES-Zellklone notwendige Neomycin-Resistenz-Gen zu entfernen. Durch die Verpaarung mit Cre deleter Mäusen, die Cre Rekombinase unter einem ubiquitären bzw. zelltypspezifischen Promoter exprimieren, sollte in den resultierenden Tieren der Einfluss von ERAB auf den gesamten Organismus bzw. auf die Funktion der entsprechenden Gewebszellen untersucht werden.

Sowohl Tie2- als auch Ick-Cre transgene Tiere standen zur Verfügung. Der Tie2 Promoter ermöglicht eine spezifische Cre-vermittelte Rekombination ausschließlich in Endothelzellen und hämatopoetischen Stammzellen. Damit kann der Einfluss von ERAB auf die Entwicklung verschiedener an der Immunantwort beteiligten Zellen untersucht werden. Mit Hilfe der Ick transgenen Linie können die T-Zellen in Bezug auf die ERAB-Funktion untersucht werden, und zwar speziell in der T-Zellentwicklung und dem Verhalten dieser Zellen während der Apoptose.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Bezugsquellen

3.1.1.1. Chemikalien

Es wurden Chemikalien und Grundsubstanzen von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

3.1.1.2. Enzyme

Die Restriktionsenzyme und andere DNA/RNA modifizierenden Enzyme wie DNase und RNase wurden von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon Rot), Roche (Mannheim), Promega (Mannheim), New England Biolabs (Bad Schwalbach), Stratagene (Amsterdam, Niederlande), Bioron (Ludwigshafen) und Invitrogen (Eggenstein) bezogen.

3.1.1.3. Gebrauchswaren

Die Plastikartikel für die Zellkultur und die molekularbiologischen Arbeiten wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Gilson (Villiers le Bel, Frankreich), Greiner (Frickenhäusen), Falcon (Becton Dickinson), Nalgene, Nunc, Starlab (Ahrensburg) und Renner (Dannstadt) bezogen.

3.1.2. Verwendete Kits

RNeasy Total RNA Kit (Qiagen)	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebekomogenisaten und Zellhomogenisaten über Säulen
SYBR [®] Green Core Reagents	Real Time PCR zum Nachweis der Genexpression in Geweben und Zellen
MACS Microbeads	Zellseparation mittels magnetbeadgekoppelter Antikörper

3.1.3. Geräte

Brutschrank	Forma Scientific
Elektrophoresekammern	Neo Biolab
Eismaschine Wesamat	Zugck (Leimen)
FACScan/FACS-Calibur	Becton Dickinson (Heidelberg)
FastPrep Instrument	Qbiogene (Heidelberg)
Flüssigstickstoff-Lagerbehälter	Messer Griesheim (Düsseldorf)
Gamma-Strahlungsmessgerät Cobra	Packard (Dreieich)
GeneAmp 5700 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Kaltlichtlampe KL 1500-Z	Schott (Göttingen)
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr; Bosch
Lumi-Imager	Boehringer Mannheim
Magnetrührer, Heizplatte MR 3002	Heidolph
Mikroskop	Olympus
PCR-Block Peltier Thermal Cycler 200	MJ Research Inc. (Watertown, USA)
pH-Meter 761 Calimetric	Knick
Photometer Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech
(Schüttel-)Wasserbad	Köttermann (Hänigsen)
Sterilbank Biogard Hood	Baker Company Inc. (Maine, USA)
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Tom Tec Harvester	Perkin Elmer
UV-Stratalinker 2400	Stratagene
Vakuumofen	Heraeus
Waagen	Satorius (Göttingen); Mettler
Zentrifuge Omnifuge 2,0 S	Heraeus

3.1.4. Puffer und Lösungen

In der Regel wurden die Lösungen mit doppelt deionisiertem und autoklaviertem Wasser angesetzt, bei Elektrophoresepuffern genügt einfach deionisiertes Wasser. Bei konzentrierten Stammlösungen ist der Konzentrationsfaktor in Klammern angegeben. Lagerungstemperaturen sind ebenfalls in Klammern angegeben. Lösungen, die autoklaviert werden müssen, sind mit * gekennzeichnet.

BCIP-Lösung	50 µg/ml in 70% DMF/H ₂ O
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH; 1 M NaCl
Denhardt´s (-20°C) *	1% Ficoll; 1% BSA; 1% Polyvinylpyrrolidon
dNTP-Mix (10 x) (-20°C)	2 mM dATP; 2 mM dTTP; 2 mM dCTP; 2 mM dGTP
Gewebepuffer	100 mM Tris/HCl pH 8,5; 200 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,2% SDS
Hybridisierungslösung (-20°C)	5 x Denhardt´s; 4 x SSPE; 1% SDS; 100 µg/ml Heringssperma-DNA
Ladepuffer (-20°C)	0,1% Bromphenolblau; 0,1% Xylen Cyanol FF; 15% Ficoll
MACS-Puffer	1 x PBS pH 7,2, 0,5% FCS, 2 mM EDTA
NBT-Lösung	75 mg/ml in DMF
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris/HCl pH 7,4; 3 M NaCl
PBS (10 x) *	1,3 M NaCl; 0,026 M KCl; 0,015 M KH ₂ PO ₄ ; 0,04 M Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O
PCR-Puffer (10 x) (-20°C)	100 mM Tris/HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 25 mM MgCl ₂ * 6 H ₂ O
Prähybridisierungslösung (4°C)	2% Blockierungsreagenz (Boehringer) in Hybridisierungslösung
Puffer 1	100 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl
Puffer 2	2% Blockierungsreagenz (Boehringer) in Puffer 2
Puffer 3	100 mM Tris/HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl ₂

Restriktionspuffer (10 x) (-20°C)

Puffer blau	10 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM MgCl ₂ ; 0,1 mg/ml BSA
Puffer grün	10 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM MgCl ₂ ; 50 mM NaCl; 0,1 mg/ml BSA
Puffer orange	50 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM MgCl ₂ ; 100 mM NaCl; 0,1 mg/ml BSA
Puffer rot	10 mM Tris/HCl pH 8,5; 10 mM MgCl ₂ ; 100 mM KCl; 0,1 mg/ml BSA
SSC (20 x)	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0
TAE (10 x)	400 mM Tris/HAc pH 7,4; 50 mM NaAc; 10 mM EDTA
TE (10 x)	100 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 mM EDTA
Waschlösung	0,3 x SSC; 0,1% SDS

3.1.5. Medien und Lösungen für die Zellkultur

Die für die Zellkultur verwendeten Medien und Medienzusätze wurden von den Firmen Invitrogen (Eggenstein), Difco (Detroit/USA) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Die Grundmedien werden durch Zugabe von Medienzusätzen aus in der Regel 100 x Stammlösungen ergänzt. Das fötale Kälberserum (FCS) wird vor Gebrauch hitzeinaktiviert (45 min., 56°C), um Komplementfaktoren zu inaktivieren. L-Glutamin ist instabil und wird dem Medium erst kurz vor Gebrauch zugesetzt.

DMEM Grundmedium zur Kultivierung embryonaler Feederzellen (PEF):

FCS (inaktiviert)	10%
L-Glutamin	2 mM
Na-Pyruvat	1 mM
Pen/Strep	100 U/ml
2-Mercaptoethanol	0,1 mM
HEPES	10 mM

DMEM Grundmedium zur Kultivierung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen):

FCS (inaktiviert)	15%
L-Glutamin	2 mM
Na-Pyruvat	1 mM
2-Mercaptoethanol	0,1 mM
nicht essentielle Aminosäuren	1 x
LIF (CHO720LIF-Überstand)	10 mM

Selektionsmedium für ES-Zellen:

DMEM-Vollmedium	100 ml
G418 (Stocklösung 100 mg/l)	180-330 µl

DMEM Grundmedium zur Kultivierung von Ohrfibroblasten:

FCS (inaktiviert)	10%
L-Glutamin	2 mM
Na-Pyruvat	1 mM
Pen/Strep	100 U/ml
HEPES	10 mM

RPMI Grundmedium zur Kultivierung von Thymozyten:

FCS (inaktiviert)	10%
L-Glutamin	2 mM
Na-Pyruvat	1 mM
Pen/Strep	100 U/ml
2-Mercaptoethanol	0,1 mM
HEPES	10 mM

RPMI Grundmedium zur Kultivierung von Milzzellen für Proliferationsstudien (CTL-Medium):

FCS (inaktiviert, CTL-getestet)	10%
L-Glutamin	200 mM
Pen/Strep	10000 U/ml
2-Mercaptoethanol	14,5 M
HEPES	10 mM

Einfriermedium:

FCS (inaktiviert)	80%
DMSO	20%

3.1.6. Zelllinien

Tabelle 2: Verwendete Zelllinien

Zelllinien	Herkunft
E14.1	Männliche Blastocysten
PEF (Feeder)	Primäre embryonale Mausfibroblasten aus E12-14 Embryonen
Ohrfibroblasten	Primäre Mausfibroblasten
primäre T-Zellen	Thymus der Maus
primäre Milzzellen	Milz der Maus

3.1.7. Mauslinien

Tabelle 3: Verwendete Mauslinien

Mauslinie	Verwendung
C57Bl/6 N (H-2b) (Inzuchtlinie)	Für Verpaarungen der agouti Mäuse
C3H (H-2k) (Inzuchtlinie)	Für Proliferationsstudien
CBA (H-2k) (Inzuchtlinie)	Für Proliferationsstudien
Neo-Mäuse	Ubiquitäre Expression des neo-Gens; zur Gewinnung von primären embryonalen Fibroblasten für die ES-Zellkultur
NMRI-Mäuse (Auszucht)	Ammen für Blastocystentransfer
Flp-deleter (H-2b) (Transgene Linie)	Ubiquitäre Flp-Expression; zur Deletion des neo-Gens
Cre-deleter (H-2b) (Transgene Linie)	Ubiquitäre Cre-Expression; zur Herstellung der Knock-out Mäuse
Tie2 Cre (H-2b) (Transgene Linie)	Cre-Expression in Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen
Lck Cre (Transgene Linie)	Cre-Expression in T-Zellen
ERAB/Flp	Kontrolllinie für alle Experimente
ERAB/neo	Linie mit einer gestörten ERAB-Expression
ERAB/Tie2	Knock-out Linie für ERAB in Endothelzellen und hämatopoetischen Stammzellen
ERAB/lck	T-Zellspezifische Knock-out Linie für ERAB

Die Linie Cre deleter war als homozygote Linie verfügbar. Sowohl die Flp deleter Mäuse als auch die Tie2 Cre- und lck Cre transgenen Mäuse lagen als heterozygote Mauslinie vor.

3.1.8. PCR-Primer

3.1.8.1. Primer für die RT-PCR

HGPRT forward primer (24-mer):

5'-GTT GGA TCA AGG CCA GAC TTT CTT-3'

HGPRT reverse primer (23-mer) :

5'-GAG GGT AGG CTG GCC TAT AGG CT-3'

ERAB forward primer (21-mer) :

5'-ATG GCT GCG GCA GTT GGG AGC-3'

ERAB reverse primer (22-mer) :

5'-CTC GAT TAG GGT CTG TAC CAG A-3'

3.1.8.2. Primer für die Real Time PCR

Die Primer für die Real Time PCR wurden mit dem Programm Primer Express generiert.

HGPRT forward primer (25-mer) :

5'-ACA CCT GCT AAT TTT ACA GGC AAC A-3'

HGPRT reverse primer (24-mer) :

5'-TGG AAA AGC CAA ATA CAA AGC CTA-3'

ERAB forward primer (21-mer) :

5'-GGC ATC CGT GTG GTA ACA ATT-3'

ERAB reverse primer (23-mer) :

5'-GAA GTT TCG CAC TTT CTC TGG AA-3'

3.1.9. Antikörper

Monoklonale Antikörper, die in der Durchflusszytometrie verwendet wurden, wurden als Biotin- oder Fluorochrom-Konjugate (FITC, PE, PercP-Cy5.5, APC) von der Firma Becton Dickinson Biosciences (Heidelberg) bezogen.

3.2. Methoden

3.2.1. Molekularbiologische Arbeitstechniken

3.2.1.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Konzentrationsbestimmung über die Messung der optischen Dichte (OD)

Die Basen der DNA und RNA haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Das Spektrum einer 1:400 Verdünnung für Oligonukleotide und das Spektrum einer 1:35 Verdünnung einer RNA-Präparation werden im Bereich 300-320 nm gegen H₂O gemessen. Die Extinktion sollte zwischen 0,1 und 1 liegen, da in diesem Bereich Extinktion und Nukleinsäurekonzentration proportional zueinander sind.

Die Nukleinsäurekonzentration für Oligonukleotide errechnet sich aus der OD bei 260 nm, der Verdünnung, einem spezifischen Multiplikationsfaktor und der Oligolänge:

$$(OD \times \text{Verdünnung} \times 100) / \text{Oligolänge} = \text{Konzentration in pmol/}\mu\text{l}$$

Die Nukleinsäurekonzentration für Ribonukleinsäuren errechnet sich aus der OD bei 260 nm, der Verdünnung und einem für RNA spezifischen Multiplikationsfaktor:

$$OD \times \text{Verdünnung} \times 40 = \text{Konzentration in ng/}\mu\text{l}$$

3.2.1.2. DNA-Präzipitation mittels Alkoholfällung

Ethanolfällung:

Zur nukleinsäurehaltigen Lösung werden 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 5,6) und das 2 1/2 fache Volumen an 100%igem Ethanol gegeben. Nach dem Mischen wird auf Eis oder bei -20°C inkubiert und dann abzentrifugiert (10 min., 13000 rpm, 4°C). Das Pellet wird durch Waschen mit 70%igem Ethanol von Salz- und Alkoholresten gereinigt, erneut zentrifugiert (5 min., 13000 rpm, 4°C), bei 37°C im Heizblock getrocknet und in PBS aufgenommen (für die Elektroporation mit ES-Zellen, siehe 3.2.2.7.).

Isopropanolfällung:

Das Prinzip der Fällung entspricht dem der Ethanol-fällung, jedoch fällt Isopropanol Nukleinsäuren viel effektiver als Ethanol.

0,6 Volumen Isopropanol reichen für eine quantitative Fällung bei Raumtemperatur aus. Um das Isopropanol nach der Fällung zu entfernen, muss anschließend die DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen werden (siehe 3.2.1.5. und 3.2.1.6.).

3.2.1.3. Restriktionsverdau**Einzelverdau:**

Für die Linearisierung der DNA für die Elektroporation (siehe 3.2.2.7.) werden 50 µg Plasmid-DNA mit 1-5 U Restriktionsenzym in einem Volumen von 100 µl für 2,5 h bei 37°C inkubiert.

Je nach Pufferanspruch des verwendeten Enzyms werden die Verdau in unterschiedlichen Pufferlösungen (Blau, Rot, Grün, Gelb und spezielle Puffer) durchgeführt.

Doppelverdau:

Ein Doppelverdau kann dann durchgeführt werden, wenn die verwendeten Enzyme im gleichen Puffer eine ausreichend hohe Aktivität besitzen (mind. 50%). Ist kein geeigneter Puffer für beide Enzyme vorhanden, wird erst mit dem Enzym verdaut, das die geringere Salzkonzentration benötigt, dann wird der Ansatz mit Puffer aufgestockt, bis die optimale Konzentration für das andere Enzym erreicht ist.

3.2.1.4. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente von 0,1-25 kb Länge voneinander getrennt und identifiziert werden. Die Konzentration des Agarosegels variiert je nach Bedarf zwischen 1-2%; höherprozentige Gele ergeben eine schärfere Bande.

Die Agarose wird in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen auf einer Heizplatte gelöst und nach kurzem Abkühlen in eine Gelwanne gegossen, die ein Kamm zum Aussparen der Geltaschen enthält. Nach dem Erkalten des Gels wird der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt.

Da die DNA-Lösungen praktisch die gleiche Dichte besitzen wie der Elektrophoresepuffer, wird ihnen 1/10 Volumen Ladepuffer mit zwei Referenzfarbstoffen zugesetzt, der die Dichte der Proben erhöht und somit ein Absinken der Proben in die Geltaschen ermöglicht. Mit Hilfe der Referenzfarbstoffe kann der Elektrophoreseverlauf besser verfolgt werden.

Die Elektrophorese wird im Spannungsbereich von 60-90 Volt durchgeführt. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wird ein Längenmarker mit aufgetrennt. Zum Färben wird das Gel nach Beendigung der Elektrophorese für 15-30 min. in Elektrophoresepuffer, der 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthält, gelegt. Die Banden werden mit einem Lumi-Imager sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.2.1.5. DNA-Präparation aus ES-Zellen in Kultur

Von der 12-Loch Platte, die der DNA-Gewinnung der ES-Zellen dient (siehe 3.2.2.8.), wird das Medium abgesaugt und die Zellen 1 x mit D´PBS gewaschen. Dann werden pro Loch 700 µl Gewebepuffer zupipettiert. Dadurch werden die Zellen lysiert und es entsteht eine zähe Lösung. Nach Überführung in 1,5 ml Reaktionsgefäße wird jeder Probe 10 µl Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) zugesetzt und die Suspension bei 56°C über Nacht verdaut. Am nächsten Tag wird die Probe kurz abzentrifugiert (1 min., 13000 rpm, RT), da sich viel Kondenswasser am Deckel des Reaktionsgefäßes gebildet hat. Durch Zugabe von 450 µl Isopropanol und mehrmaligem Schütteln fällt die genomische DNA als dünner Faden aus. Dieser wird mit einer zugeschmolzenen Glaskapillare zur Schmelzpunktbestimmung aufgefischt, kurz in 70%igem Ethanol und dann in 100%igem Ethanol gewaschen und für ca. 5 min. an der Luft getrocknet. Dann wird das Kapillarende in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, das 80-120 µl TE enthält, gebrochen. Durch Schütteln auf einem Thermoschüttler (mind. 1 h, 65°C) löst sich die DNA.

Für die Southern Blot Analyse werden 20 µl DNA verdaut.

3.2.1.6. Isolierung von DNA aus der Schwanzspitze und Organen

Die zur Southern Blot Analyse benötigte DNA wird aus einem ca. 1 cm großen Stück Schwanzspitze von Mäusen gewonnen. Die DNA aus Organen für den Apoptosenachweis mittels DNA-Leiter wird aus ca. 30-50 mg Organgewebe gewonnen. Schwanzspitze oder Gewebe werden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit je 700 µl Gewebepuffer überführt, das Gewebe wird zusätzlich noch mit einer Schere zerkleinert. Dann wird wie unter 3.2.1.5. beschrieben mit einer Proteinase K-Lösung verdaut, die DNA mit Isopropanol gefällt und mit einem Schmelzpunktröhrchen gefischt. Die Gewebe-DNA wird, je nach Größe des DNA-Fadens, in 60-700 µl TE gelöst, die Schwanzspitzen-DNA in ca. 100 µl TE.

Für die Southern Blot Analyse der Schwanzspitzen-DNA werden 20 µl verdaut. Für den Apoptosetest mittels Gelelektrophorese der Organe werden je 20 µl Probe auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen.

3.2.1.7. Neutraler Kapillartransfer von DNA auf Membranen und Filter (Southern Blot)

Ziel des Southern Blot ist es, DNA-Fragmente, die zuvor mittels Gelelektrophorese entsprechend ihrer Länge getrennt wurden, auf einer Membran zu fixieren, um später durch Hybridisierung mit markierten Sonden einzelne DNA-Fragmente spezifisch nachweisen zu können.

Vor dem Blotten muss das Gel vorbehandelt werden, d. h. nach dem Verdau der genomischen DNA, der gelelektrophoretischen Auftrennung und Dokumentation wird das Agarosegel 30 min. in 0,25 M HCl gebadet. Durch den HCl-Schritt wird die DNA teilweise depuriniert und zerbricht dann in kleinere Fragmente, so dass auch eine Analyse größerer DNA-Fragmente möglich ist. Diese und die folgenden Inkubationen werden auf einem Schüttler durchgeführt; das Gel sollte dabei schwimmen, damit die HCl von beiden Seiten diffundieren kann. Das Gel wird kurz in Wasser gewaschen und unter Schütteln zur Denaturierung der DNA mit Denaturierungslösung behandelt. Anschließend wird das Gel 30 min. in einer Neutralisierungslösung wieder neutralisiert. Dann kann geblottet werden.

Unter Ausnutzung der Kapillarkräfte wird 20 x SSC-Puffer durch das Gel und die Membran in einen Stapel von Papiertüchern gesogen. Die DNA wandert mit und bleibt auf der Membran hängen. Für diesen Vorgang werden folgende Lagen, unter Vermeidung von Luftblasen, stapelförmig übereinander gelegt: zwei Bahnen

Whatman-Papier, die mit den Enden in das Reservoir mit 20 x SSC als Transferpuffer tauchen; das DNA-Gel; die mit Wasser vorbenetzte Membran; 1-2 Lagen Whatman-Papier; 15 cm saugfähige Einmal-Papierhandtücher. Damit der Transferpuffer nicht am Gel vorbeiläuft, werden alle Komponenten inklusive der Papierhandtücher auf die Gelgröße zurechtgeschnitten, und der ganze Blotaufbau zusätzlich noch mit Frischhaltefolie abgedeckt. Durch den Flüssigkeitssog aus dem Reservoir in den Papierhandtuchstapel wird die DNA zum Filter gezogen und haftet an ihm fest. Die DNA wird am nächsten Tag auf dem Trägermaterial fixiert. Dazu wird die Nylonmembran UV-kreuzvernetzt (Stratagen UV-Crosslinker, Autocrosslink).

3.2.1.8. Herstellung nicht-radioaktiver Digoxigenin DNA-Sonden

Die Herstellung erfolgt mit Hilfe des „Random Priming“. Bei dieser Methode wird die doppelsträngige Template-DNA denaturiert und mit Zufallshexameren („random primers“) hybridisiert, die dann als Primer für die DNA-Polymerase dienen. Die Markierung erfolgt über den Einbau nicht-radioaktiv markierter Nukleotide.

Zur Herstellung einer DIG-markierten Sonde für die Southern-Hybridisierung wird der DIG-labeling Mix (Boehringer Mannheim) verwendet.

150 ng aufgereinigtes Fragment in 14 µl TE werden 10 min. bei 100°C denaturiert, schnell abzentrifugiert (10 sec., 13000 rpm, RT) und auf Eis/Ethanol abgekühlt. Zu dem Fragment werden 2 µl Zufallshexamere und 2 µl dNTP-Markierungsgemisch pipettiert, gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 1 µl Klenow-Enzym (5 U) gestartet. Die Markierungsreaktion erfolgt für 3 Stunden bis üN bei 37°C. Nicht eingebaute Nukleotide werden durch eine anschließende Ethanolfällung entfernt und das Pellet in 400 µl TE aufgenommen.

3.2.1.9. DNA-DNA-Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden

Die Membran, auf der die DNA gebunden ist, muss vor der Hybridisierung erst einmal geblockt werden, um die verbleibenden freien Bindungsstellen abzusättigen. Diesen Vorgang bezeichnet man als Prähybridisierung. Dazu wird die Membran mit der DNA bei 65°C in einem Schüttelwasserbad für mindestens eine Stunde in 100 ml Prähybridisierungslösung vorhybridisiert. Die Prähybridisierungslösung wird 10-20 x wiederverwendet und bei 4°C gelagert.

Die Membran wird anschließend üN bei 65°C im Schüttelwasserbad in 100 ml Hybridisierungslösung inkubiert. Die Hybridisierungslösung enthält die Hälfte einer Sonde aus einer DIG-Markierungsreaktion und wird vor der Zugabe der Membran 10 min. im Wasserbad aufgeköcht, um die Sonde zu denaturieren. Dann wird sie kurz auf Eis abgekühlt und im Schüttelwasserbad auf 65°C temperiert. Die Hybridisierungslösung mit der Sonde kann ca. 10 x wiederverwendet werden und wird bei -20°C gelagert.

Am Morgen nach der Hybridisierung wird der Filter 3 x 10 min. in auf 65°C vorgewärmter Waschlösung gewaschen, um die unspezifisch hybridisierte Sonde zu entfernen.

3.2.1.10. Signaldetektion nach der DNA-DNA-Hybridisierung

Bei der verwendeten Signaldetektion handelt es sich um einen indirekten Nachweis. Die Markierung wird von einem spezifischen Antikörper gegen DIG erkannt, an das ein Enzym, hier die Alkalische Phosphatase, gekoppelt ist. Diese kann dann über eine enzymatische Reaktion nachgewiesen werden.

Farbliche Detektion mit NBT/BCIP:

Die Signale auf der hybridisierten Nylonmembran werden bei RT detektiert, indem der Filter nach den obigen Waschschritten zunächst 1 min. in Puffer 1 äquilibriert wird. Anschließend wird der Filter durch Schwenken in 30 ml Puffer 2 für 30 min. bei RT geblockt, um später eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern. Der Puffer 2 wird 10-20 x wiederverwendet und bei -20°C gelagert. Der Filter wird nach dem Blocken kurz in Puffer 1 gewaschen und für 30 min. in 10 ml Puffer 1 mit 150 mU/ml Alkalische Phosphatase gekoppeltem anti-DIG-Antikörper (α -DIG-AP, Boehringer) inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wird durch 2 x 10 min. waschen

mit Puffer 1 entfernt. Zur Farbentwicklung wird der Filter kurz in Puffer 3 umgepuffert und unter Lichtausschluss in die Färbelösung gelegt (10 ml filtrierter Puffer 3 mit 45 µl NBT-Lösung und 35 µl BCIP-Lösung). Die blauvioletten Signale entwickeln sich innerhalb von 1-15 Stunden. Als Referenz wird ein über Klenow-Fragment End-Markierung mit DIG-dUTP erhaltener DIG-markierter DNA-Marker mitentwickelt.

3.2.1.11. RNA-Isolierung

3.2.1.11.1. RNA-Isolierung aus Geweben der Maus

Die Organe werden sofort nach dem Töten der Maus entnommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Zur RNA-Isolierung werden ca. 30-50 mg Organ in 350-500 µl RLT Puffer/3,5-6 µl β-Mercaptoethanol für 20 sec. in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit LyseMatrix D in einem Fast Prep Instrument (Qbiogene) homogenisiert und dadurch lysiert. Anschließend wird der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, das die gleiche Menge an 70%igem Ethanol enthält. Nach kurzem Mischen mit der Pipette wird diese Lösung auf ein RNA-Schleudersäulchen gegeben und abzentrifugiert (30 sec., 13000 rpm, RT). Danach wird der Durchlauf verworfen und das Säulchen mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen (30 sec., 13000 rpm, RT).

Um die nun noch vorhandene genomische DNA zu verdauen, wird ein DNase-Verdau auf dem Säulchen durchgeführt. Dazu werden 10 µl eines Mixes aus DNase und RDD-Puffer in die Mitte des Säulchens pipettiert und das Säulchen für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Dann erfolgen zwei weitere Waschschriffe mit 350 µl RW1 Puffer (30 sec., 13000 rpm, RT) und ein Waschschriff mit 500 µl RPE Puffer (30 sec., 13000 rpm, RT). Nun wird das Säulchen in ein neues Auffanggefäß gestellt und nochmals mit 500 µl RPE Puffer gewaschen (2 min., 13000 rpm, RT). Bei diesem letzten Waschschriff sollen alle Reste von Puffer auf und an dem Säulchen entfernt werden. Zum Schluss wird das Säulchen in ein 1,5 ml RNase-freies Reaktionsgefäß gestellt und die RNA mit 30 µl DEPC-H₂O, nach einer 1minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, von der Säule eluiert (1 min., 13000 rpm, RT).

3.2.1.11.2. RNA-Isolierung aus Zellen

Die Zellen werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur RNA-Isolierung werden sie mit 350-500 µl RLT Puffer/3,5-5 µl β-Mercaptoethanol durch Vortexen lysiert. Dann wird dieses Lysat auf ein QiaShredder Säulchen aufgetragen und für 2 min. zentrifugiert (13000 rpm, RT). Die weitere Synthese entspricht der oben beschriebenen Vorgehensweise für Organe.

Die RNA-Menge wird photometrisch bestimmt und die Qualität durch eine Gelelektrophorese kontrolliert. Dazu werden 1 µg RNA eingesetzt. Nicht degradierte RNA erkennt man an den charakteristischen Banden im Gel (18S-rRNA der kleinen 40S und 28S ribosomalen Untereinheit und 5/5,8S-rRNA der großen 60S ribosomalen Untereinheit).

3.2.1.11.3. Pellet Paint

Ist die RNA-Menge nicht messbar oder das Ausgangsmaterial nur in ganz geringen Mengen vorhanden, kann man die RNA durch Pellet Paint, einem Fluoreszenzfarbstoff, sichtbar machen.

Nachdem die RNA in 30 µl DEPC-H₂O eluiert wurde, gibt man 2 µL Pellet Paint, unabhängig vom Ausgangsvolumen, und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat zur RNA-Lösung und mischt vorsichtig durch Schütteln. Dann werden 2 Volumen 100%igen Ethanol zugegeben, kurz gevortext und für 2 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zentrifugation (5 min., 13000 rpm, RT) wird der Überstand vorsichtig mit der Pipette abgenommen. Am Boden des Reaktionsgefäßes ist nun die RNA als farbiges Pellet sichtbar geworden. Nach dem Waschen mit 70%igem Ethanol (5 min., 13000 rpm, RT) wird zuletzt nochmals mit 100%igem Ethanol gewaschen (10 min., 13000 rpm, RT). Das Pellet kann nun an der Luft getrocknet und anschließend in 10 µl DEPC-H₂O aufgenommen werden.

Die RNA kann direkt für die nachfolgende cDNA-Synthese eingesetzt werden.

3.2.1.12. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die Abkürzung cDNA steht für „complementary DNA“, was so viel bedeutet wie die einzel- bzw. doppelsträngige DNA-Kopie eines RNA-Moleküls.

Die cDNA wird als Ausgangsmaterial für die nachfolgenden Polymerase-Kettenreaktionen eingesetzt.

3.2.1.12.1. First Strand cDNA Synthese mit SuperScript II RT

Die Reaktion besteht im wesentlichen aus zwei Schritten:

1. dem Erhitzen der RNA auf 70°C, zum Aufschmelzen der Sekundärstrukturen der RNA
Abkühlen auf RT zur Hybridisierung der Primer
2. der Reversen Transkription, d. h. dem Umschreiben der RNA in cDNA mittels dem Enzym reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase

Als Primer kann man Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer (500 µg/ml), die aus 12-18 Thymidinen bestehen, verwenden. Sie erlauben eine Synthese von kompletter cDNA, da sie an den Poly-A⁺-Schwanz der mRNA binden. Es gibt jedoch auch die Möglichkeit, zufällige Hexamerprimer („random hexamers“) einzusetzen, die, wie der Name sagt, irgendwo an die mRNA hybridisieren; das bedeutet, dass alle mRNA-Bereiche in der cDNA vertreten sind, aber auch nicht-mRNAs.

Das Enzym reverse Transkriptase stammt aus dem „Molony murine leukemia virus (MMLV-RT)“ und ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase mit einer erhöhten Thermostabilität. Des weiteren wird der Reaktion noch ein RNase-Inhibitor zugesetzt.

Ansatz und Programm der cDNA-Synthese:

- | | | |
|----|---|-----------|
| 1. | Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ (500 µg/ml) oder Hexamerprimer (50 mM) | 1 µl |
| | 0,5 µg RNA | x µl |
| | dNTP-Mix (10 pmol) | 1 µl |
| | DEPC-H ₂ O | auf 10 µl |
- 65°C, 5 min., dann auf Eis

2.	5 x First Strand Puffer	4 µl
	0,1 M DTT (Dithiothreitol)	2 µl
	RNasin (RNase Inhibitor)	1 µl
	SuperScript II RT (Reverse Transkriptase)	1 µl

→ 42°C, 50 min.; 70°C, 15 min.

→ auf Eis, Zugabe von 80 µl DEPC-H₂O

Die cDNA-Synthese wird in einem PCR-Block durchgeführt.

Die Synthese wird durch den Nachweis für das Haushaltsgen HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) kontrolliert.

3.2.1.13. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR kann eine spezifische Sequenz eines DNA-Doppelstranges amplifiziert (vermehrt) werden. Zu ihrer Durchführung werden zwei einzelsträngige Oligonukleotide (Primer) benötigt, die mit jeweils einem der Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts hybridisieren. Außerdem braucht man einen Mix aus den vier Desoxynukleosid-Triphosphaten und eine spezielle, hitzebeständige DNA-Polymerase. Die Primer werden durch chemische Synthese hergestellt.

Die PCR verläuft in drei Schritten, die in 20-40 Zyklen immer wieder durchlaufen werden. Zu Beginn wird der DNA-Doppelstrang („Template“) durch Erhöhen der Temperatur auf 95°C denaturiert. Nach Abkühlung auf eine Temperatur zwischen 40°C und 70°C kommt es zur sequenzspezifischen Hybridisierung der Primer an die einzelsträngige Template-DNA (Annealing). Danach wird die Temperatur auf das Temperaturoptimum der verwendeten Taq-Polymerase erhöht, wobei der Primer verlängert wird, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Template-DNA exakt gleicht (Elongation). Da die Komplementierung an beiden Strängen der Template-DNA abläuft, wird in einem Zyklus die Zahl der Template-DNAs verdoppelt, in nächsten Zyklus vervierfacht usw..

3.2.1.13.1. Quantitative Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die quantitative RT-PCR wird zur Quantifizierung von mRNA aus Zellen oder Geweben eingesetzt.

Als externen Standard verwendet man ein Haushaltsgen („housekeeping gene“), von dem man annehmen kann, dass es in konstanten Mengen in allen Zellen oder Geweben exprimiert wird. Nun bezieht man die Menge an spezifischem Produkt auf das Haushaltsgen, dessen Menge man für eine Konstante hält.

Als Haushaltsgen wurde HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) verwendet.

Die RT-PCR wurde standardmäßig in einem 50 µl Ansatz durchgeführt:

5 µl	PCR-Puffer
1 µl	dNTP- Mix (10 mM)
2 µl	forward primer (10 pmol)
2 µl	reverse primer (10 pmol)
1,5 µl	Taq Polymerase
5 µl	cDNA
33,5 µl	DEPC-H ₂ O

3.2.1.14. Quantitative Real Time PCR (Quantitative Echtzeit-PCR)

Die Real Time PCR ist ebenfalls eine Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Die Quantifizierung erfolgt hier über die Kinetik der PCR-Reaktion und nicht, wie bei der RT-PCR, über die absolute Menge an PCR-Produkt.

Das Prinzip entspricht einer normalen Polymerasekettenreaktion mit den typischen Schritten von Denaturierung, Annealing und Elongation.

In den ersten PCR-Runden gibt es eine weitgehend exponentielle Vermehrung der cDNA. Akkumuliert jedoch das Produkt, steigen auch die störenden Einflüsse, so dass sich der Prozess von einem linearen Wachstum bis zum Stillstand verlangsamt.

Die Sichtbarmachung der Reaktion erfolgt hier über den sogenannten SYBR®Green 1 (molecular probes); dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert, wie das Ethidiumbromid, in doppelsträngige DNA, was zur Erhöhung der Fluoreszenz führt. Je mehr DNA synthetisiert wird, desto größer ist der Anstieg der Signalstärke. Diese wird mit einem Kamerasystem detektiert und kann mit einem Computerprogramm ausgewertet werden. Der PCR-Prozess läuft in einem automatisierten Thermocycler ab.

Auch hier wird, wie bei der RT-PCR ein Primerpaar für ein Haushaltsgen und ein Primerpaar für das zu untersuchende Gen eingesetzt. Bei der Auswertung wird dann

anhand der Kurven die Zykluszahl bestimmt, bei der das Produkt noch exponentiell ansteigt. Um nun die relative Menge an mRNA in den einzelnen Proben zu bestimmen, normalisiert man die Menge der mRNA des zu untersuchenden Gens zur Menge der endogenen Referenz (Haushaltsgen).

Zusammensetzung des SYBR®Green Mix:

- 10 x Puffer
- 50 mM MgCl₂
- 10 mM dNTPs
- Hot Cold Star
- Uracil-DNA-Glycosylase
- SYBRGreen
- ddH₂O

3.2.2. Arbeiten mit Embryonalen Stammzellen

3.2.2.1. Kultivierung embryonaler Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sind pluripotente Stammzellen, die aus der inneren Zellmasse von Blastocysten isoliert werden. Um ihre pluripotenten Eigenschaften aufrecht zu erhalten, werden sie unter speziellen Bedingungen kultiviert. Dem DMEM-Medium, das einen hohen Glucosegehalt aufweist (4500 mg/l), wird LIF (Myeloid Leukemia inhibitory factor) zugesetzt, der zur Familie der Zytokine (Interleukin 6) gehört und die Differenzierung der ES-Zellen verhindern soll. Das DMEM-ES-Medium, das keine Antibiotika und nicht essentielle Aminosäuren enthält, muss täglich gewechselt werden. Das dem Medium zugesetzte FCS wird vor der Zugabe hitzeinaktiviert.

Die ES-Zellen wachsen auf einem Rasen von Nährzellen (primäre embryonale Fibroblasten bzw. Feeder), der ebenfalls zur Erhaltung ihrer ursprünglichen Eigenschaften dient. Nicht ausdifferenzierte ES-Zellen wachsen als ovale ES-Klone mit glatter Oberfläche und klarer Abgrenzung zum Feederrasen. ES-Zellen, die ausdifferenzieren, verlieren diese Abgrenzung und wachsen in den Feederrasen ein.

3.2.2.2. Präparation neo-resistenter primärer embryonaler Fibroblasten

ES-Zellkulturen benötigen zum Wachstum Monolayer von mitotisch inaktivierten Fibroblasten. Durch die primären embryonalen Fibroblasten (Feeder) haben die ES-Zellen keinen direkten Kontakt mit dem Plastik der Kulturschalen. Dadurch wird das Ausdifferenzieren der ES-Zellen verhindert.

Damit die Feeder nicht durch das für die Selektion auf positiv rekombinierte ES-Zellklone verwendete G418 abgetötet werden, isoliert man sie aus Mausembryonen, die ein transgenes neo-Gen tragen. Dazu werden schwangere neo-Mäuse (Tag 12-14 p.c.) getötet, unter sterilen Bedingungen das Abdomen geöffnet und der Uterus freipräpariert. Dann wird der Uterus in einer Petrischale, die etwas D´PBS enthält, gewaschen, um Reste von Blut zu entfernen. Anschließend werden die Embryonen ohne Reste von Uterus, Fruchtblase und Plazenta aus den Uterushörnern und der Amnionhöhle herauspräpariert und ebenfalls in eine Petrischale mit D´PBS gelegt. Dieser Waschvorgang wird nochmals wiederholt, um so wenig Blut wie möglich an den Embryonen haften zu haben.

Nun werden alle roten Teile der Embryonen (Herz und Leber) mit einer spitzen Pinzette entfernt. Bei Embryonen, die größer als 1-1,5 cm sind, muss noch der Kopf entfernt werden. Anschließend werden die Embryonen nochmals in einer frischen Schale mit D'PBS gewaschen, bis das ganze Blut entfernt ist.

Dann werden die Embryonen in eine trockene Petrischale überführt und mit Pinzette und Schere zerkleinert, bis keine Klumpen mehr vorhanden sind. Die Zellen werden vereinzelt, indem man 2 ml Trypsin (mit 5 mM EDTA) auf das Gewebe pipettiert. Die Embryonen werden für 5 min. bei 37°C im Brutschrank inkubiert und die Trypsinwirkung wird mit 5 ml DMEM-Medium abgestoppt. Nun wird die Petrischale etwas schräg gestellt, um die folgenden Resuspensionsschritte zu vereinfachen. Zuerst wird die erhaltene Zellsuspension mit einer 1,8 x 60 Kanüle (Butterfly) und einer 10 ml-Spritze 2-3 x gut resuspendiert. Dann erfolgen weitere Resuspensionsschritte mit einer 1,2 Strausskanüle, einer 0,9 x 40 Kanüle und zum Schluss mit einer 0,7 x 32 Kanüle. Am Ende dürfen keine Zellklumpen mehr vorhanden sein. Die Zellsuspension wird in einer 150 cm² Zellkulturflasche (6 Embryonen pro Flasche) in DMEM-Medium bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dies entspricht der Passage 0.

Nach 3-4 Tagen, wenn die Zellen konfluent sind, werden sie 1:3 gesplittet und erneut in 150 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Dies entspricht der Passage 1. Nach einem weiteren 1:3-Umsetzen (Passage 2) sollten die Zellen als gleichmäßiger, glatter Rasen wachsen und können dann direkt für die Kultur von ES-Zellen verwendet oder eingefroren werden. Die Zellen von drei 150 cm² Kulturflaschen werden in je vier Kryoröhrchen verteilt. Nach dem Auftauen der Zellen wachsen die Feeder anfangs noch schnell, stellen jedoch ihr Wachstum bis spätestens Passage 5 ein.

Bevor diese Zellen jedoch als Feederzellen verwendet werden können, müssen sie durch Gamma-Bestrahlung inaktiviert werden.

3.2.2.3. Auftauen primärer embryonaler Feederzellen (PEF)

Die Zellen sind mit Einfriermedium in Kryoröhrchen in Flüssigstickstoff eingefroren. Zum Auftauen werden die Röhrchen herausgenommen und zügig in der Hand aufgewärmt, bis nur noch ein kleiner Eiskern vorhanden ist. Die Zellen werden im Kryoröhrchen mit etwas Feedermedium mit einer 5 ml Pipette resuspendiert und in ein 15 ml Falconröhrchen überführt, das bereits 5 ml Feedermedium enthält. Dann erfolgt eine Zentrifugation (8 min., 12000 rpm, 4°C), um Reste von DMSO zu

entfernen. Das Zellpellet wird in 5 ml Feedermedium resuspendiert und pro Einfrierröhrchen in zwei 150 cm² Zellkulturflaschen pipettiert. Es ist darauf zu achten, dass der Boden der Kulturflasche vollständig mit Feedermedium bedeckt ist (ca. 30 ml Medium pro Flasche). Zwei bis drei Tage nach dem Auftauen wird das Medium gewechselt und die Zellen je nach Konfluenz gesplittet.

3.2.2.4. Trypsinieren von adhärenenten Fibroblasten

Das Medium wird von der Kulturschale abgesaugt, die Zellen mit D´PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA vom Plastik abgelöst. Die Trypsinwirkung wird mit serumhaltigem Medium abgestoppt, die Zellen werden kurz resuspendiert und zur Entfernung des Trypsins im Falconröhrchen abzentrifugiert (8 min., 12000 rpm, 4°C). Der Überstand wird abgesaugt, das Zellpellet in Medium resuspendiert und je nach gewünschter Zelldichte erneut ausgesät.

3.2.2.5. Mitotische Inaktivierung von Fibroblasten

Die primären Fibroblasten müssen, bevor sie als Nährzellen (Feeder) für die ES-Zellen eingesetzt werden, in ihrem Wachstum gestoppt werden, da sie sonst die ES-Zellen überwachsen und diese dadurch ihre pluripotenten Eigenschaften verlieren. Die Feeder werden daher durch Gamma-Bestrahlung mit 6000 rad inaktiviert.

Für die Bestrahlung der Feederzellen wird das Medium von der 150 cm² Kulturflasche abgesaugt, die Zellen mit D´PBS gewaschen und mit 5 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Die Trypsinwirkung wird mit Feedermedium abgestoppt und die Zellen werden abzentrifugiert (8 min., 12000 rpm, 4°C). Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet in 10 ml Feedermedium resuspendiert. Nach der Bestrahlung mit 6000 rad für 5,4 min. im Gamma-Strahlungsmessgerät werden die Zellen gezählt und auf mit Gelatine beschichteten Zellkulturplatten ausgesät.

Am nächsten Tag können ES-Zellen auf diesen Feederrasen ausgesät werden.

Tabelle 4: Zellzahlen für die Beschichtung mit Feederzellen

Platten-/Schalengröße	Zellzahl
48-Loch Platte	4×10^6
24-Loch Platte	4×10^6
6-Loch Platte	3×10^6
6-Loch Platte ES-DNA	1×10^6
10 cm Schale	5×10^6

Bestrahlte Feeder können nur für ca. eine Woche als Feeder für die ES-Zellen verwendet werden, da sich der Feederrasen ablösen kann. Des weiteren beginnen die ES-Zellen auf älteren Feedern kugelig zu wachsen und später auszudifferenzieren.

3.2.2.6. Auftauen und Einfrieren von ES-Zellen

Die ES-Zellen sind wie die Feederzellen mit Einfriermedium in Kryoröhrchen in Flüssigstickstoff eingefroren. Sie werden immer auf der Schalengröße aufgetaut, von der sie eingefroren wurden.

Zum Auftauen werden die Röhrchen herausgenommen und zügig in der Hand aufgewärmt, bis nur noch ein kleiner Eiskern vorhanden ist. Die Zellen werden im Kryoröhrchen mit etwas ES-Medium und einer gestopften Pasteurpipette resuspendiert und in ein 15 ml Falconröhrchen, das bereits 5 ml ES-Medium enthält, überführt. Nach einer Zentrifugation (8 min., 12000 rpm, 4°C) wird der Überstand abgesaugt und das Pellet in möglichst kleinem Volumen mit ES-Medium und einer gestopften Pasteurpipette resuspendiert. Die Zellsuspension wird in eine Schale, die mit bestrahlten Feedern beschichtet ist, ausgesät. Zuvor muss jedoch das Feedermedium auf dieser Schale durch ES-Medium ersetzt worden sein.

Da das Wachstum der Zellen recht schnell ist, ist ein Umsetzen bei einer 1:10-Verdünnung alle 2-3 Tage notwendig. Dazu wird von der Kulturschale das Medium abgesaugt, die Zellen mit D`PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Durch Zugabe von 4 ml ES-Medium wird die Trypsinwirkung abgestoppt. Die trypsinisierten Zellen werden mit einer gestopften Pasteurpipette resuspendiert und in ein 15 ml Falconröhrchen, das 5 ml ES-Medium enthält, überführt und abzentrifugiert (8 min., 12000 rpm, 4°C). Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in möglichst kleinem Volumen mit ES-Medium und einer gestopften Pasteurpipette resuspendiert.

Die resuspendierten ES-Zellen werden auf neue Schalen verteilt, die mit mitotisch inaktivierten Feederzellen beschichtet sind. Zuvor muss jedoch auf diesen Schalen das Feedermedium durch ES-Medium ersetzt worden sein.

3.2.2.7. Elektroporation von embryonalen Stammzellen

Für die Elektroporation wird eine dichtgewachsene 10 cm Schale mit ES-Zellen benötigt, auf der etwa $1-3 \times 10^7$ ES-Zellen wachsen. Am Morgen vor der Elektroporation wird das ES-Medium nochmals gewechselt.

Zu Beginn der Elektroporation wird das ES-Medium abgesaugt, die Zellen mit D´PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Die Trypsinwirkung wird mit ES-Medium abgestoppt, die Zellen werden gut mit einer gestopften Pasteurpipette resuspendiert und in ein 15 ml Falconröhrchen, das bereits 5 ml ES-Medium enthält, überführt und abzentrifugiert (8 min., 12000 rpm, 4°C). Das Zellpellet wird in möglichst kleinem Volumen in ES-Medium aufgenommen und mit einer gestopften Pasteurpipette gut resuspendiert, so dass keine Zellklumpen mehr vorhanden sind. Nach Zugabe von 10 ml ES-Medium wird diese Zellsuspension in eine 15 cm Gelatine-beschichtete Schale, die 10 ml vorgelegtes ES-Medium enthält, überführt. Nach einer Inkubationszeit (20 min., 37°C), die dem Absetzen der noch in der Zellsuspension vorhandenen Feederzellen dient, wird der Überstand, der nun die ES-Zellen enthält, von der Platte in ein Falconröhrchen überführt und abzentrifugiert (8 min., 12000 rpm, 4°C). Das Zellpellet wird in 1 ml PBS (ohne Magnesium und Calcium) mit einer gestopften Pasteurpipette resuspendiert und in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation (8 min., 12000 rpm, 4°C) werden die ES-Zellen in PBS aufgenommen; dabei wird eine Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml eingestellt.

In einer auf Eis vorgekühlten Elektroporationsküvette (Biorad, 4 mm Elektrodenabstand) werden nun 0,5 ml der ES-Zellsuspension und 50 µl zu transfizierende Plasmid-DNA (entspricht 20 µg) gemischt und für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Plasmid-DNA ist zuvor durch Ethanolfällung steril gemacht und in 50 µl PBS unter Schütteln gelöst worden. Die Elektroporation erfolgt bei 240 V und 960 µF; die Zellen werden nach dem Stromimpuls für 10 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Zell-DNA-Suspension, die jetzt aufgrund vieler lysierter Zellen eine schleimige Konsistenz hat, in wenig ES-Medium resuspendiert und auf vier Feeder-beschichtete Schalen mit je 10 ml ES-Medium verteilt. Am

nächsten Tag sind auf den Schalen bereits viele angewachsene kleine ES-Zellklone erkennbar. Das ES-Medium wird nun jeden Tag erneuert.

3.2.2.8. Isolierung stabil transfizierter ES-Zellklone

Zwei Tage nach der Elektroporation wird das ES-Medium durch Selektionsmedium mit G418 ersetzt, um auf stabil transfizierte ES-Zellklone zu selektionieren. Dazu wird die entsprechende Menge an G418 dem ES-Medium zugesetzt und dieses wird durch einen 0,22 µm-Filter steril filtriert.

Nach zwei bis drei Tagen Behandlung mit dem Selektionsmedium bekommen die Klone eine raue Oberfläche und fangen an abzusterben. Diese Klone haben die DNA nicht aufgenommen. Nach weiteren 3-4 Tagen sterben noch mehr Klone und die überlebenden stabil transfizierten Klone werden sichtbar. Es können Klone mit einer scharf abgegrenzten Membran gepickt werden. Diese stabilen Klone sind als schiffchenförmige Zellen sieben bis zehn Tage nach der Elektroporation auf den Feederzellen erkennbar. Zum Picken werden in eine 96-Loch Mikrotiterplatte mit U-Boden je 25 µl Trypsin/EDTA pro Loch vorgelegt, in die die gepickten Klone transferiert werden sollen. Zum Picken wird ein Mikroskop in die Sterilbank gestellt. Des weiteren wird das Feedermedium von 24-Loch Platten, die einen Tag zuvor mit Feederzellen beschichtet worden sind, durch ES-Selektionsmedium ersetzt.

Von einer 10 cm Schale mit ES-Zellklonen wird das ES-Medium durch D´PBS ersetzt. Die Klone werden einzeln mit einer 20 µl Eppendorfpipette aufgeschoben und vom Feederrasen abgesaugt. Die Klone werden in die Mikrotiterplatte überführt und nach 5-8 min. der Verdau durch Zugabe von je 50 µl FCS gestoppt. Die Klone müssen nach dieser Zeit ausreichend verdaut sein, um in einzelne Zellen zu zerfallen. Die Zellen dürfen aber durch das Trypsin nicht abgetötet worden sein. Diese nun 100 µl umfassende Zellsuspension wird durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren sehr gut resuspendiert und in ein Loch einer 24-Loch Platte transferiert. Die ES-Zellen sollten nie länger als 30 min. ohne ES-Medium sein, d. h. nach dem Picken wird das D´PBS sofort wieder durch ES-Medium ersetzt.

Klone, die in der 24-Loch Platte dicht gewachsen sind, werden frühestens 3-5 Tage nach dem Picken auf eine mit Gelatine beschichtete 12-Loch Platte und eine 24-Loch Platte mit bestrahlten Feederzellen aufgeteilt. Von der 24-Loch Platte sind nur 12 Löcher mit Feederzellen beschichtet, da die Wahrscheinlichkeit, dass 12 Klone gleich schnell wachsen größer ist als die für 24 Klone. Auf der 12-Loch Platte können die

ES-Zellen ausdifferenzieren, da sie nur für die Gewinnung von DNA verwendet werden. In der 24-Loch Platte werden die ES-Zellklone eingefroren. Zum Umsetzen wird das ES-Medium in den 24-Loch Platten abgesaugt, die Zellen mit D´PBS gewaschen und dann mit 200 µl Trypsin/EDTA pro Loch abgelöst. Die Trypsinwirkung wird mit 1 ml ES-Medium pro Loch abgestoppt und die Zellsuspension gut mit einer 1000 µl Eppendorfpipette resuspendiert. Von dieser Zellsuspension werden 1000 µl in die 12-Loch Platte mit Feedermedium pipettiert und 200 µl in die 24-Loch Platte, bei der das Feedermedium zuvor durch ES-Medium ersetzt worden ist.

Bei der 24-Loch Einfrierplatte wird täglich das ES-Medium gewechselt, bis die Klone dicht gewachsen sind. Dann wird das ES-Medium abgesaugt, die Zellen werden mit D´PBS gewaschen und mit 100 µl Trypsin/EDTA pro Loch abgelöst. Die Trypsinwirkung wird mit 100 µl FCS pro Loch abgestoppt. Anschließend wird pro Loch 200 µl Einfriermedium dazupipettiert und die Platte sofort bei -80°C weggefroren.

Auf der 12-Loch Platte, die der DNA-Gewinnung der ES-Zellen dient, wird das Feedermedium höchstens alle zwei bis drei Tage gewechselt, da es unerheblich ist, ob die Zellen auf diesen Platten ausdifferenzieren. Aus den Zellen wird genomische DNA für eine Southern Blot Analyse der ES-Zellklone isoliert (siehe 3.2.1.5.).

3.2.2.9. Auftauen und Expandieren positiver ES-Zellklone

Zum Auftauen positiver ES-Zellklone in der 24-Loch Platte wird der ES-Zellklon mit etwas ES-Medium direkt in der Platte aufgetaut. Die Zellen werden dann schnell in ein 15 ml Falconröhrchen, in dem bereits 5 ml ES-Medium vorgelegt sind, transferiert und abzentrifugiert (8 min., 12000 rpm, 4°C), um das DMSO zu entfernen. Anschließend wird der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml ES-Medium mit einer gestopften Pasteurpipette resuspendiert. Die Zellen werden dann in ein Loch einer mit Feederzellen beschichteten und ES-Medium enthaltenen 24-Loch Platte überführt.

Wenn die Zellen dicht gewachsen sind, können sie in eine 12-Loch Platte, die ebenfalls mit Feederzellen beschichtet ist und ES-Medium enthält, überführt werden.

3.2.2.10. Vorbereitung positiver ES-Zellen für die Blastocysteninjektion

Das ES-Medium eines dichtgewachsenen Lochs einer 12-Loch Platte wird abgesaugt und die Zellen werden 2 x mit D´PBS gewaschen, um tote Zellen und Zellschrott zu entfernen. Dann werden die Zellen abtrypsinisiert, die Trypsinwirkung wird mit ES-Medium abgestoppt, die Zellsuspension mit einer gestopften Pasteurpipette gut resuspendiert und in ein 15 ml Falconröhrchen mit 5 ml vorgelegtem ES-Medium überführt. Nach der Zentrifugation (8 min., 12000 rpm, 4°C) wird der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit einer gestopften Pasteurpipette in 1-1,5 ml ES-Medium gut resuspendiert, damit keine Zellklumpen mehr vorhanden sind. Zum Entfernen der Feederzellen, die später bei der Mikroinjektion der ES-Zellen in Blastozysten stören würden, wird die Zellsuspension in ein Loch einer mit Gelatine beschichteten 12-Loch Platte transferiert. Die Platte wird für 15-20 min. im Brutschrank bei 37°C inkubiert, um ein Absetzen der Feederzellen zu ermöglichen. Anschließend wird unter dem Mikroskop kontrolliert, ob die ES-Zellen als einzelne Zellen vorliegen. Der Überstand, der nun die ES-Zellen enthält, wird vorsichtig mit einer gestopften Pasteurpipette abgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen werden bis zur Injektion auf Eis gelagert.

3.2.3. Methoden zur Herstellung von Knock-out Mäusen

3.2.3.1. Gewinnung von Blastocysten aus trächtigen C57Bl/6 N-Mäusen

Vier Tage vor der Injektion positiver ES-Zellklone in Blastocysten werden Spontanverpaarungen von C57Bl/6 N-Mäusen angesetzt. Am nächsten Morgen wird die Begattung der Weibchen anhand der sogenannten Vaginalpfropfe (VP) makroskopisch überprüft. Vaginalpfropfe sind koagulierte Proteine der männlichen Samenflüssigkeit, die nach der Kopulation ca. 12 Stunden lang vorhanden sind und dann aus der Vagina herausfallen. Die VP-positiven Tiere werden bis zur Blastocystenpräparation in separaten Käfigen gehalten.

Die VP-positiven Weibchen werden am Tag 3,5 p.c. getötet und der Bauchraum wird geöffnet. Zur Gewinnung der Blastocysten wird der gesamte Uterus mit einer stumpfen Pinzette am Cervix gefasst, um die sich in den Uterushörnern befindlichen Blastocysten nicht zu verletzen. Anschließend wird mit einer spitzen Pinzette das Fettgewebe abgestreift. Dann wird der Uterus durch Schnitte zwischen Eileitern und Uterus sowie dem Cervix aus dem Bauchraum herauspräpariert und in eine Schale mit M2-Medium überführt. Mittels einer 1 ml Spritze und einer stumpf geschliffenen aufgesetzten 27g Kanüle werden nun die Blastocysten mit M2-Medium aus den Uterushörnern herausgespült. Dazu hält man mit einer Pinzette das Uterushorn fest, schneidet mit einem Skalpell die Enden der Uterushörner ein und spült mit der Spritze die Blastocysten aus den Hörnern heraus. Die Blastocysten können mit einer Glaskapillare, an die ein Schlauch mit Mundstück gekoppelt ist, aufgesaugt, in M16-Medium gewaschen und bis zur Injektion in M2-Medium im Inkubator (37°C, 5% CO₂) kultiviert werden.

3.2.3.2. Injektion von ES-Zellen in Blastocysten

Um die ES-Zellen in Blastocysten zu injizieren, werden beide in M2-Medium auf einen Objektträger mit erhöhtem Rahmen, der als Injektionskammer dient, transferiert. Die Apparatur besteht aus einer Injektionskapillare, in der die ES-Zellen aufgesammelt werden und einer Haltekapillare, die die Blastocysten für die Injektion fixiert. Zur Injektion der Blastocysten verwendet man einen Objektträger mit erhöhtem Rand. Auf diesen gibt man M2-Medium, welches mit Öl überschichtet wird, um eine Austrocknung zu vermeiden. In dieses Medium werden dann die Blastocysten transferiert. Sowohl die Injektions- als auch die Haltekapillare arbeiten

mit Öldruck. Für die Injektion werden nun 20-25 einzeln vorliegende ES-Zellen in die Injektionskapillare gesaugt, so dass diese wie eine Perlenkette aufgereiht vorliegen. Die Blastocyste wird mit der Haltekapillare fixiert. Dann sticht man mit der Injektionskapillare in das Blastocoel des Blastocysten und die ES-Zellen werden durch leichten Druck injiziert. Anschließend zieht man die Injektionskapillare wieder heraus. Die injizierten Blastocysten werden bis zum Transfer in M16-Medium inkubiert (37°C, 5% CO₂).

3.2.3.3. Blastocystentransfer in scheinchwangere NMRI-Ammenmäuse

Die injizierten Blastocysten müssen nun in den Reproduktionstrakt einer scheinträchtigen Amme implantiert werden, die die Jungen austrägt und aufzieht. Dazu werden drei Tage vor der Blastocystenpräparation NMRI-Weibchen mit vasktomierten NMRI-Männchen, d. h. Männchen, deren Samenleiter durchtrennt sind, verpaart. Am nächsten Tag werden die Weibchen auf einen positiven Vaginalpfropf untersucht und die positiven Weibchen, in deren reproduktiven Trakt sich jedoch keine befruchteten Eizellen befinden, werden bis zum Transfer in separaten Käfigen gehalten. Für den Embryotransfer hat man nun scheinträchtige Mäuse am Tag 2,5 p.c.. Der zeitliche Unterschied nimmt auf die langsamere Entwicklung der Blastocysten *in vitro* Rücksicht.

Zu Beginn werden die Ammenmäuse durch i.p.-Injektion eines Narkosemittels in Abhängigkeit vom Körpergewicht narkotisiert. Die Maus wird auf den Bauch gelegt und die Haut wird mit einem kleinen dorsalen Schnitt an der Seite geöffnet. Dann öffnet man die Bauchdecke und zieht mit einer stumpfen Pinzette am Fettgewebe Ovar, Eileiter und Uterus heraus. Diese werden vorsichtig mit einer Gefäßklemme, die am Fettpolster des Ovars befestigt wird, fixiert. Unter einem Stereomikroskop werden die Embryonen, die sich in M2-Medium befinden, in den Uterus injiziert. Pro Empfängermaus werden maximal 18 Blastocysten transferiert, die man auf die beiden Uterushörner verteilen kann. Nun wird die Gefäßklemme entfernt, die Organe wieder in die Bauchhöhle gelegt, die Unterhaut vernäht und die Oberhaut geklammert. Die Mäuse werden bis zum Aufwachen aus der Narkose in Kleenex-Tücher gewickelt, um sie vor Unterkühlung zu schützen.

3.2.4. Methoden zur Arbeit mit Mäusen

3.2.4.1. Isolierung von Organen für die RNA-Synthese und die Histologie

Zur Organentnahme für RNA- oder Histologieanalysen werden die Mäuse durch CO₂-Begasung getötet. Durch zervikale Dislokation könnte es zu einem Zerreißen der Blutgefäße im Halsbereich kommen oder das Gehirn könnte verletzt werden.

Für Histologieanalysen ist es besonders wichtig, dass die einzelnen Organe nicht bei der Entnahme mit der Pinzette gequetscht werden, was sonst zu falschen Ergebnissen führen könnte. Die Organe werden für Paraffinschnittanalysen sofort in Formalin eingelegt. Für RNA-Analysen werden die entnommenen Organe sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.2.4.2. Organentnahme für die Analyse der Oberflächenmarker von T-Zellen

Für die Entnahme von Milz, Thymus und Lymphknoten für FACS-Analysen werden die Mäuse durch Begasung mit CO₂ getötet. Anschließend wird der Bauchraum geöffnet und die einzelnen Organe können entnommen werden. Die Organe werden mit Hilfe eines Stempels einer 5 ml-Spritze und etwas D´PBS durch ein Metallsieb gedrückt und die Zellsuspension wird in einer 10 cm-Zellkulturschale aufgefangen. Nach dem Waschen des Stempels und des Metallsiebes mit D´PBS wird die Zellsuspension in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und abzentrifugiert (8 min., 12000 rpm, 4°C). Das Zellpellet kann nun in FACS-Puffer resuspendiert und für die Färbungen eingesetzt werden.

3.2.4.3. Zellseparation mittels magnetbeadgekoppelter Antikörper

Die Trennung nach zellspezifischen Oberflächenmolekülen mittels immunomagnetischer Separation ermöglicht die Untersuchung einer einzelnen, möglichst reinen Zellpopulation. Dazu werden die Phänotypisierungsmarker („CD = cluster of differentiation“) mit superparamagnetischen Partikeln gekoppelt.

Zur Untersuchung der einzelnen Zellpopulationen werden der Maus Milz, Lymphknoten und Thymus entnommen und wie unter 3.2.4.2. beschrieben aufgearbeitet und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen werden pro 1×10^7 Gesamtzellen in 90 μl MACS-Puffer resuspendiert und mit 10 μl Micro Beads pro 1×10^7 Gesamtzellen für 15 min. bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit 1-2 ml MACS Puffer pro 1×10^7 Gesamtzellen gewaschen und für 10 min. bei 5000 rpm abzentrifugiert. Dann werden die Zellen in 500 μl MACS Puffer resuspendiert und auf ein magnetisches LS-Säulchen aufgetragen. Dieses LS-Säulchen wurde zuvor in ein magnetisches Feld gebracht und mit MACS Puffer äquilibriert.

Bei der Positiv-Selektion befindet sich die zu untersuchende Zellpopulation nach dem dreimaligen Waschen der LS-Säule mit MACS Puffer immer noch im magnetischen Feld. Erst wenn die LS-Säule aus dem Magnetfeld genommen wird, können die Zellen mit Hilfe eines Stempels und Puffer aus der LS-Säule eluiert werden. Die so erhaltene Zellpopulation besteht nun nur noch aus der gewünschten Subpopulation.

3.2.4.4. Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence-activated-cell-sorter) besteht darin, dass Zellen anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften oder aufgrund ihrer intrazellulären Zusammensetzung unterschieden werden können. Dazu markiert man die Zellen mit Antikörpern, die gegen bestimmte zelluläre Strukturen gerichtet sind. Diese Antikörper wiederum sind mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt (direkte Markierung), die vom Laserstrahl erfasst werden können. Es kommt zur Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe mit anschließender Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge.

Als Farbstoffe werden FITC (519 nm), PE (578 nm), PerCP (678 nm) und APC (660 nm) verwendet. Bei biotinylierten Antikörpern ist eine Zweitinkubation mit einem fluoreszenzgekoppelten Antikörper notwendig (indirekte Markierung).

3.2.4.4.1. Färbung der Zellen für die FACS-Analyse

Nach der Aufarbeitung der Organe (wie unter 3.2.4.2.) werden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und für 20 min. mit 50 µl der entsprechenden Antikörperverdünnungen bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen mit FACS-Puffer erfolgt entweder eine zweite Inkubation mit dem Sekundärantikörper für weitere 20 min. bei 4°C oder die Zellen können gleich in 50 µl FACS-Puffer für die Messung aufgenommen werden.

3.2.4.5. *In vitro* Proliferationstest

Bei einem Proliferationstest wird die Teilungsfähigkeit von Zellen untersucht, z. B. auch nach einer vorangegangenen Stimulation. Benutzt man zum Nachweis der Proliferation markierte DNA-Bausteine, werden diese in die neu synthetisierte DNA eingebaut, da sich genomische DNA vor der Zellteilung repliziert. Bei der Zellteilung erhalten dann Mutter- und Tochterzellen aufgrund der semikonservativen Replikation einen markierten DNA-Strang.

Für *in vitro* Proliferationsversuche wird die Milz entnommen, eine Einzelzellsuspension in D´PBS hergestellt, die Zellen werden abzentrifugiert (8 min., 1200 rpm, 4°C) und in 10 ml CTL-Medium resuspendiert und gezählt. Zur Stimulation können entweder durch Gamma-Bestrahlung (3000 rad, 3 min.) inaktivierte Milzzellen (1×10^6 Zellen/2 ml) oder eine mit anti-CD3-gecoatete (5 µg/ml) 96 Loch Rundbodenplatte verwendet werden. Das Coaten der Platte wird einen Tag vor der Proliferation bei 37°C im Inkubator durchgeführt.

Die zu untersuchenden Zellen werden auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/2 ml eingestellt und davon werden je 200 µl in ein Loch der oben vorbereiteten 96 Loch Platte pipettiert. Die Zellen werden bei 37°C im Inkubator inkubiert. Dies entspricht Tag 0 der Proliferation. Am Tag 3 werden die ausgesäten Zellen mit je 50 µl ^3H -Thymidin (25 ml CTL-Medium + 500 µl ^3H) über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Tag 4 werden die Zellen in einem Tom Tec Harvester geerntet. Dazu werden die Zellen von der 96 Loch Platte auf einen Filter transferiert, der anschließend mit Scintillationsflüssigkeit versetzt wird. Nun können die Counts, d. h. die Proliferationshöhen, in einem Messgerät ermittelt werden.

3.2.4.6. Apoptoseinduktion in Thymozyten mit Dexamethason und FasL

Zur Untersuchung des Apoptoseverhaltens in Thymozyten wird die Maus durch Begasung mit CO₂ getötet und anschließend der Thymus steril entnommen. Nach Herstellung einer Einzelzellsuspension und der Zellzahlbestimmung (siehe 3.2.4.2.) werden die Thymozyten mit einer Zellzahl von 2 oder 4 x 10⁶ Zellen/ml (2 x 10⁶ für FasL, 4 x 10⁶ für Dexamethason) in einer 12 Loch Platte ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen an Dexamethason oder FasL behandelt. Die Apoptoserate in den Thymozyten kann mittels FACS-Färbung und -Messung ermittelt werden. Dazu werden die Zellen geerntet, abzentrifugiert (5 min., 5000 rpm, RT) und in Annexin V-Puffer resuspendiert. Die FACS-Färbung wird, wie unter 3.2.4.4.1. beschrieben, durchgeführt. Als Marker für die Apoptose verwendet man den Antikörper Annexin V, der sich an Phosphatidylserin, ein bei apoptotischen Zellen an der Membranaußenseite befindliches Protein bindet, und den Farbstoff Propidiumjodid. Dieses dringt nur in tote Zellen ein, so dass sich apoptotische und nekrotische Zellen mit dieser Färbung gut unterscheiden lassen.

3.2.4.7. Fibroblastenpräparation aus Mäuseohren

Zur Gewinnung von Ohrfibroblasten wird die Maus durch Begasung mit CO₂ getötet. Dann werden die Ohren mit 70%igem Ethanol desinfiziert und die Ohrspitzen mit einer sterilen Schere abgeschnitten. Die Ohren werden nochmals in Zellkulturschalen mit Ethanol und D´PBS gewaschen, um Reste des Ethanols zu entfernen. Nun überführt man jede Ohrspitze in eine neue 5 cm Zellkulturschale mit je 5 ml RPMI-Medium, um Reste von D´PBS zu entfernen. Dann werden die Ohrspitzen in je eine neue 5 cm Zellkulturschale mit 2 ml RPMI-Medium/Collagenase A (150 U/ml) gelegt und mit einer kleinen sterilen Schere so klein wie möglich geschnitten. Diese Schalen werden bei 37°C im Inkubator für 2-4 Stunden inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit werden die Stücke in 15 ml Falconröhrchen, in denen 5 ml RPMI-Medium vorgelegt wurde, überführt und abzentrifugiert (8 min., 1200 rpm, 4°C), um die Collagenase zu entfernen. Die Pellets werden mit einer gestopften Pasteurpipette in DMEM-Medium resuspendiert und in neue 5 cm Zellkulturschalen, die 5 ml DMEM-Medium enthalten, überführt.

Nach ca. 1 Woche sind die Fibroblasten erkennbar. Je nach Zelldichte werden sie dann in Zellkulturflaschen überführt. Der Mediumwechsel erfolgt alle 3-4 Tage.

4. Ergebnisse

Um die Funktion von ERAB („endoplasmic reticulum-associated amyloid β -peptide binding protein“) im Immunsystem untersuchen zu können, sollten in der vorliegenden Arbeit Knock-out Mäuse hergestellt werden, die es erlauben, dieses Gen sowohl im gesamten Organismus als auch in bestimmten Zelltypen zu untersuchen.

4.1. Klonierung, ES-Zellkultur und Blastocysteninjektion zur Herstellung von Knock-out Mäusen

4.1.1. Klonierung des Konstruktes zur Generierung der ERAB Knock-out Mäuse

Für die Klonierung des Konstruktes zur Herstellung der Knock-out Mäuse für ERAB wurde aus einer Phagenbibliothek die genomische Sequenz für das Gen isoliert. Dieser Genbereich von ~1000 bp, der die kodierenden Sequenzen enthält, wurde durch enzymatische Verdaus mit den Restriktionsenzymen Xho I und Not I ausgeschnitten.

Zur Inaktivierung der Genfunktion sollte das Exon 1 mit Hilfe des Cre/loxP-Systems deletiert werden. Dazu wurden zwei loxP-Sequenzen in 3' → 5' Orientierung eingeführt. Die erste loxP-Sequenz wurde stromaufwärts von Exon 1 in eine Hind III-Schnittstelle eingeführt, die zweite loxP-Sequenz wurde stromabwärts von Exon 1 mit dem Restriktionsenzym Eco R V eingebracht. Für die Selektion positiver Klone in der ES-Zellkultur wurde zusätzlich das Neomycin-Resistenz-Gen (neo-Gen) als Selektionsmarker in das Konstrukt kloniert. Dieses wurde mittels eines Hind III-Verdaus in ein Intron vor das Exon 1 kloniert. Zur Deletion des neo-Gens wurden stromaufwärts und stromabwärts dazu zwei FRT-Stellen in 3' → 5' Orientierung eingeführt, die später durch die Flp-Rekombinase erkannt werden können und so zur Deletion des neo-Gens führen (siehe Abb. 4).

Da ERAB ein X-chromosomales Gen ist, wird das Konstrukt in den nachfolgenden Abbildungen immer mit X^{mut} bezeichnet (mut für Mutation).

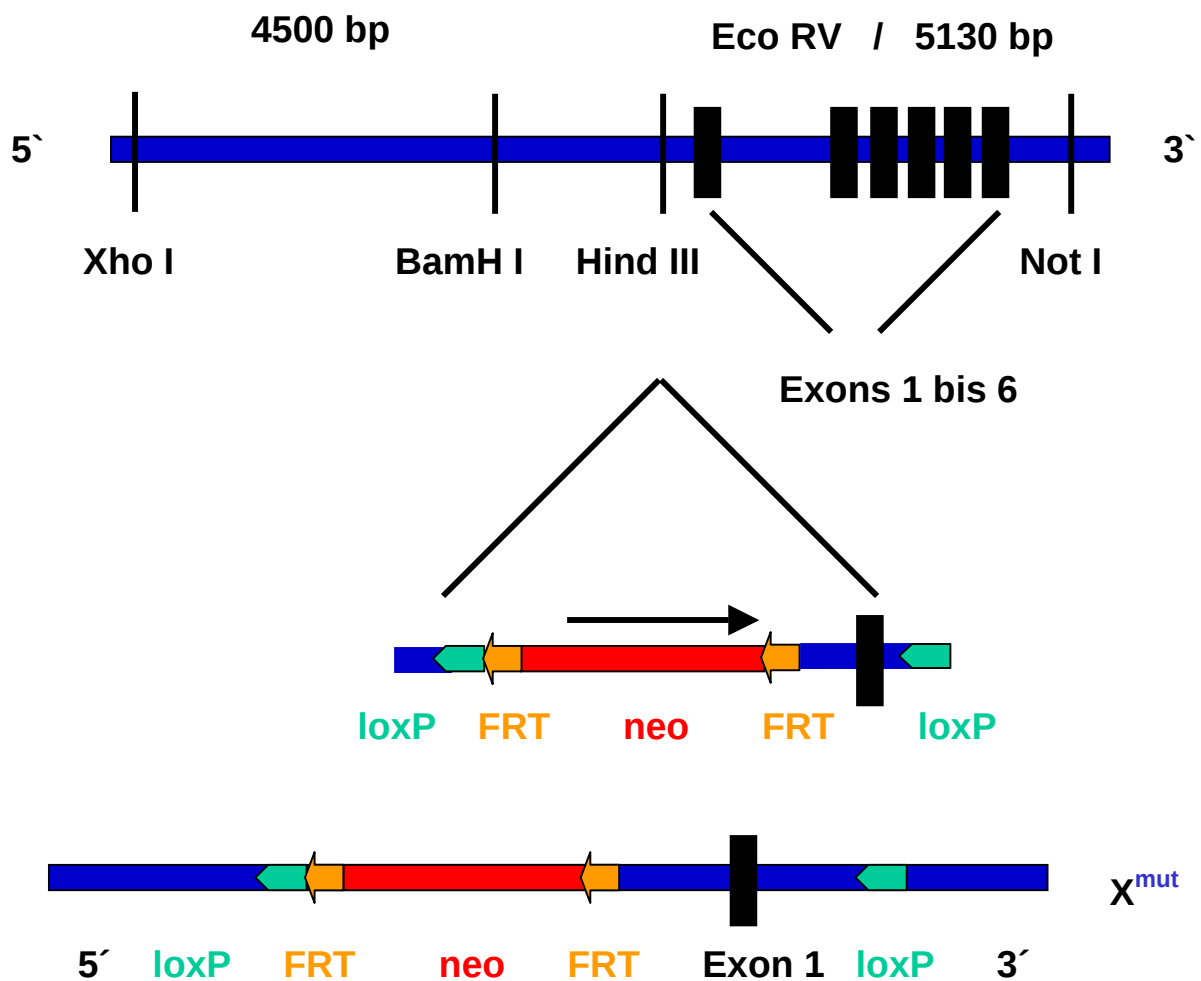


Abb. 4: Konstruktaufbau zur Generierung der ERAB Knock-out Mäuse

Zur Herstellung der Knock-out Mäuse für ERAB wurde ein Konstrukt hergestellt, dass zur Deletion des Exon 1 im Gen führt. Dazu wurden zwei loxP-Stellen stromaufwärts und stromabwärts von Exon 1 kloniert.

Als Selektionsmarker für die nachfolgende ES-Zellkultur wurde das Neomycin-Resistenz-Gen verwendet. Dieses wird von zwei FRT-Stellen flankiert, so dass es, ohne das Exon 1 zu deletieren, durch die Fip-Rekombinase entfernt werden kann.

Das Konstrukt wurde bereits vor Beginn dieser Arbeit freundlicherweise von G. Küblbeck kloniert.

4.1.2. Herstellung stabil transfizierter ES-Zellklone für das ERAB-Konstrukt

Zur Herstellung der Knock-out Mäuse für ERAB wurde das Konstrukt (X^{mut} , siehe Abb. 4) durch homologe Rekombination in ES-Zellen eingebracht. Dazu wurde die ES-Zelllinie E14.1 aus dem Stamm 129P2/Ola Hsd verwendet. Embryonale Stammzellen sind pluripotente Zellen und somit in der Lage, sich zu allen Zellen und Geweben eines Organismus entwickeln zu können. Durch die homologe Rekombination findet ein Austausch des endogenen mit dem exogenen Gen statt. Da die homologe Rekombination jedoch ein sehr seltenes Ereignis ist ($< 1:500$), muss ein Selektionsmarker eingesetzt werden, um die stabil transfizierten ES-Zellklone anzureichern. Dazu diente das Neomycin-Resistenz-Gen (neo-Gen). Das Konstrukt wurde durch Elektroporation in embryonale Stammzellen eingebracht. Durch das neo-Gen konnte mit Ganciclovir (G418) auf positiv rekombinierte ES-Zellklone selektioniert werden.

Im Gegensatz zu anderen Genkonstrukten, die zur Generierung von Knock-out Mäusen in unserem Labor eingesetzt wurden, waren hier mehrere Elektroporationsversuche notwendig, um stabile ES-Zellklone zu erhalten. In einem Versuch mit einer Ganciclovir-Konzentration von 160 μg konnte von 237 angereicherten ES-Zellklonen DNA isoliert und im Southern Blot auf homolog rekombinierte Klone untersucht werden. Dazu wurde die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym Nco I verdaut und der Southern Blot mit der 3'-externen Probe hybridisiert. Es konnten zwei komplett homolog rekombinierte Klone gefunden werden, die Klone ERAB 183 und ERAB 303 (siehe Abb. 5).

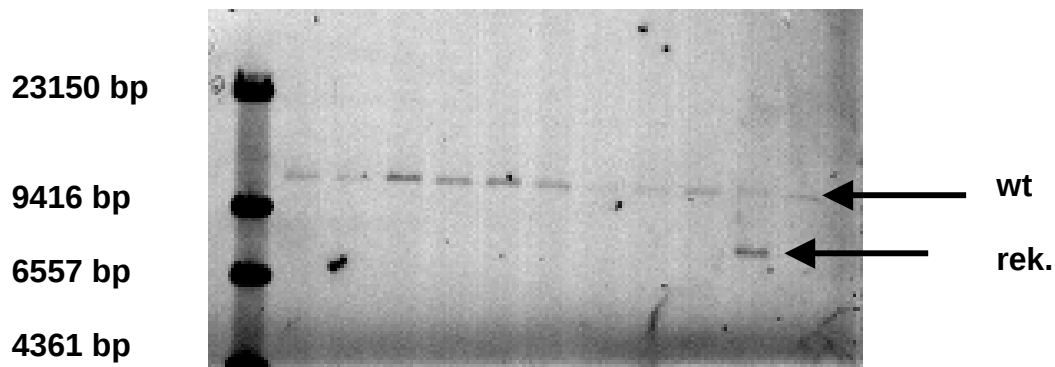


Abb. 5: Southern Blot Analyse von angereicherten ES-Zellklonen
Nachweis des positiv rekombinierten ES-Zellklons ERAB 183

Von den angereicherten ES-Zellklonen wurde genomische DNA isoliert und mit dem Restriktionsenzym Nco I verdaut. Durch die Hybridisierung mit der 3'-externen Probe konnte auf positiv rekombinierte Klone getestet werden. Es wurden zwei homolog rekombinierte Klone nachgewiesen, die Klone ERAB 183 und ERAB 303.

Hier wurde als Beispiel der Klon 183 abgebildet. Die Wildtypbande (wt) ist bei 11500 bp, die rekombinierte Bande (rek.) bei 7800 bp erkennbar.

4.1.3. Injektion der positiven ES-Zellklone ERAB 183 und ERAB 303 in Blastocysten von C57Bl/6 N Mäusen

Nach dem erbrachten Nachweis auf homologe Rekombination des Konstruktes in den Klonen ERAB 183 und ERAB 303 durch die Southern Blot Analyse konnten diese beiden ES-Zellklone in Blastocysten von C57Bl/6 N Mäusen injiziert werden. Die Blastocysten wurden anschließend in den Uterus scheinschwangerer NMRI-Ammenmäuse transferiert. Durch die unterschiedlichen Fellfarben der beiden Mauslinien, 129 P2/Ola Hsd und C57Bl/6 N, können die positiven Nachkommen an ihrer sogenannten agouti Farbe erkannt und als Chimären bezeichnet werden. Integrieren sich die ES-Zellen auch in der Keimbahn, so können nach der Verpaarung einer chimären Maus mit einer C57Bl/6 N Maus positive Nachkommen erhalten werden. Die ES-Zelllinie E14.1 ist eine männliche Zelllinie und kann nur zur Ausbildung der männlichen Keimzellen beitragen. Daher werden männliche chimäre Mäuse verpaart.

Um chimäre Mäuse für das Gen ERAB zu erhalten, wurden mehrere Injektionen durchgeführt. Diese sind in der nachfolgenden Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Injektionen der Klone ERAB 183 und ERAB 303 in Blastocysten von C57Bl/6 N Tieren

ES-Zellklon	Anzahl injizierter Blastocysten	Wurfgröße	C57Bl/6 N / agouti	
ERAB 303	15	/	/	/
ERAB 303	7	2	2	/
ERAB 183	5	/	/	/
ERAB 183	6	2 (2)	/	/
ERAB 303	24	11	5	6 (m)*
ERAB 303	14	/	/	/
ERAB 183	6	/	/	/
ERAB 183	10	/	/	/
ERAB 303	11	4 (2)	/	2 (m)
ERAB 303	16	8	2	6 (2m,4w)
ERAB 303	7	3	/	3 (m)
ERAB 303	7	3	/	3 (m)
ERAB 303	21	/	/	/
ERAB 303	15	4 (4)	/	/
ERAB 303	6	7 (7)	/	/
ERAB 303	4	/	/	/

In Klammern sind bei der Wurfgröße die Anzahl der Tiere angegeben, die gleich nach der Geburt starben. Bei den agouti-Tieren ist in Klammern das Geschlecht der Tiere angegeben (m=männlich, w=weiblich).

Wie aus der Tabelle 5 zu sehen ist, wurden nach der Injektion des Klons ERAB 183 nur zwei Tiere geboren, die direkt nach der Geburt starben. Die Zellen dieses Klons begannen auch schon nach 2-3 Tagen in Kultur auszudifferenzieren. Dies war an ihrer veränderten Form zu erkennen. Daher wurden mit diesem Klon keine weiteren Injektionen durchgeführt.

Mit dem Klon ERAB 303 wurden mehrere Würfe mit chimären Tieren erhalten. Die ersten sechs agouti Männchen (*), die nach der Injektion des Klons ERAB 303 erhalten wurden (siehe Tabelle 5), zeichneten sich durch einen geringen Grad an Chimärismus aus. Alle sechs agouti Männchen wurden im Southern Blot getestet und mit C57Bl/6 N Weibchen verpaart. Die Anzahl der geborenen Tiere ist in nachfolgender Tabelle 6 zusammengefasst. Interessant waren jedoch nur die weiblichen Nachkommen, da ERAB auf dem X-Chromosom lokalisiert ist. Somit können nur die weiblichen Nachkommen die Mutation tragen ($X^{mut}X$).

Tabelle 6: Verpaarungen der ersten sechs agouti Männchen (*) mit C57Bl/6 N Weibchen
Anzahl der Nachkommen

Mausnummer Chimäres	Anzahl geborene Tiere	Fellfarbe	
		schwarz	braun
1	73	73	/
2	66	66	/
3	13	13	/
4	95	93	2 (m)
5	114	100	14 (7m, 7w)
6	54	54	/

Bei den agouti-Tieren ist in Klammern das Geschlecht der Tiere angegeben (m=männlich, w=weiblich).

Die erhaltenen sieben weiblichen braunen Nachkommen wurden im Southern Blot auf Keimbahntransmission überprüft. Diese konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Anzahl der geborenen Tiere war hoch, doch unter ihnen befanden sich zu wenige braune Tiere. Dies war mit dem geringen Grad des Chimärismus der agouti-Tiere verbunden. Es ist jedoch aus der Literatur bekannt, dass der Anteil der ES-Zellen in der Keimbahn von großer Bedeutung für die Weitergabe an die Nachkommen ist (Fedorov *et al.*, 1997; Auerbach *et al.*, 2000; Seong *et al.*, 2004).

Daher wurden erneut Injektionen mit dem Klon ERAB 303 durchgeführt. Diese Injektionen sind bereits in der Tabelle 5 mit aufgeführt. Dabei konnten vierzehn chimäre Tiere erhalten werden, vier Weibchen und zehn Männchen. Zwei dieser Männchen zeichneten sich durch einen besonders hohen Grad an Chimärismus aus. Die Tiere wurden alle im Southern Blot getestet. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede in der Stärke des ES-Zellanteils (siehe Abb. 6).

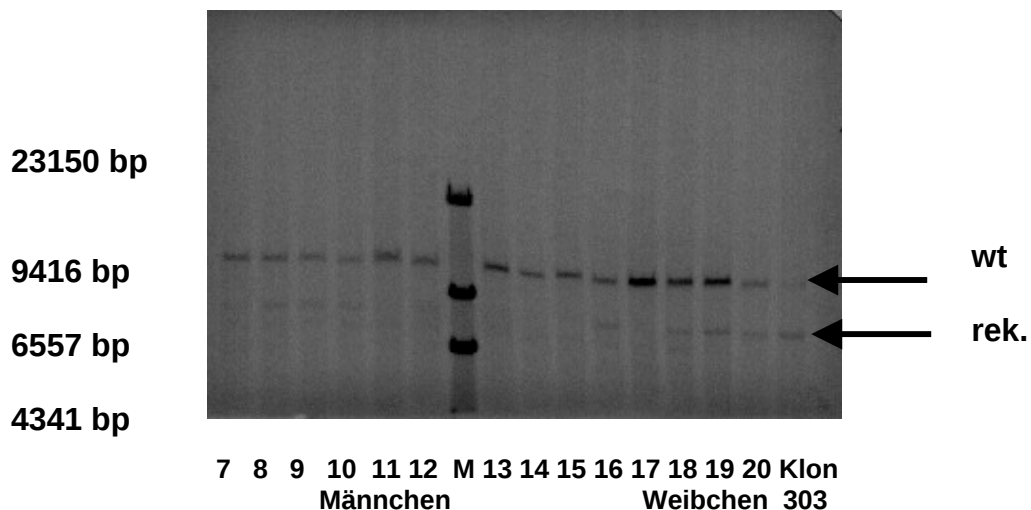


Abb. 6: Southern Blot Analyse der chimären Mäuse nach der zweiten Injektionsrunde des Klons ERAB 303 (siehe Tabelle 5)

Von den chimären Tieren wurde Schwanz-DNA präpariert. Diese DNA wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym Nco I verdaut und im Southern Blot mit der 3'-externen Probe hybridisiert.

In den Chimären mit der Nr. 8-10, 12 und 16 konnte die homologe Rekombination anhand der Bandengröße bei 7800 bp nachgewiesen werden. Die Wildtypbande ist bei 11500 bp erkennbar. Die Weibchen wurden ebenfalls getestet. Als Kontrolle ist der rekombinierte ES-Zellklon ERAB 303 mit aufgetragen.

(M = Marker)

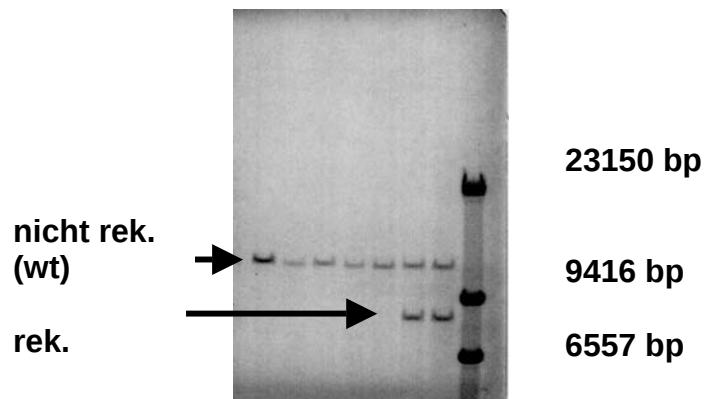
Es wurden von den zehn geborenen Chimären die fünf Männchen mit C57Bl/6 N Weibchen verpaart, bei denen der Chimärismus am stärksten ausgeprägt war. Die Anzahl der Nachkommen dieser Chimären ist in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Verpaarungen der nächsten fünf agouti Männchen des Klons ERAB 303 mit C57Bl/6 N Weibchen
Anzahl der weiblichen Nachkommen

Mausnummer Chimäres	Anzahl geborener Tiere Weibchen	Fellfarbe Weibchen	
		schwarz	braun
8	44	39	5
9	36	44	/
10	21	/	21
12	34	34	/
16	23	23	/

In der Tabelle sind nur die weiblichen Nachkommen aufgeführt, da sie für weitere Verpaarungen wichtig waren.

Nur mit den Chimären Nr. 8 und Nr. 10 konnten weibliche braune Nachkommen erhalten werden. Diese wurden im Southern Blot auf Keimbahntransmission getestet. Bei den fünf weiblichen Tieren vom Chimären Nr. 8 konnte keine Keimbahntransmission nachgewiesen werden, wohingegen alle weiblichen Nachkommen des Chimären mit der Nr. 10 Keimbahnchimären waren (siehe Abb. 7).



**Abb. 7: Typisierung der weiblichen Nachkommen auf Keimbahntransmission
Southern Blot Analyse der Verpaarung der Chimären Nr. 8 und Nr. 10
mit C57Bl/6 N Männchen**

Von den weiblichen Nachkommen der Chimären wurde Schwanz-DNA präpariert, die mit Nco I verdaut und im Southern Blot mit der 3'-externen Probe hybridisiert wurde. Dargestellt sind zwei positiv rekombinierte Weibchen des Chimären Nr.10. Die Rekombination ist an der Bande bei 7500 bp erkennbar. Des weiteren sind vier nicht rekombinierte Weibchen des Chimären Nr. 8 abgebildet, deren Wildtypbande bei 11500 bp liegt.

Die Nachkommen des Chimären mit der Nr. 10 wurden mit Flp deleter Tieren, zur Deletion des Neomycin-Resistenz-Gens, und mit Cre deleter Tieren, zur Deletion des Exon 1, verpaart.

4.2. Die Kontrolllinie ERAB/Flp

4.2.1. Verpaarungsschema zur Generierung der Linie ERAB/Flp

Die positiven weiblichen F1-Nachkommen aus den Verpaarungen des Chimären Nr.10 mit C57Bl/6 N Tieren wurden mit Flp deleter Mäusen verpaart. Diese Linie ist in unserer Arbeitsgruppe als heterozygote Linie verfügbar. Die Flp-Rekombinase ist nicht auf dem X-Chromosom lokalisiert.

Das Konstrukt wurde so kloniert, dass es durch die Verpaarung der F1-Nachkommen mit Flp deleter Tieren zur Flp-vermittelten Rekombination zwischen den beiden FRT-Stellen kam und dadurch nur das neo-Gen deletiert wurde. Exon 1 und somit auch die Genfunktion blieben erhalten (siehe Abb. 8). Diese ERAB/Flp Linie liegt mittlerweile als homozygote Linie vor und kann für alle Versuche als Kontrolllinie eingesetzt werden. Die Tiere entsprechen im Prinzip Wildtyptieren für ERAB, jedoch besitzen sie einen gemischten genetischen Hintergrund der Linien 129P2/Ola Hsd und C57Bl/6 N wie die nachfolgenden Knock-out Linien für ERAB. Außerdem wurde diese Linie als Ausgangslinie für alle weiteren Verpaarungen zur Generierung zellspezifischer Knock-out Linien für ERAB eingesetzt.

Der Nachweis auf Rekombination in den ERAB/Flp Tieren wurde mit einer Southern Blot Analyse erbracht (siehe Abb. 11, 4.3.1.).

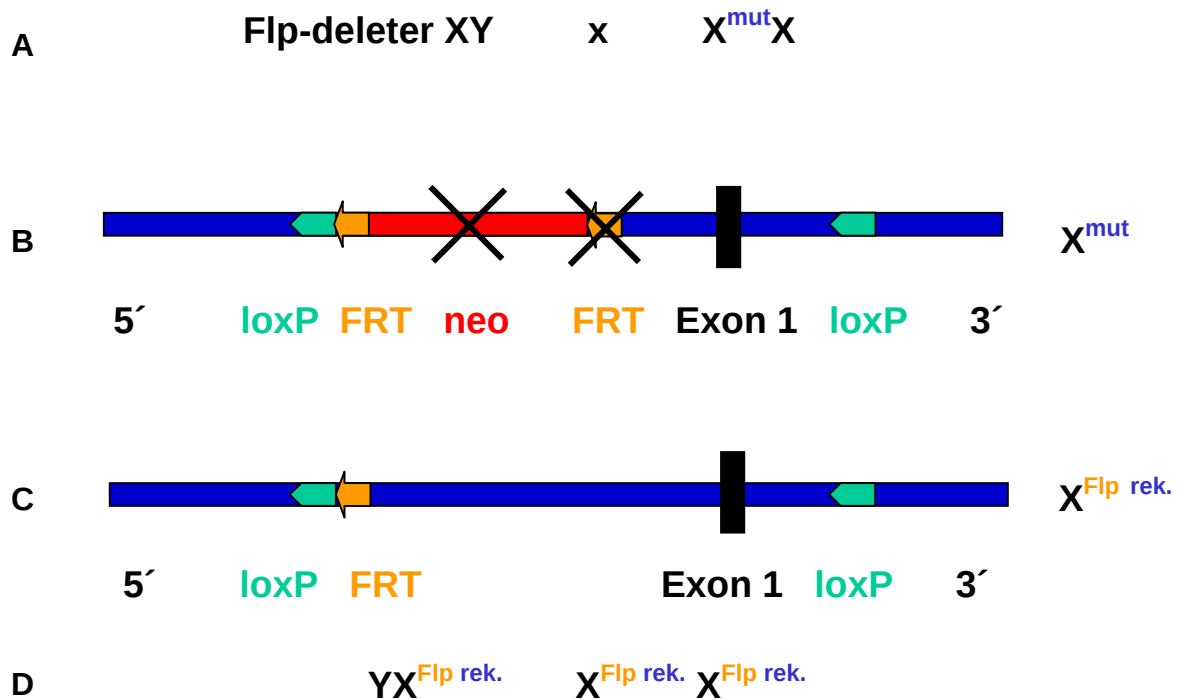


Abb. 8: Verpaarungsschema zur Generierung der Kontrolllinie ERAB/Flp

- A)** Verpaarung eines Flp deleter Männchens mit einem Weibchen, das die Mutation (X^{mut}) trägt. Die Flp Rekombinase ist nicht auf dem X-Chromosom lokalisiert.
- B)** Durch Flp-vermittelte Rekombination zwischen den beiden FRT-Stellen wird das Neomycin-Resistenz-Gen deletiert. Dadurch kommt es auch zur Eliminierung einer FRT-Stelle.
- C)** Die positiv rekombinierten Nachkommen aus dieser Verpaarung tragen nur noch eine FRT-Stelle und ein unverändertes Exon 1, das noch von seinen beiden loxP-Stellen flankiert wird.
- D)** Die ERAB/Flp Kontrolllinie liegt mittlerweile homozygot vor.

4.2.2. Nachweis der Expressionshöhe von ERAB in verschiedenen Organen der ERAB/Flp Mäuse

Die homozygoten Tiere der Linie ERAB/Flp dienten in der weiteren Arbeit als Kontrolltiere. Diese Tiere wurden dazu verwendet, die Genexpression von ERAB in verschiedenen Organen zu untersuchen und teilweise Daten aus der Literatur zu bestätigen. Um die Expressionshöhe in den Organen untereinander vergleichen zu können, wurden die Genexpressionsstudien auf mRNA-Ebene mit Hilfe einer quantitativen Real Time PCR durchgeführt (siehe Abb. 9).

Die erhöhte Expression in Herz und Leber konnte, wie schon in der Arbeit von Yan *et al.* (1997) beschrieben, auch hier gezeigt werden. Diese Organe zeigten mit der Lunge und den Nieren die höchste Expression dieses Gens. Im Vergleich dazu war diese im Kleinhirn und Großhirn nicht hoch. Die Expression in den Hoden ist wichtig in Bezug auf die Fortpflanzungsfähigkeit der Tiere, da ERAB ein im Steroidmetabolismus aktives Enzym ist, das zur Synthese von Dihydrotestosteron beiträgt (Hansis *et al.*, 1998; He *et al.*, 2000; Ivell *et al.* 2003; Baumann *et al.*, 2006). Zur Expression von ERAB in Thymus, Milz und Lymphknoten lagen noch keine Studien vor. Dabei zeigte sich, dass die Expression in der Milz am niedrigsten ist.

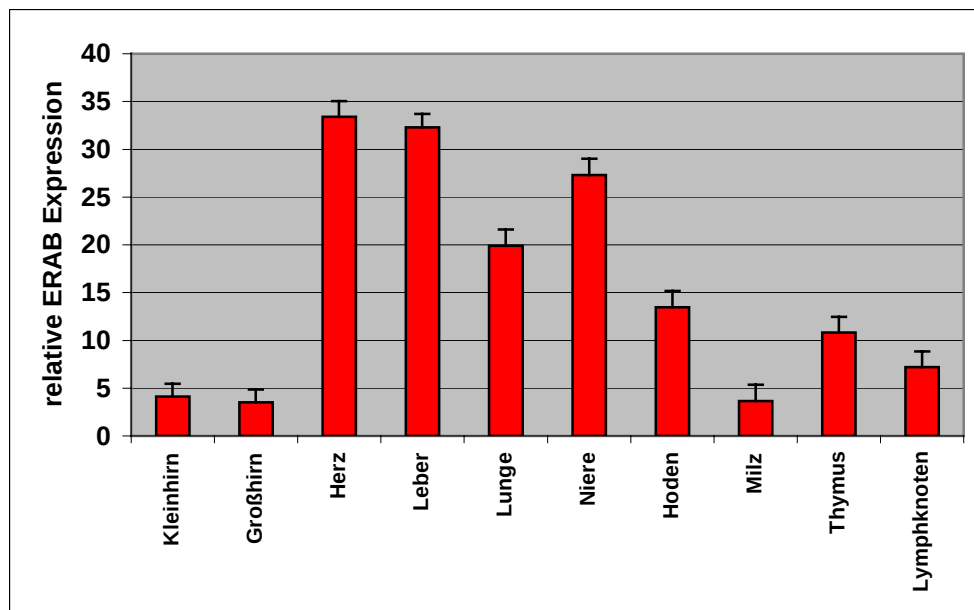


Abb. 9: Expressionsanalysen einzelner Organe von ERAB/Flp Mäusen

Zur Untersuchung der Expression des ERAB Gens in verschiedenen Organen wurden drei ERAB/Flp Tieren Organe entnommen und für eine RNA- und cDNA-Synthese aufgearbeitet. Mit Hilfe der quantitativen Real Time PCR wurde die relative Expressionshöhe von ERAB ermittelt. Die relative Expression von ERAB wurde gegen den internen Standard HGPRT normalisiert.

Die Analyse ergab eine erhöhte Expression in den Organen Herz, Leber, Lunge und Niere.

Die ERAB/Flp Linie diente als Ausgangslinie für alle weiteren Verpaarungen mit Cre transgenen Linien und hatte, wie die nachfolgenden Knock-out Linien für ERAB, einen gemischten genetischen Hintergrund der beiden Linien 129P2/Ola Hsd und C57Bl/6 N. Daher wurden diese Tiere als Kontrolltiere in den Experimenten eingesetzt.

4.3. Verpaarung zur Herstellung der ERAB Knock-out Mäuse

4.3.1. Verpaarung der Linie ERAB/Flp mit Cre deleter Tieren

Zur Generierung der ERAB Knock-out Mäuse wurden die homozygoten ERAB/Flp Tiere mit Cre deleter Tieren verpaart, die Cre Rekombinase unter einem ubiquitären Promoter konstitutiv in allen Geweben exprimieren (Schwenk *et al.*, 1995). Die Cre deleter Linie ist eine homozygote Mauslinie, bei der die Cre Rekombinase auf dem X-Chromosom lokalisiert ist. Bei dieser Verpaarung sollte durch Cre-vermittelte Rekombination zwischen den beiden loxP-Stellen das Exon 1 deletiert und somit die Genexpression gestört werden (siehe Abb. 10).

Da sowohl die Cre-Rekombinase als auch ERAB auf dem X-Chromosom lokalisiert sind, wären in der ersten Generation dieser Verpaarung 50% der männlichen Nachkommen bereits Knock-out Tiere. Die Weibchen sind in der ersten Generation zunächst heterozygot.

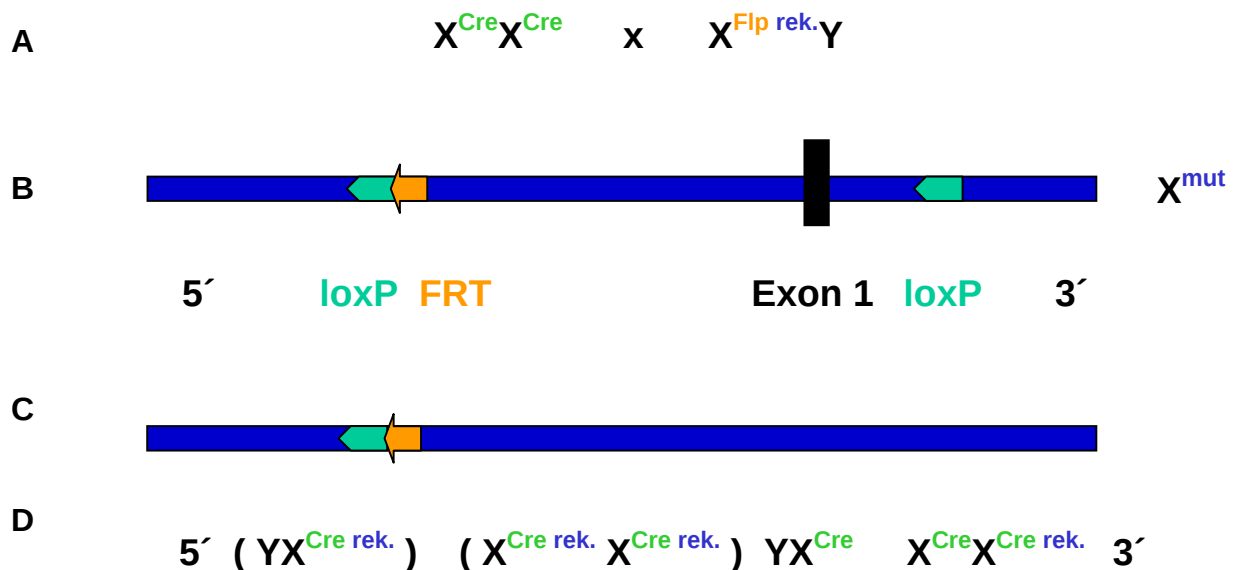


Abb. 10: Verpaarungsschema zur Generierung der ERAB Knock-out Mäuse

- A)** Verpaarung eines homozygoten Cre deleter Weibchens mit einem homozygoten Männchen der Linie ERAB/Flp. In den ERAB/Flp Tieren ist das Neomycin-Resistenz-Gen bereits deletiert.
Sowohl die Cre Rekombinase als auch ERAB liegen auf dem X-Chromosom.
- B)** Vor der Verpaarung wird das Exon 1 in den ERAB/Flp Tieren noch von zwei loxP-Stellen flankiert.
- C)** Durch die Verpaarung mit Cre deleter Weibchen kommt es zur Cre-vermittelten Rekombination zwischen den beiden loxP-Stellen und damit zur Deletion des Exon 1, da dieses sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts von loxP-Stellen flankiert ist. Zurück bleibt eine einzelne loxP-Stelle.
- D)** Dies sind die Tiere, die aus der Verpaarung hervorgehen können. Auf die Tiere in () wird im Text eingegangen.

Zur Generierung der Knock-out Tiere wurden mehrere Verpaarungen angesetzt. Jedoch konnte, wie in nachfolgender Tabelle 8 zusammengefasst wurde, bei 43 überlebenden männlichen Tieren kein einziges homozygotes Knock-out Männchen mit der Rekombination auf dem X-Chromosom nachgewiesen werden (siehe Abb. 11). Statistisch gesehen hätten 50% der geborenen Männchen, wie oben bereits erwähnt, Knock-out Tiere sein müssen. Alle lebenden weiblichen Nachkommen waren heterozygote Tiere, d. h. die Rekombination erfolgte auf einem X-Chromosom (siehe Abb. 10).

Weiterhin wurde beobachtet, dass von insgesamt 103 geborenen Tieren 25 Tiere 1-2 Tage nach der Geburt starben. Ein Grund für dieses frühe Sterben war nicht zu erkennen. Die Wurfgröße war etwas kleiner als bei anderen Verpaarungen, d. h. es wurden von zwei Weibchen im Durchschnitt fünf bis sechs Tiere geboren. Die Wurfgröße der ERAB/Flp Linie betrug dagegen im Durchschnitt acht bis 10 Tiere. Diese toten Tiere wurden auch durch Southern Blot Analysen typisiert und auf Rekombination getestet. Anhand der Tabelle 8 ist zu sehen, dass sich unter den toten Tieren auch keine Knock-out Männchen befanden.

Tabelle 8: Anzahl und Genotyp der Nachkommen aus den Verpaarungen von homozygoten ERAB/Flp Tieren mit homozygoten Cre deleter Tieren

Geschlecht der Tiere	lebend	nach Geburt gestorben
Männchen	43 (YX ^{Cre})	9 (YX ^{Cre})
Weibchen	35 (X ^{Cre} X ^{Cre rek.})	16 (X ^{Cre} X ^{Cre rek.})

In Klammern ist der Genotyp der Tiere angegeben

Auch die Anzahl der toten heterozygoten Weibchen war relativ groß. Der Grund für das frühe Sterben ist nicht klar. Anhand dieser Zahlen wurde deutlich, dass es keine homozygoten Knock-out Männchen für das Gen ERAB geben kann.

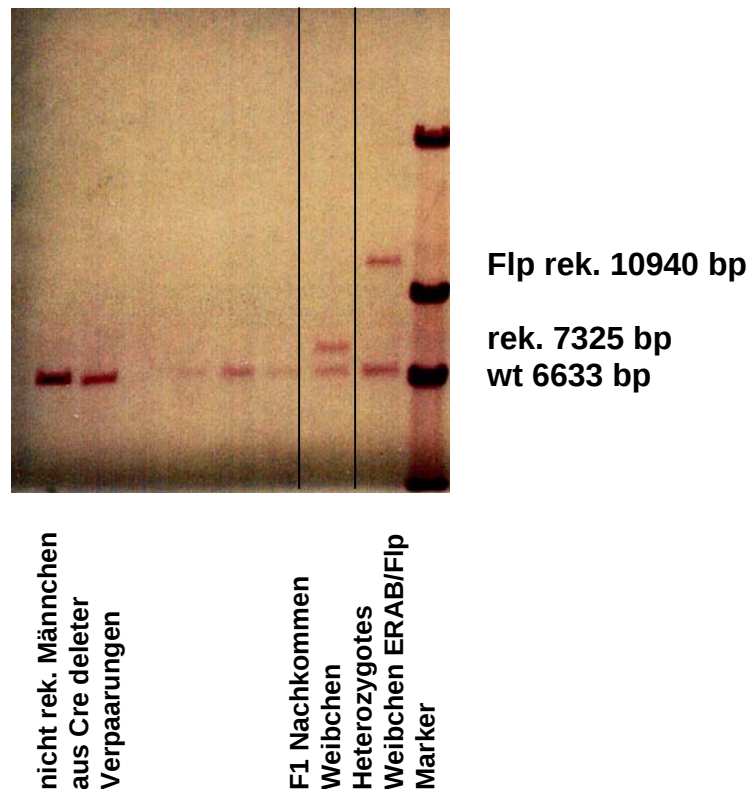


Abb. 11: Southern Blot Analyse der Verpaarungen mit Flp- und Cre deleter Tieren

Dargestellt ist ein heterozygotes Weibchen aus der Verpaarung eines Flp deleter Tieres mit einem Nachkommen des Chimären Nr. 10. Dabei ist eine Wildtypbande bei 6633 bp sowie eine rekombinierte Bande bei 10940 bp zu erkennen, die einer Flp-vermittelten Rekombination entspricht. Bei dem Nachkommen des Chimären (F1 Nachkommen) sieht man sowohl die Wildtypbande bei 6633 bp als auch die rekombinierte Bande bei 7325 bp.

Des weiteren sind sechs Männchen aus der Verpaarung eines weiblichen Nachkommens des Chimären Nr. 10 mit einem Cre deleter Tier dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass alle Tiere Wildtyptiere waren, da die Bande bei 6633 bp liegt.

In der Literatur gibt es eine Studie zu diesem Gen in der Entwicklung von *Drosophila*. Bei diesen wird das homologe Gen zu ERAB scully genannt (Torroja *et al.*, 1998). Fliegen, die Mutationen in diesem Gen tragen, sind nicht lebensfähig, sie sterben bereits im frühen Larvenstadium ab. Dies könnte auch in einem frühen Entwicklungsstadium der Mäuse der Fall sein.

Um ein frühes Absterben der Mäuse im Uterus nachzuweisen, wurden Embryoanalysen durchgeführt. Dazu wurden den schwangeren heterozygoten

Weibchen ($X^{Cre}X^{Cre\text{ rek.}}$), die mit Cre deleter Männchen (YX^{Cre}) verpaart worden waren, an Tag 7,5, Tag 8,5, Tag 9,5, Tag 12,5 und Tag 14,5 die Embryonen entnommen und im Southern Blot getestet. Insgesamt konnten 37 Embryonen analysiert werden. Dabei wurden jedoch nur heterozygote Weibchen ($X^{Cre}X^{Cre\text{ rek.}}$) nachgewiesen.

Durch RT-PCR-Analysen mit Embryonen am Tag 7,5 von C57Bl/6 N Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine ERAB-Expression bereits in diesem frühen Entwicklungsstadium nachweisbar ist (siehe Abb.12).

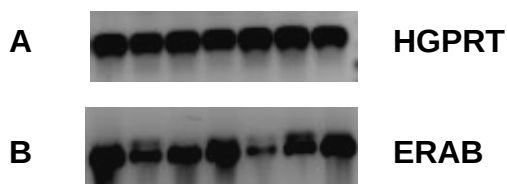


Abb. 12: RT-PCR-Analysen von C57Bl/6 N Embryonen zum Nachweis der ERAB-Expression

Von C57Bl/6 N Weibchen wurden Embryonen am Tag 7,5 entnommen und für eine RNA- und cDNA-Synthese aufgearbeitet. Anhand der durchgeführten RT-PCR konnte eine ERAB-Expression bereits in diesem frühen Entwicklungsstadium der Tiere nachgewiesen werden.

In A ist als Kontrolle die HGPRT-, in B die ERAB-Expression dargestellt.

Anhand der gesammelten Informationen gehen wir davon aus, dass homozygote Knock-out Tiere für ERAB auf keinen Fall lebensfähig sein können und dass die Tiere bereits in einem sehr frühen Entwicklungsstadium im Uterus der Mutter absterben.

4.4. Die Linie ERAB/neo

4.4.1. Verpaarungsschema zur Generierung der ERAB/neo Linie

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung von Knock-out Mäusen für ERAB war die Verpaarung von weiblichen F1 Nachkommen des Chimären ($X^{mut}X$) mit Cre deleter Mäusen (YX^{Cre}) (siehe Abb. 13). In den F1 Nachkommen ist das Neomycin-Resistenz-Gen noch nicht deletiert (siehe Abb. 4). Doch auch mit dieser Verpaarung wurden, wie erwartet, keine Knock-out Tiere geboren. Jedoch wurden Männchen erhalten, die ebenfalls die Mutation tragen (YX^{mut}). Diese Tiere besitzen sowohl das Neomycin-Resistenz-Gen als auch das Exon 1 und sind nicht rekombiniert (siehe Abb. 13). Die Tiere werden daher in der Arbeit als ERAB/neo Linie bezeichnet.

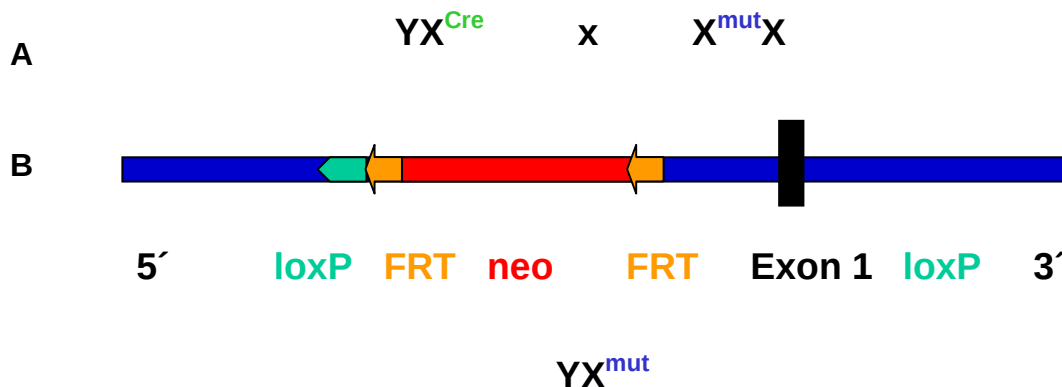


Abb. 13: Verpaarungsschema zur Generierung der ERAB/neo Mäuse

- A)** Verpaarung eines homozygoten Cre deleter Männchens mit einem F1 Weibchen, das die Mutation trägt. Vor der Verpaarung der F1 Tiere sind sowohl das Exon 1 als auch das Neomycin-Resistenz-Gen noch intakt, d. h. bei den $X^{mut}X$ Weibchen wurde die neo-Kassette noch nicht deletiert.
- B)** Durch diese Verpaarung gibt es Männchen, die die Mutation tragen (YX^{mut}). Diese Tiere besitzen sowohl die neo-Kassette als auch das Exon 1, d. h. sie sind nicht rekombiniert.

4.4.2. Phänotypbeschreibung der ERAB/neo Männchen

Durch diese Verpaarung gab es zum ersten Mal Männchen mit der Mutation. Diese ERAB/neo Männchen entwickelten einen sehr ausgeprägten Phänotyp. Eine Erklärung für dessen Auftreten wäre eine gestörte Genexpression für ERAB, die durch das Neomycin-Resistenz-Gen hervorgerufen würde. Aus verschiedenen Studien ist bereits bekannt, dass die Insertion eines Neomycin-Gens in Introns zu Störungen der Genexpression führen kann (Artelt *et al.*, 1991; Colledge *et al.*, 1995; Meyers *et al.*, 1998). Diese gestörte Genexpression konnte mit Hilfe der quantitativen Real Time PCR bei diesen Männchen auch nachgewiesen werden (siehe 4.4.3).

In den ersten Lebenswochen verlief die Entwicklung der nicht rekombinierten Männchen (YX^{mut}) normal, doch ab einem Alter von 11-14 Wochen zeigten die Tiere äußerlich eine stark ausgeprägte Veränderung, die sich zuerst durch ein struppiges Fell äußerte. Was sich zuerst sehr langsam und nicht gleich erkennbar abzeichnete, waren Bewegungsstörungen. Diese äußerten sich in verlangsamtem Gehen, das sich zunehmend verschlechterte. Ein Auftreten mit den Vorderpfoten war kaum möglich. Am Ende waren die Tiere völlig bewegungsunfähig und hatten Probleme mit der Atmung. Hinzu kamen trübe, teilweise verklebte Augen. Die Tiere starben oder wurden in einem Alter von 15-24 Wochen (im Durchschnitt im Alter von etwa 18 Wochen) getötet.

Um den Grund für diese sehr starken Veränderungen und das frühe Sterben der Tiere herauszufinden, wurden einige dieser Männchen sowohl auf histologische Veränderungen als auch auf eine mögliche gestörte Genexpression von ERAB untersucht. Etwa 90% der Tiere hatten eine sehr stark vergrößerte Blase und Blutungen im Darm. Diese waren durch einen schwarzen Darm zu erkennen. Des Weiteren war der Blutfluss der Tiere stark vermindert, ein Bluten durch die Schwanzvene war nicht möglich. Das meiste Blut hatte sich bereits im Darm angesammelt. Die Nieren erschienen teilweise sehr hell, die Lymphknoten waren stark verkleinert und meist kaum zu erkennen. Der Thymus hatte sich bereits stark zurückgebildet. Am auffälligsten jedoch war die sehr stark verkleinerte Milz, die zumeist recht dunkel und durch eine raue Oberfläche gekennzeichnet war.

In Abbildung 14 A ist als Vergleich ein C57Bl/6 N Männchen im Alter von 14 Wochen dargestellt. In Abbildung 14 B sind zwei ERAB/neo Männchen zu sehen. Auf den Bildern ist sowohl eine gekrümmte Haltung als auch die angehobene Vorderpfote zu erkennen.

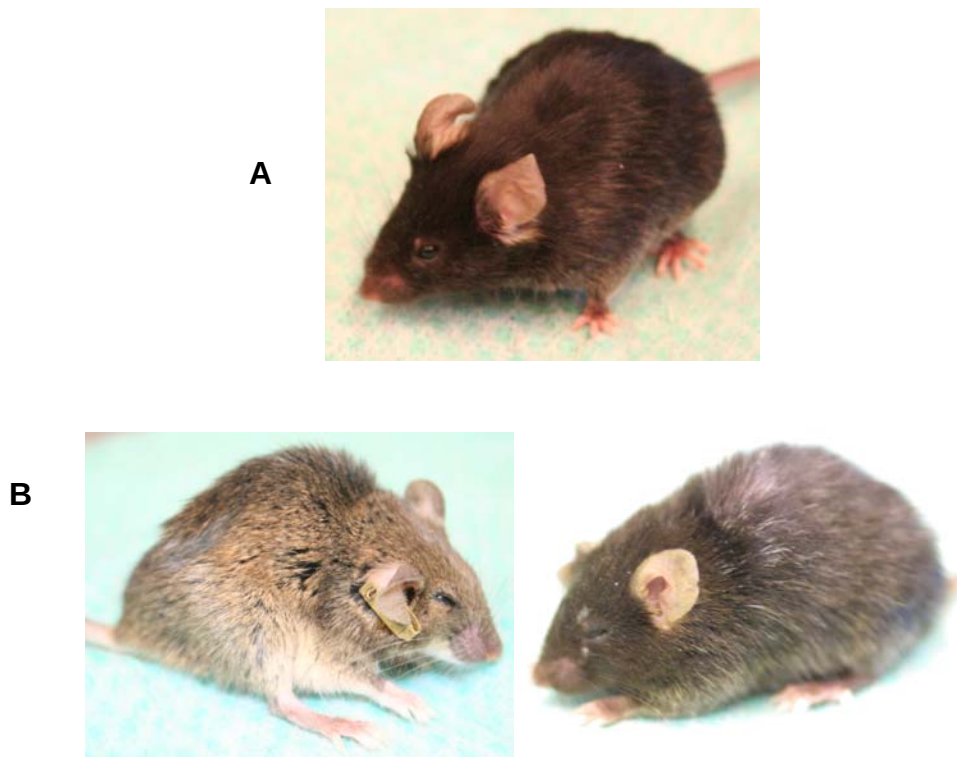


Abb. 14: Darstellung von einem C57Bl/6 N- und zwei ERAB/neo Männchen

In Abbildung A ist ein C57Bl/6 N Männchen im Alter von 14 Wochen dargestellt. Dieses Tier zeigte eine normale Haltung, konnte mit seinen Vorderpfoten auftreten und hatte ein glänzendes Fell.

In Abbildung B sind zwei ERAB/neo Männchen im Alter von 18 bzw. 22 Wochen dargestellt. Man kann deutlich die gekrümmte Haltung sowie die angezogene Vorderpfote bei beiden Tieren erkennen. Beide Tiere hatten ein struppiges Fell.

In der nachfolgenden Abbildung 15 A sind ERAB/neo Männchen dargestellt, die eine stark vergrößerte Blase haben. Die Blase ist in gesunden Tieren kaum zu erkennen, was in Abb. 15 B bei einer C57Bl/6 N Maus als Kontrolle verdeutlicht wird. Des weiteren sieht man das Blut im Darm, helle Nieren und verkleinerte Milzen (Abb. 15 C, D). Die Milzgröße wird in Abbildung 16 nochmals gezeigt, in der Milzen von ERAB/neo-Männchen (Abb. 16 A) mit Milzen gesunder ERAB/Flp-Kontrolltiere (Abb. 16 B) verglichen werden.

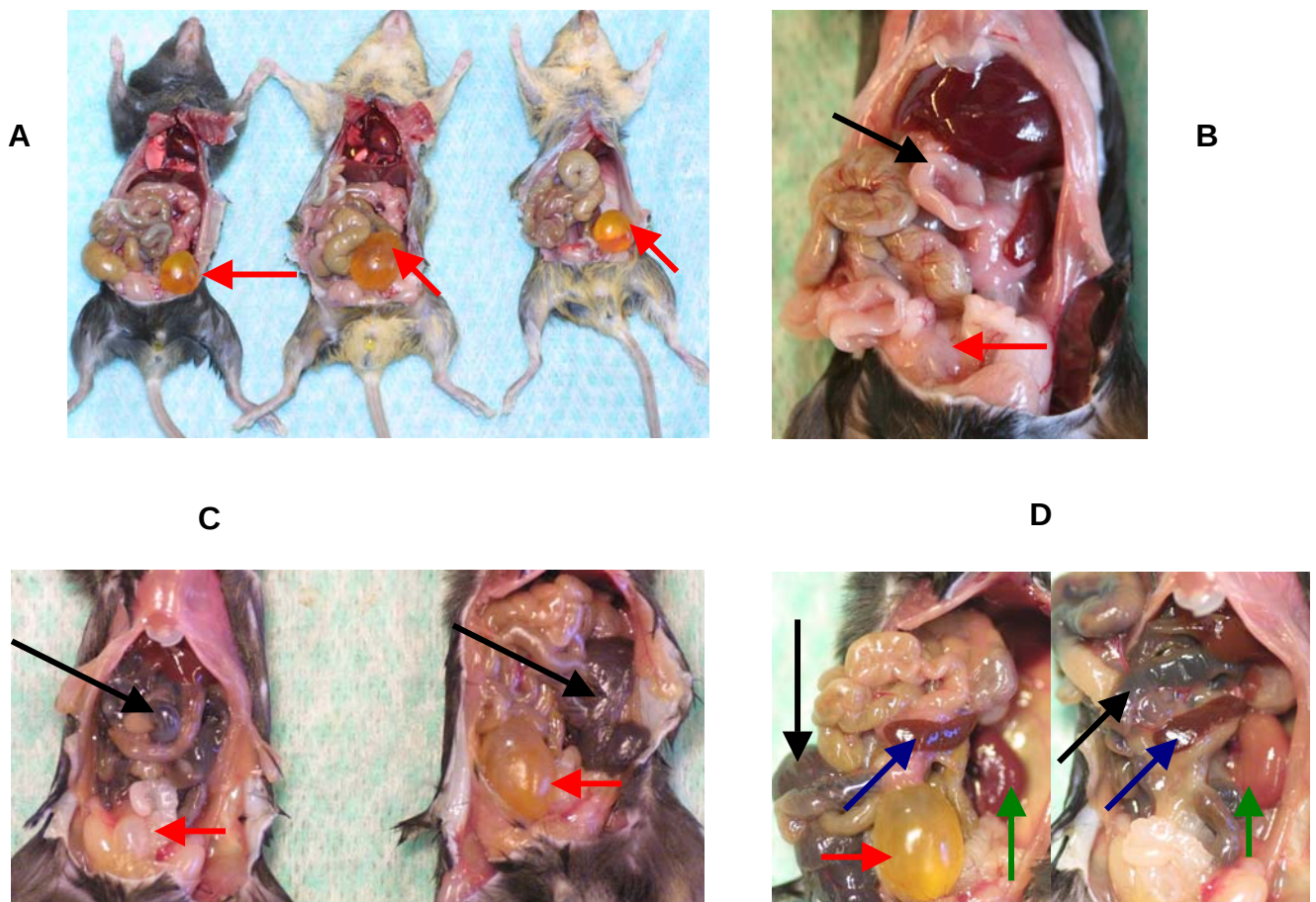


Abb. 15: Darstellung des Phänotyps der ERAB/neo Männchen

A) Darstellung von drei ERAB/neo Männchen im Alter von 16 Wochen.

Bei allen drei Tieren ist die Blase sehr stark vergrößert (→).

B) Als Vergleich ist ein gesundes C57Bl/6 N Männchen im Alter von 14 Wochen dargestellt. Hier wird auf die Blase (→) und den Darm (→) hingewiesen.

C) Bei diesen beiden ERAB/neo Männchen sieht man sehr deutlich die Blutungen im Darm (→). Der ganze Darm hebt sich dadurch schwarz hervor. Bei dem rechten Tier ist außerdem die große Blase sehr gut erkennbar, wobei das Tier links im Bild eine normale Blasengröße hat (→).

D) Bei den beiden Mäusen in Abbildung C wird auf die verkleinerte Milz hingewiesen (→). Außerdem sieht man nochmals sehr schön die Blutungen im Darm (→) und die hellrote Niere (→) (rechtes Bild), die normalerweise dunkelrot erscheint (→) (linkes Bild).

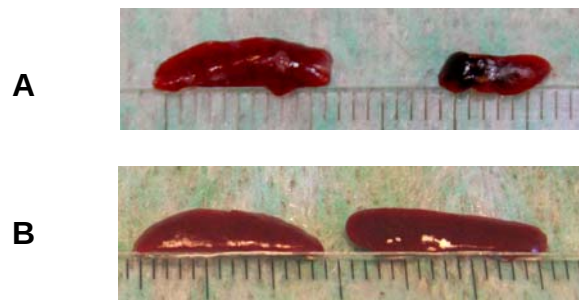


Abb. 16: Vergleich der Milzgrößen von ERAB/Flp Männchen und ERAB/neo Männchen

- A)** Darstellung der verkleinerten Milzen von ERAB/neo Männchen im Alter von 20 Wochen. Bei der Milz links sind Veränderungen auf der Oberfläche zu erkennen, die Milz auf der rechten Bildseite ist sehr stark verkleinert und zum Teil auch schwarz. Die Milzveränderungen waren je nach Krankheitsstatus der Tiere mehr oder weniger stark ausgeprägt.
- B)** Zum Vergleich sind Milzen von gesunden Kontrolltieren der Linie ERAB/Flp dargestellt. Diese sind größer und durch eine glatte Oberfläche ohne Verfärbungen gekennzeichnet.

Obwohl bei ERAB/neo Männchen die Milzen zum Teil sehr stark verkümmert waren, wiesen sie im Durchschnitt $5\text{-}10 \times 10^6$ Zellen pro Milz auf. Bei den Kontrolltieren ERAB/Flp betrug die Zellzahl im Durchschnitt $60\text{-}70 \times 10^6$ Zellen pro Milz.

Die einzelnen Organveränderungen dieser Männchen waren jedoch sehr deutlich von ihrem Krankheitszustand abhängig. Wurden Tiere getötet, bei denen der Phänotyp noch nicht so stark ausgeprägt war, waren keine Blutungen im Darm feststellbar. Leichte Veränderungen in der Milzgröße und die große Blase waren aber schon zu erkennen. Verpaarungen waren mit diesen Männchen nicht möglich, auch nicht in der 7. bis 11. Lebenswochen, als die Tiere noch gesund waren. Auf einen möglichen Grund der Zeugungsunfähigkeit wird in 4.4.4. näher eingegangen.

4.4.3. Genexpressionsanalysen verschiedener Organe

Mit Hilfe der quantitativen Real Time PCR konnte eine gestörte Genexpression in verschiedenen Organen nachgewiesen werden. Im Herz war die ERAB Expression fast genauso hoch wie in den Kontrolltieren, wohingegen sie im Kleinhirn und Großhirn stark vermindert war. Die Milz zeigte als einziges Organ eine erhöhte ERAB Expression (siehe Abb. 17).

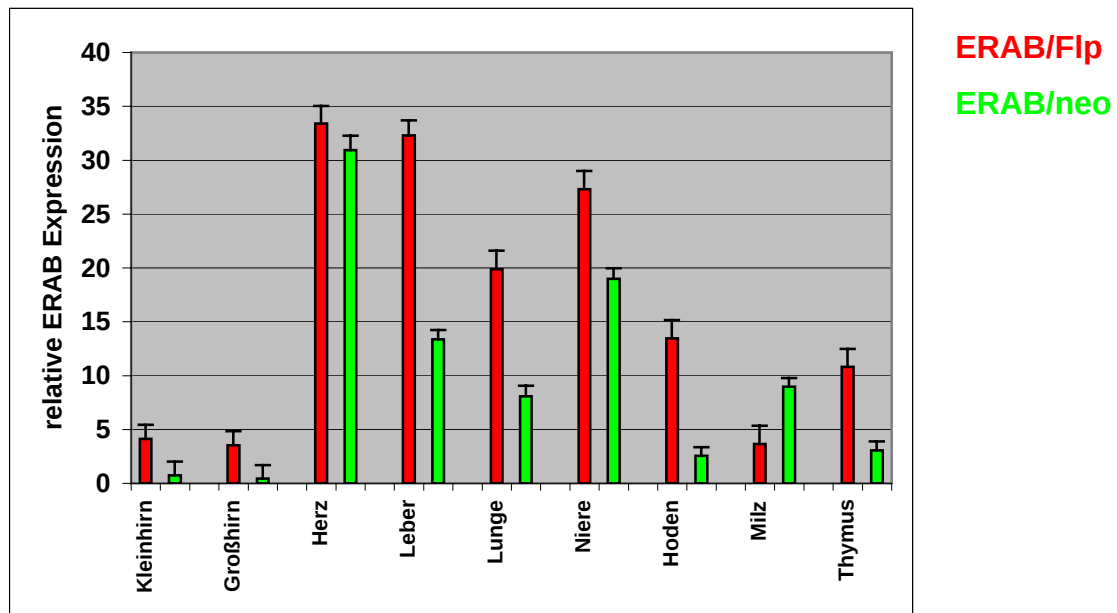


Abb. 17: Genexpressionsanalysen von Organen der ERAB/neo Männchen mit Hilfe der quantitativen Real Time PCR

Für die Expressionsanalysen wurden drei ERAB/neo Männchen, die starke Krankheitssymptome zeigten, analysiert. Dazu wurden den Tieren die Organe entnommen und davon eine RNA- und cDNA-Analyse durchgeführt. Mit Hilfe der quantitativen Real Time PCR wurde die relative ERAB Expression ermittelt. Die relative Expression von ERAB wurde gegen den internen Standard HGPRT normalisiert.

Es konnte eine gestörte Genexpression im Vergleich zu den Kontrolltieren der Linie ERAB/Flp nachgewiesen werden. Diese äußerte sich durch eine verminderte Genexpression in den Organen Kleinhirn, Großhirn, Leber, Lunge, Niere, Hoden und Thymus. Die einzige Erhöhung der Genexpression zeigte sich in der Milz. Die Expression im Herzen war vergleichbar mit der bei den Kontrolltieren.

Anhand dieser Daten wird deutlich, dass das neo-Gen zu einer gestörten Genexpression führte, die sich, bis auf die Milz, in einer verminderten Expression von ERAB äußerte.

4.4.4. Histologische Untersuchungen

Für erste histologische Untersuchungen wurden ERAB/neo Männchen, die sehr starke Krankheitssymptome zeigten, und C57Bl/6 N Männchen als Kontrollen eingesetzt, um einen Vergleich zwischen gesunden und kranken Tieren zu haben. Die Mäuse wurden vor der Organentnahme gewogen, um später die einzelnen Organgewichte in Bezug auf das Körpergewicht bestimmen zu können. Damit konnten Vergleiche zwischen den beiden Mauslinien durchgeführt werden. Wichtige Organe waren das Gehirn (aufgeteilt in Kleinhirn und Großhirn), Thymus, Herz, Lunge, Leber, Milz, Nieren, Nebenniere, Lymphknoten, Darm (aufgeteilt in Dünndarm und Dickdarm), die Hoden, Blase, Prostata und der Skelettmuskel.

Das Körpergewicht der ERAB/neo Männchen betrug im Durchschnitt 22 g, genau wie das der Kontrolltiere. Bei den Organgewichten war die Milz das auffälligste Organ. Ihr Gewicht entsprach bei den ERAB/neo Mäusen im Durchschnitt nur 0,16% des Körpergewichtes, wohingegen die C57Bl/6 N Mäuse im Durchschnitt eine Milz hatten, die 0,47% ihres Körpergewichtes ausmachte. Die anderen Organgewichte waren bei kranken und gesunden Tieren im Mittel gleich.

Von den einzelnen Organen wurden Paraffinschnitte angefertigt, mit denen eine Hämatoxylin/Eosin Färbung durchgeführt wurde. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der oben aufgelisteten Organe zeigten eine unveränderte Struktur der verkleinerten Milz der ERAB/neo Tiere im Vergleich zu den Kontrollen (siehe Abb. 18). Veränderungen zeigten nur die Hoden. In diesen konnte bei den ERAB/neo Männchen im Vergleich zu den Kontrollen eine stark verminderte Anzahl an reifen Spermatozoen und somit eine Subfertilität festgestellt werden (siehe Abb. 19). Damit konnte die fehlende Fertilität dieser Tiere erklärt werden. Da ERAB ein wichtiges Enzym im Testosteronstoffwechsel ist, könnte in diesen Tieren jedoch auch eine verminderte Testosteronmenge vorliegen (Hansis *et al.*, 1998; Ivell *et al.*, 2003).

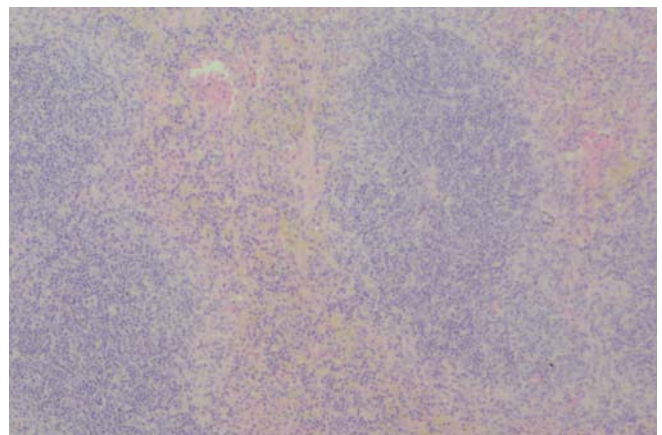
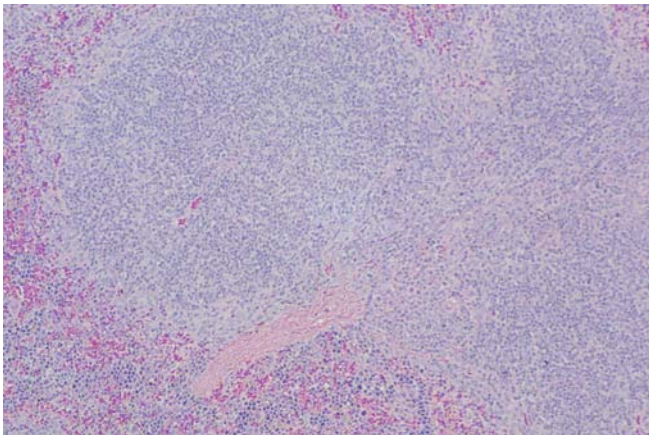
C57Bl/6 N**ERAB/neo**

Abb. 18: Histologischer Vergleich der Milzen von C57Bl/6 N- und ERAB/neo Männchen

Im Vergleich sind die Milzen von einem C57Bl/6 N Männchen im Alter von 12 Wochen und von einem ERAB/neo Männchen im Alter von 14 Wochen dargestellt. Von beiden Organen wurden Querschnitte angefertigt.

In der Struktur dieses Organs sind histologisch keine Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien zu erkennen.

Vergrößerung: 10 x

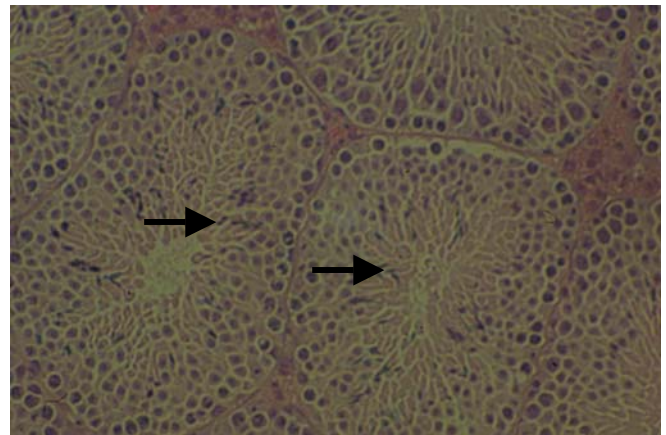
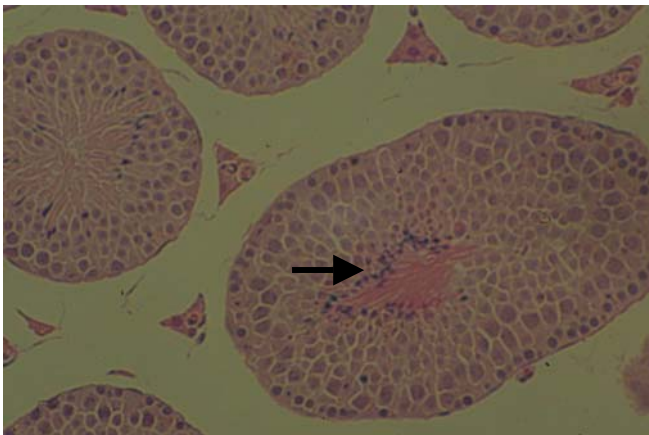
C57Bl/6 N**ERAB/neo**

Abb. 19: Histologischer Vergleich der Hodengewebe von C57Bl/6 N- und ERAB/neo Männchen

Im Vergleich sind die Hodengewebe von einem C57Bl/6 N Männchen im Alter von 12 Wochen und von einem ERAB/neo Männchen im Alter von 14 Wochen dargestellt.

Die Köpfe der reifen Spermatiden und Spermatozoen treten als farbdichte, kommaförmige Gebilde deutlich hervor. Wie in diesen Ausschnitten gut zu erkennen ist, sind bei den ERAB/neo Männchen viel weniger reife Spermien und Spermatozoen vorhanden.

Vergrößerung: 40 x

4.4.5. Untersuchungen verschiedener Organe von ERAB/neo Männchen auf Apoptose

Da die Todesursache der Tiere noch nicht nachgewiesen werden konnte, wurde die genomische DNA verschiedener Organe von ERAB/neo Männchen auf Apoptose untersucht. Eine mögliche Ursache für deren Tod wäre multiples Organversagen. Um dies festzustellen, wurden den Tieren kurz vor ihrem Tod die Organe entnommen und davon genomische DNA isoliert. In einem frühen Stadium der Apoptose kommt es zur Spaltung der genomischen DNA in Mono- und Oligonucleosomen durch apoptosespezifische Endonucleasen. Durch diese Spaltung entstehen DNA-Fragmente mit einer Größe von jeweils 146 Basenpaaren. Diese für eine frühe Apoptose charakteristische DNA-Leiter lässt sich in einem Agarosegel darstellen. Bei einer fortgeschrittenen Apoptose ist auf dem Agarosegel nur noch ein DNA-Schmier zu erkennen, da die DNA schon zu stark degradiert ist.

Als Kontrolltiere wurden die ERAB/Flp Männchen gleichen Alters eingesetzt. Mittels dieses Verfahrens konnte in den ERAB/neo Männchen in einigen Organen eine sehr weit fortgeschrittene Apoptose nachgewiesen werden. Die Organe mit den häufigsten Fällen von Apoptose waren die Milz, die Nieren, der Darm, die Hoden, die Leber, der Thymus sowie das Großhirn. Diese Organe sind in folgenden Agarosegelbildern (siehe Abb. 20) sowohl für ein Kontrolltier der ERAB/Flp Linie als auch für ein ERAB/neo Männchen als Beispiel dargestellt.

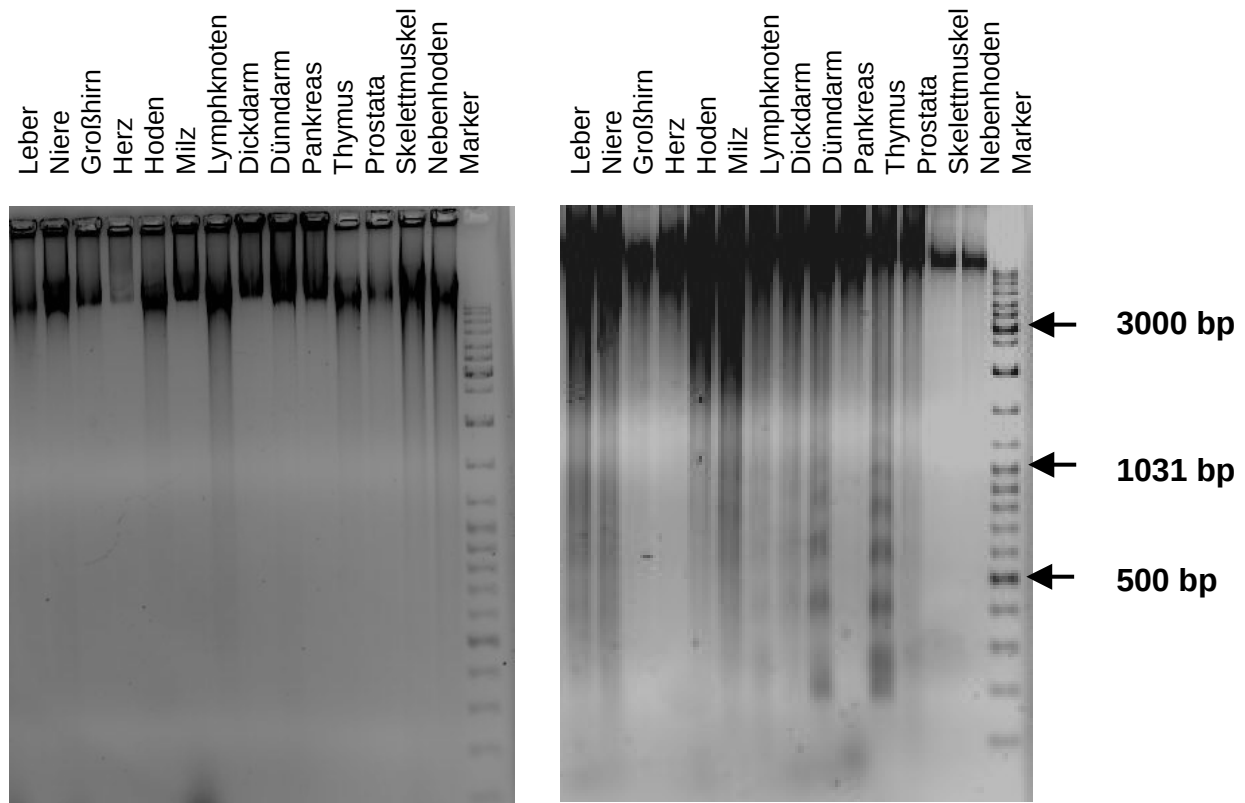


Abb. 20: DNA-Analysen von Organen der ERAB/Flp- und ERAB/neo Männchen zur Untersuchung der Apoptose

Zur Untersuchung der Apoptose in verschiedenen Organen wurden von ERAB/Flp Tieren als Kontrolle und von ERAB/neo Männchen jeweils die Organe entnommen und daraus die genomische DNA isoliert. Die einzelnen DNA-Proben wurden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen.

Bei dem Kontrolltier konnte in allen Organen keine Apoptose nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich bei den Organen Milz, Dickdarm, Dünndarm und Thymus der ERAB/neo Maus die charakteristische DNA-Leiter für die Apoptose. Bei den Organen Leber, Niere und Hoden war nur noch ein DNA-Schmier auf dem Gel erkennbar, d. h. die DNA war schon zu stark degradiert.

4.4.6. Der 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (MHBD)-Mangel

In einer Veröffentlichung der Gruppe von Wanders (Ofman *et al.*, 2003) wurde das ERAB als Homologes des Enzyms 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase beschrieben. Dieses Enzym katalysiert den Abbau der verzweigtkettigen Aminosäure Isoleucin. Der MHBD-Mangel wurde als eine X-chromosomale Krankheit beschrieben, da das HADH II Gen, welches MHBD kodiert, ein X-chromosomales Gen ist (Ofman *et al.*, 2003). Jungen, die diese Stoffwechselkrankheit haben, leiden an einer neurodegenerativen Erkrankung, die sich von einer milden mentalen Retardierung (Olpin *et al.*, 2002) bis hin zu einem progressiven Krankheitsverlauf entwickeln kann (Zschocke *et al.*, 2000; Ensenauer *et al.*, 2002). Diese betroffenen Kinder sind nicht in der Lage zu sprechen, etwas zu greifen, zu sitzen oder zu gehen. Meist sterben sie bereits im Säuglingsalter oder in sehr jungen Jahren. Als Folge eines gestörten Isoleucin-Abbaus kommt es bei den betroffenen Personen zu Anhäufungen von 2-Methyl-3-Hydroxybutyrat und Tiglylglycin im Urin (siehe Abb. 3). Durch die Beschreibung der Krankheitssymptome dieser Patienten und der Homologie von ERAB zum Enzym MHBD wurden Studien mit ERAB/neo-Männchen durchgeführt, um eventuelle Parallelen zwischen der menschlichen Stoffwechselkrankheit und dem Phänotyp der ERAB/neo Mäuse festzustellen. Die Mäuse zeigten durch ihr Verhalten ähnliche Symptome wie die betroffenen Kinder. Um den Isoleucinstoffwechsel in ERAB/neo Männchen zu untersuchen, wurde von diesen Männchen und von Kontrolltieren der Linie ERAB/Flp Urin gewonnen und durch Gaschromatographie und Massenspektrometrie auf verschiedene organische Säuren untersucht. Die Analysen wurden freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Dr. Jörn Oliver Sass im Zentrum für Kinderheilkunde- und Jugendmedizin im Universitätsklinikum Freiburg durchgeführt.

Die organischen Säuren und ihre Funktion sind in nachfolgender Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Untersuchte organische Säuren im Urin der ERAB/Flp- und ERAB/neo-Männchen und ihre Funktionen im Stoffwechsel

Organische Säure	Auftreten im Stoffwechsel
2-Oxo-Isocaproonsäure	beim Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin und Leucin wichtig bei der Ahornsirupkrankheit und bei Mitochondrienkrankheiten
Glutarsäure	im Lysin- und Tryptophanstoffwechsel
N-Isovalerylglycin	im Leucinstoffwechsel dieser ist mit dem Isoleucinstoffwechsel vergleichbar
N-Tiglylglycin	beim Abbau der verzweigtkettigen Aminosäure Isoleucin
Isohexanoylglycin	beim Fettsäureabbau
n-Hexanoylglycin	beim Fettsäureabbau

In den nachfolgenden Abbildungen 21 A und B sind die Ergebnisse der Urinanalysen für die organischen Säuren graphisch dargestellt. Die gemessenen Werte im Urin wurden auf mmol/mol Kreatinin bezogen. Die wichtigste organische Säure in Bezug auf den MHBD-Mangel ist das N-Tiglylglycin. Durch einen MHBD-Enzymmangel im Isoleucin-Stoffwechsel würde es vermehrt im Urin nachweisbar sein. Es wurden jedoch viel geringere Konzentrationen der ausgewählten Substanzen in den ERAB/neo Männchen im Vergleich zu den Kontrolltieren gefunden. Die Kontrolltiere zeigten eine fünffach höhere Expression des Metaboliten N-Tiglylglycin im Urin (beachte auch unterschiedliche Skalen von mmol/mol Kreatinin in den Abbildungen 21 A und B). Das 2-Methyl-3-Hydroxybutyrat konnte bei den Mäusen überhaupt nicht identifiziert werden. Dies wäre jedoch auch ein wichtiger Metabolit gewesen, der bei Störungen im Isoleucinabbau erhöht vorliegen sollte (siehe Abb. 3). Auch die Acylcarnitin-Anaylsen in den Urinproben der Mäuse führten nicht zu einem Hinweis auf einen Defekt im Isoleucin-Stoffwechsel der ERAB/neo Mäuse.

A

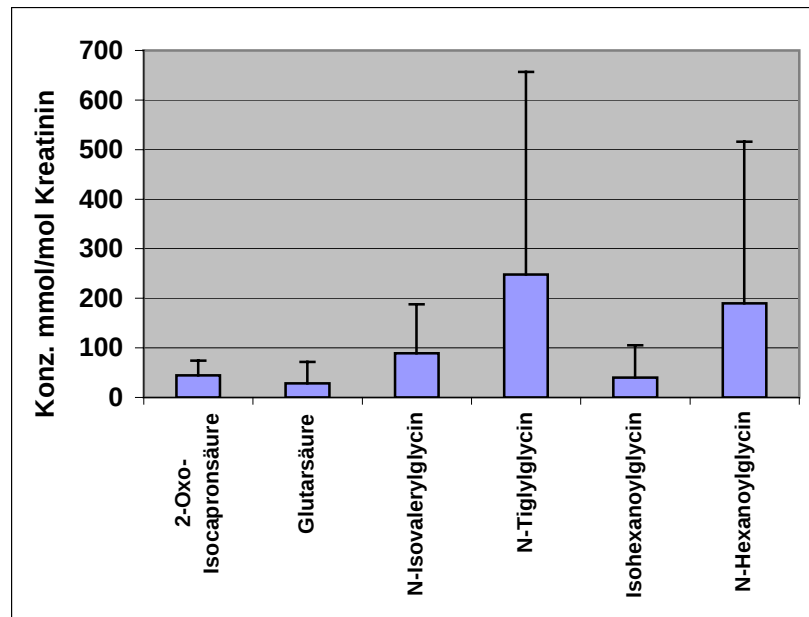


Abb. 21 A: Urinanalysen von ERAB/Flp Mäusen zur Untersuchung des MHBD-Mangels

Dargestellt sind die mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie analysierten Metabolite im Mäuseurin. Die Werte wurden auf mmol/mol Kreatinin bezogen. Die Analysen wurden mit acht Kontrolltieren der ERAB/Flp Linie durchgeführt.

Der wichtigste Metabolit, der Hinweise auf einen gestörten Isoleucinstoffwechsel geben könnte, war das N-Tiglylglycin. Dessen Wert lag bei ~ 250 mmol/mol Kreatinin. Jedoch war dieser ermittelte Wert mit einer sehr hohen Standardabweichung verbunden.

Alle Urinanalysen wurden freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Dr. Jörn Oliver Sass im Zentrum für Kinderheilkunde- und Jugendmedizin im Universitätsklinikum Freiburg durchgeführt.

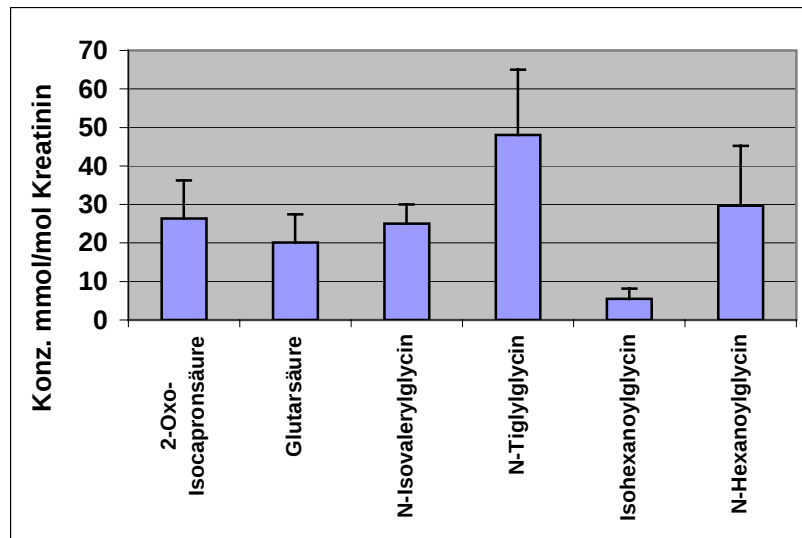
B

Abb. 21 B: Urinanalysen von ERAB/neo Mäusen zur Untersuchung des MHBD-Mangels

Wie in Abbildung 21 A sind auch hier die mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie analysierten Metabolite im Mäuseurin graphisch dargestellt. Die Werte wurden auf mmol/mol Kreatinin bezogen und die Analysen mit zehn Männchen der ERAB/neo Linie durchgeführt.

Alle ermittelten Werte in diesen Tieren zeigten eine viel geringere Konzentration als in den ERAB/Flp Tieren. Besonders der wichtigste Metabolit, das N-Tiglylglycin, hatte in diesen Tieren im Durchschnitt nur eine Konzentration von ca. 50 mmol/mol Kreatinin, wobei der Wert für diesen Metaboliten in den Kontrolltieren bei ca. 250 mmol/mol Kreatinin lag, d. h. er war in diesen Tieren um das fünffache höher als in den kranken Tieren. Dies wäre, falls es Störungen im Isoleucin-Stoffwechsel in den ERAB/neo Mäusen geben würde, nicht der Fall. Dann würde man eine vielfach höhere Menge an Tiglylglycin in kranken Tieren im Vergleich zu gesunden Kontrollmäusen erwarten.

Auch diese Analysen wurden freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Dr. Jörn Oliver Sass im Zentrum für Kinderheilkunde- und Jugendmedizin im Universitätsklinikum Freiburg durchgeführt.

Da bei den untersuchten Urinproben der ERAB/neo Mäuse durch die sehr niedrigen Werte der organischen Säuren, und vor allem des Tiglylglycins, keine Hinweise auf einen gestörten Isoleucinstoffwechsel zu finden waren, muss der Grund für ihren Krankheitsverlauf ein anderer sein.

Von allen Tieren wurden Analysen im Trockenblut durchgeführt. Die Werte der ausgewählten Substanzen wurden hier ebenfalls auf Kreatinin bezogen. In diesen Analysen wurden z. B. die Aminosäuren Phenylalanin, Alanin und Tyrosin bestimmt. Des weiteren wurden die Metabolite Isoleucin und freies Carnitin analysiert. Jedoch konnte auch in diesen Blutanalysen kein Hinweis auf einen Defekt im Isoleucin-Stoffwechsel nachgewiesen werden.

Zusammenfassend ergaben die Untersuchungen zur Genexpression, zu Gewebeveränderungen und zum Isoleucinstoffwechsel keinen Aufschluss zum Mechanismus, der für den ausgeprägten Phänotyp der Mäuse verantwortlich ist. Da die unterschiedliche Genexpression in den Organen und das Auftreten der Symptome zu verschiedenen Zeitpunkten keine einheitlichen Studien ermöglichten, wurden die Arbeiten mit der ERAB/neo Linie eingestellt. Diese Linie zeigte jedoch, dass eine gestörte Genexpression von ERAB zu einem ausgeprägten Phänotyp führen kann, der mit dem Tod der Tiere endet. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass ein kompletter Knock-out für dieses Gen nicht lebensfähig ist.

Ferner war diese zuerst erhaltene Linie hilfreich, um Methoden zu etablieren, die zur Analyse der zelltypspezifischen Knock-out Mäuse notwendig waren.

4.5. Die Linie ERAB/Tie2

4.5.1. Verpaarungsschema zur Herstellung der Mauslinie ERAB/Tie2

Zur Herstellung zelltypspezifischer Knock-out Tiere für das Gen ERAB wurde die heterozygote Mauslinie Tie2Cre eingesetzt. Diese Linie wurde in unserer Arbeitsgruppe generiert (Constien *et al.*, 2001). Die Cre Rekombinase unter dem Tie2-Promoter ermöglicht eine spezifische Rekombination zwischen zwei loxP-Stellen ausschließlich in Endothelzellen und hämatopoetischen Stammzellen.

Zur Generierung der Mauslinie ERAB/Tie2 wurden homozygote ERAB/Flp Weibchen ($X^{\text{Flp rek.}} X^{\text{Flp rek.}}$) mit heterozygoten Tie2Cre Männchen verpaart. Die Cre Rekombinase ist in diesem Fall nicht auf dem X-Chromosom lokalisiert (siehe Abb. 22).

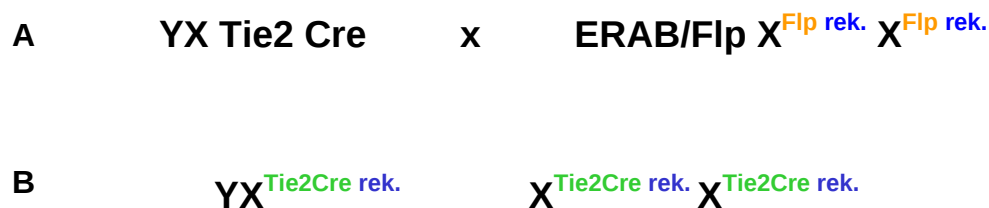


Abb. 22: Verpaarungsschema zur Generierung der Mauslinie ERAB/Tie2

- A)** Verpaarung eines heterozygoten Tie2Cre transgenen Männchens mit einem homozygoten ERAB/Flp Weibchen.
Die Cre Rekombinase ist im Fall des gewebespezifischen Tie2Cre nicht auf dem X-Chromosom lokalisiert.
- B)** Durch diese Verpaarung ist es möglich, sowohl homozygote Männchen als auch heterozygote Weibchen für einen Endothelzellen spezifischen und hämatopoetischen Zellen spezifischen Knock-out für ERAB zu erhalten.

Bei dieser Verpaarung war es möglich, schon in der ersten Generation Knock-out Männchen für ERAB/Tie2 ($YX^{\text{Tie2Cre rek.}}$) zu bekommen. Die Weibchen dagegen waren zunächst heterozygot ($X^{\text{Tie2Cre rek.}} X^{\text{Tie2Cre}}$), da die Rekombination nur auf einem X-Chromosom stattgefunden hatte.

4.5.2. Phänotypbeschreibung der ERAB/Tie2 Knock-out Männchen

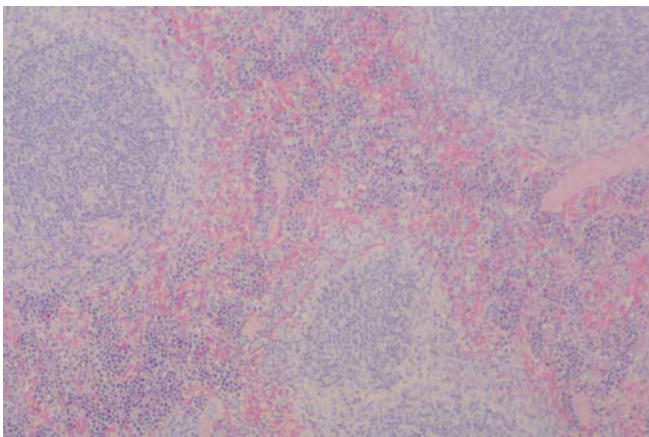
Wie unter 4.5.1. bereits beschrieben, konnten in der ersten Generation gewebespezifische Knock-out Männchen (YX^{Tie2Cre rek.}) für ERAB erhalten werden. Diese Männchen waren zunächst in ihrem Verhalten unauffällig und wurden mit den heterozygoten ERAB/Tie2 Weibchen (X^{Tie2Cre rek.} X^{Tie2Cre}) verpaart, um homozygote Weibchen für diese Linie zu erhalten. Es wurden sechs Verpaarungen angesetzt. Doch bei allen Verpaarungen wurden keine Jungen geboren.

Die Knock-out Männchen veränderten ihr Verhalten und äußeres Erscheinungsbild in einem Alter von 20-22 Wochen. Sie begannen, langsamer zu gehen und entwickelten eine Art „Watschelang“. Außerdem war ein struppiges Fell zu beobachten. Die Tiere konnten von Tag zu Tag schlechter gehen und waren am Ende sehr stark von Krämpfen gezeichnet. Die Tiere starben oder wurden in einem Alter von ca. 26 Wochen getötet. Dieser Phänotyp ist vergleichbar mit dem unter 4.4.2. beschriebenen für die nicht rekombinierten ERAB/neo Männchen. Diese Männchen hatten, wie bereits erwähnt, durch die Insertion des neo-Gens eine gestörte Genexpression. Die Auffälligkeiten in ihrem Verhalten äußerten sich jedoch bereits ab einem Alter von 11-14 Wochen. Die Tiere starben dann mit 15-24 Wochen. Bei den ERAB/Tie2 Männchen waren diese Verhaltensänderungen etwas später, ca. ab der 20. Lebenswoche, zu beobachten. Jedoch verschlechterte sich der Gesundheitszustand der Tiere im Vergleich zu den ERAB/neo Männchen schneller. Auch die fehlende Fertilität der Männchen der ERAB/Tie2 Linie entsprach den Männchen der ERAB/neo Linie. Die heterozygoten ERAB/Tie2 Weibchen hingegen waren in ihrem Verhalten unauffällig. Im Endstadium ihrer Krankheit zeigten die Tiere ebenfalls sowohl eine große Blase, eine verkümmerte Milz als auch Blutansammlungen im Darmbereich, d. h. dass auch hier ein Bluten der Tiere durch die Schwanzvene nicht mehr möglich war. Die anderen Organe hingegen sahen, wie bei den ERAB/neo Tieren, normal aus.

4.5.3. Histologische Untersuchungen der ERAB/Tie2 Knock-out Männchen

Wie bei den ERAB/neo Tieren (siehe 4.4.4.) wurden von zwei Tieren histologische Untersuchungen durchgeführt. Es wurden ebenfalls Paraffinschnitte verschiedener Organe wie Gehirn, Thymus, Herz, Lunge, Leber, Nieren, Milz, Lymphknoten, Darm, Hoden, Blase und Skelettmuskel angefertigt, die mit einer Hämatoxylin/Eosin-Färbung behandelt wurden. Alle Schnitte wurden lichtmikroskopisch analysiert. Veränderungen im Vergleich zu gesunden Tieren waren auch hier nur in den Hoden zu sehen. Und diese entsprachen genau denen in den ERAB/neo Mäusen. Die Struktur der Milz war unverändert (siehe Abb. 23) und in den Hoden war eine verminderte Anzahl an reifen Spermatiden zu erkennen (siehe Abb. 24).

C57Bl/6 N



ERAB/Tie2

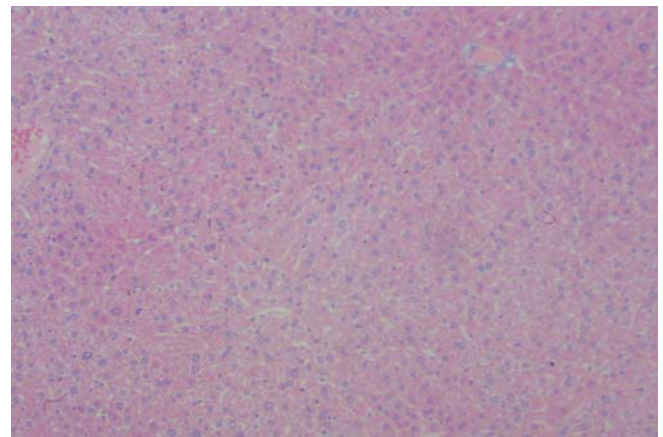


Abb. 23: Histologischer Vergleich der Milzen von C57Bl/6 N- und ERAB/Tie2 Männchen

Im Vergleich sind die Milzen von einem C57Bl/6 N Männchen im Alter von 12 Wochen und von einem ERAB/Tie2 Männchen im Alter von 23 Wochen dargestellt. Von beiden Organen wurden Querschnitte angefertigt. In der Struktur dieses Organs sind histologisch keine Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien zu erkennen.

Vergrößerung: 10 x

C57Bl/6 N

ERAB/Tie2

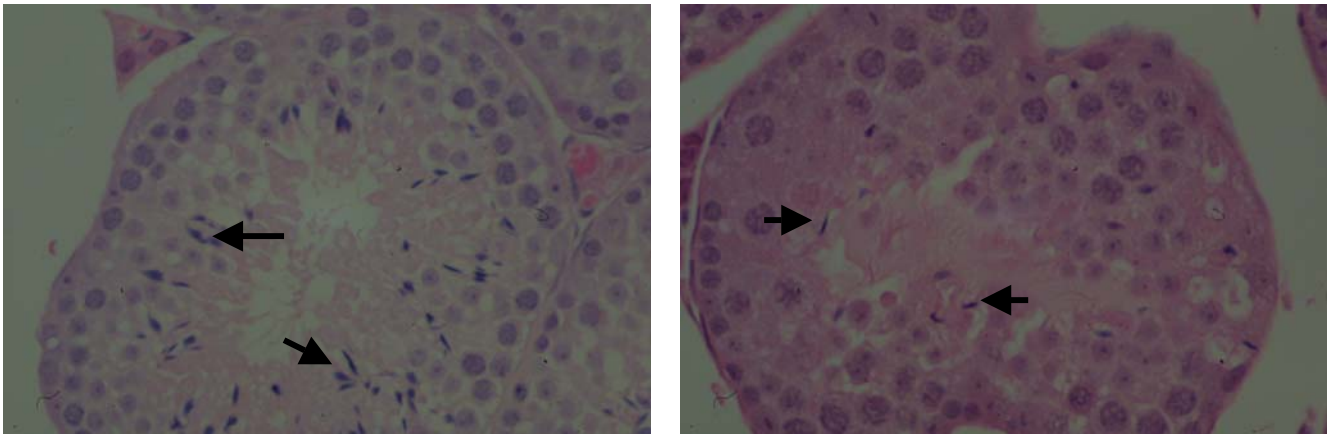


Abb. 24: Histologischer Vergleich der Hodengewebe von C57Bl/6 N- und ERAB/Tie2 Männchen

Im Vergleich sind die Hodengewebe von einem 12 Wochen alten C57Bl/6 N- und einem 23 Wochen alten ERAB/Tie2 Männchen dargestellt. Auch hier sind, wie bei den ERAB/neo Männchen, viel weniger reife Spermatiden und Spermatozoen in den ERAB/Tie2 Männchen, im Vergleich zu C57Bl/6 N, zu erkennen. Die reifen Spermien und Spermatiden sind als dunkle, kommaförmige Gebilde zu erkennen. Dies erklärt die fehlende Fertilität der Tiere.

Vergrößerung: 40 x

4.5.4. Untersuchung der Oberflächenmarker von T-Lymphozyten der ERAB/Tie2 Knock-out Männchen

Da die ERAB/Tie2 Linie einen spezifischen Knock-out in Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen hat, könnte dies zu Veränderungen in den T-Lymphozyten führen. Zu ersten immunologischen Analysen der lymphatischen Organe Milz, Thymus und Lymphknoten wurden den Tieren diese Organe entnommen und für eine Analyse der Oberflächenmarker aufgearbeitet. Erste Hinweise auf mögliche Veränderungen sollten Untersuchungen der CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen in den einzelnen Organen erbringen. Da die Milz der Tiere, wie unter 4.5.2. und 4.5.3. bereits beschrieben, eine verminderte Größe hatte, könnten auch die Zellpopulationen innerhalb dieses Organs ein anderes Muster als in gesunden Tieren zeigen. Dies war jedoch nicht der Fall, wie in Abbildung 25 A für Milz, Thymus und Lymphknoten dargestellt wird. Die Analyse zeigt ein ERAB/Tie2 Knock-out Männchen im Alter von 14 Wochen im Vergleich zu einem WildtypTier der gleichen Linie. Die Anzahl der CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen war in beiden Tieren vergleichbar. Es wurden noch drei weitere Tiere dieser Linie im Alter von 17, 21 und 23 Wochen analysiert, die alle das gleiche Muster ergaben wie in Abbildung 25 A. Die beiden Tiere im Alter von 21 und 23 Wochen zeigten bereits die Krankheitssymptome, trotzdem ergaben sich keine Veränderungen in den Zellpopulationen.

Weitere Hinweise auf den Phänotyp sollten durch Untersuchungen der Gedächtniszellen in der Peripherie erfolgen. Gedächtniszellen zeichnen sich durch die Expression anderer Oberflächenmoleküle aus als naive T-Zellen. Ein charakteristischer Oberflächenmarker für CD8⁺ Gedächtniszellen ist CD44. Des weiteren haben sie eine niedrige Expression von L-Selektin (CD62L). Naive T-Zellen zeichnen sich durch eine Expression von CD44^{niedrig} und CD62L^{hoch} aus, wohingegen Gedächtniszellen CD44^{hoch} und CD62L^{niedrig} exprimieren. Auch hier zeigten sowohl das WildtypTier als auch das Knock-out Tier die gleiche Anzahl an Gedächtniszellen (siehe Abb. 25 B).

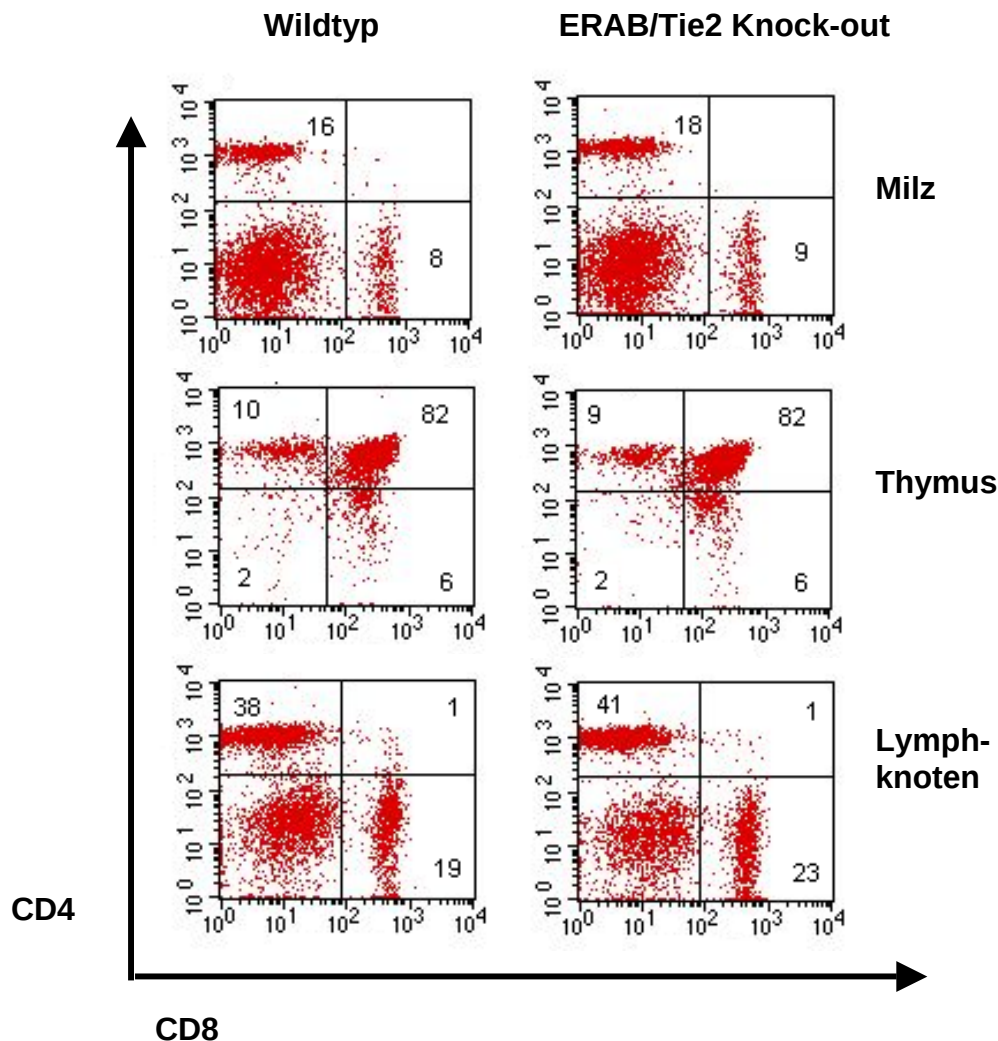


Abb. 25 A: Untersuchung der Verteilung von CD4- und CD8 T-Zellen in den lymphatischen Organen eines ERAB/Tie2 Knock-out Männchens

Für die Analyse wurden die Organe Milz, Thymus und Lymphknoten der Tiere entnommen und für eine FACS-Färbung aufgearbeitet. Die Zellen wurden mit den Antikörpern CD4 PE und CD8 FITC gefärbt, um die Verteilung der CD4- und CD8 T-Zellen zu untersuchen.

Dargestellt ist eine Messung, durchgeführt mit einem ERAB/Tie2 Knock-out Männchen und einem Wildtypmännchen. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Analyse 3 Monate alt.

In den Abbildungen sind die Prozentzahlen der einzelnen Populationen angegeben.

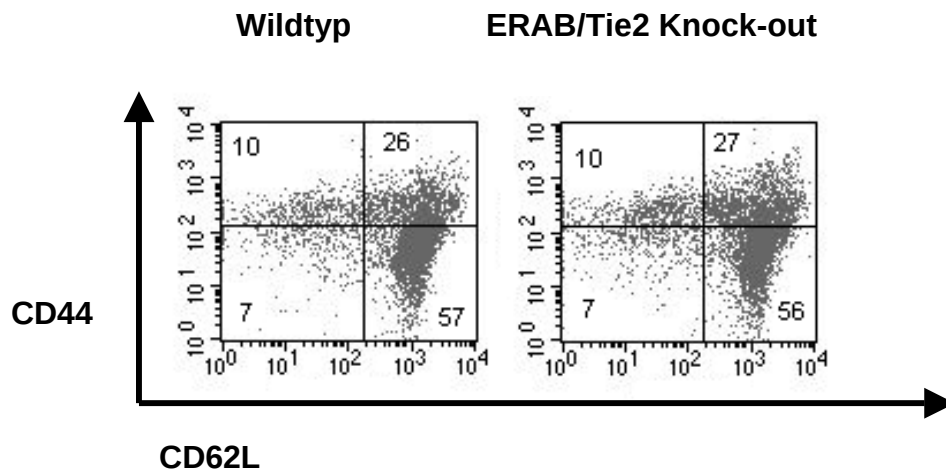


Abb. 25 B: Untersuchung der Gedächtniszellen in der Peripherie eines ERAB/Tie2 Knock-out Männchens

Für die Färbung zur Analyse der Gedächtniszellen in der Milz des ERAB/Tie2 Männchens und dem Wildtypmännchen wurden die Zellen mit den Antikörpern CD62L und CD44 APC gefärbt.

In den Abbildungen sind die Gedächtniszellen der CD8⁺ T-Zellpopulation dargestellt. Beide Tiere hatten die gleiche Anzahl an Gedächtniszellen.

Somit führt ein Ausschalten des ERAB Gens in Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen zu keinen Veränderungen in den T-Lymphozytenpopulationen von Milz, Thymus und Lymphknoten.

4.5.5. Verpaarung der heterozygoten ERAB/Tie2 Weibchen mit homozygoten ERAB/Flp Männchen zur Generierung homozygoter ERAB/Tie2 Knock-out Weibchen

Da die Knock-out Männchen aufgrund ihrer Subfertilität nicht zu Verpaarungen mit den heterozygoten ERAB/Tie2 Weibchen eingesetzt werden konnten, mussten diese Weibchen mit homozygoten ERAB/Flp Männchen verpaart werden.

Bis jetzt wurden nur zwei Knock-out Weibchen geboren, die in ihrem Verhalten unauffällig sind. Die Knock-out Weibchen sind verpaarungsfähig, jedoch ist die Wurfgröße im Vergleich zu anderen Verpaarungen sehr klein. Im Durchschnitt werden pro Wurf von einem Weibchen drei Tiere geboren.

Diese beiden Knock-out Weibchen wurden bis jetzt noch nicht analysiert. Eines der Weibchen ist mittlerweile zehn Monate alt, ohne Anzeichen von Krankheitssymptomen. Die Knock-out Männchen hingegen starben, wie bereits erwähnt, in einem Alter von ca. 6 Monaten.

Die Linie ERAB/Tie2 ist eine Mauslinie, bei der ERAB in Endothelzellen und hämatopoetischen Stammzellen ausgeschaltet ist. Dieser Knock-out führt in männlichen Tieren dieser Linie zu einem letalen Phänotyp im Alter von ca. 26 Wochen. Homozygote Knock-out Weibchen hingegen sind unauffällig.

Die Männchen dieser Linie zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie die Tiere der ERAB/neo Linie. Daher werden für weitere Studien dieses Phänotyps die genetisch definierten ERAB/Tie2 Tiere untersucht. Da die Zuchterfolge mit dieser Linie begrenzt sind und die Tiere in einem Alter von 20 Wochen die ersten Symptome zeigen, konnten bis jetzt noch nicht viele Tiere für ausführliche Studien erhalten werden.

4.6. Die Linie ERAB/lck

4.6.1. Expressionsanalysen von ERAB in T-Zellen von C57Bl/6 N Mäusen

Für Untersuchungen der Funktion von ERAB in T-Lymphozyten sollten Knock-out Mäuse generiert werden, die eine spezifische Rekombination ausschließlich in dieser Zellpopulation zeigen.

In Vorversuchen mit C57Bl/6 N Mäusen wurde die Expression von ERAB in CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen von Milz, Thymus und Lymphknoten mit Hilfe einer quantitativen Real Time PCR nachgewiesen. Die Analyse ergab, dass die ERAB-Expression im Thymus der Mäuse vergleichbar ist mit der in den CD4⁺ T-Zellen der Milz. Die Expression in den CD8⁺ T-Zellen der Milz ist hingegen erhöht, wobei die CD8⁺ T-Zellen eine doppelt so hohe Expression zeigen wie die CD4⁺ T-Zellen (siehe Abb. 26).

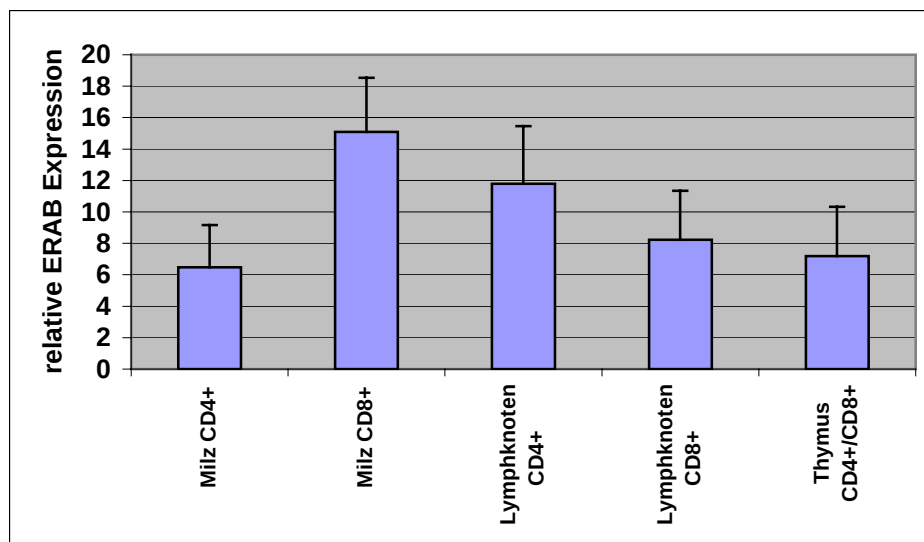


Abb. 26: ERAB-Expression in T-Zellen von Milz, Thymus und Lymphknoten von C57Bl/6 N Mäusen

Zur Analyse der ERAB Expression in den T-Zellen der Organe Milz, Thymus und Lymphknoten wurden die Zellen mit magnetischen Beads für die Oberflächenmarker CD4 und CD8 behandelt und durch ein magnetisches Feld aufgereinigt. Durch FACS-Analysen wurde die Reinheit der CD4⁺- und CD8⁺ positiven Populationen überprüft. Von den aufgereinigten Zellen wurden mRNA- sowie cDNA-Analysen durchgeführt. Die relative Expression von ERAB wurde durch eine quantitative Real Time PCR bestimmt. Die relative Expression von ERAB wurde gegen den internen Standard HGPRT normalisiert.

Die Analyse ergab eine erhöhte Expression in den CD8⁺ T-Zellen der Milz im Vergleich zu deren CD4⁺ T-Zellen. In den Lymphknoten hingegen ist die Expression in den CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu den CD8⁺ T-Zellen leicht erhöht. Die CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen des Thymus zeigen mit den CD4⁺ T-Zellen der Milz die niedrigste Expression.

4.6.1.1. Expression von ERAB in naiven und aktivierten T-Zellen von C57Bl/6 N Mäusen

Zur Untersuchung der Expressionshöhe von ERAB in naiven und aktivierten T-Zellen wurden wie unter 4.6.1. C57Bl/6 N Mäuse eingesetzt. Zur Generierung aktivierter T-Zellen wurde den Mäusen die Milz entnommen und die Zellen für drei Tage *in vitro* mit Antikörpern gegen CD3 und gegen CD28 stimuliert.

Die naiven und aktivierten T-Zellen wurden mit Hilfe der quantitativen Real Time PCR auf die Expressionshöhe von ERAB untersucht, die in nachfolgender Abbildung 27 dargestellt ist.

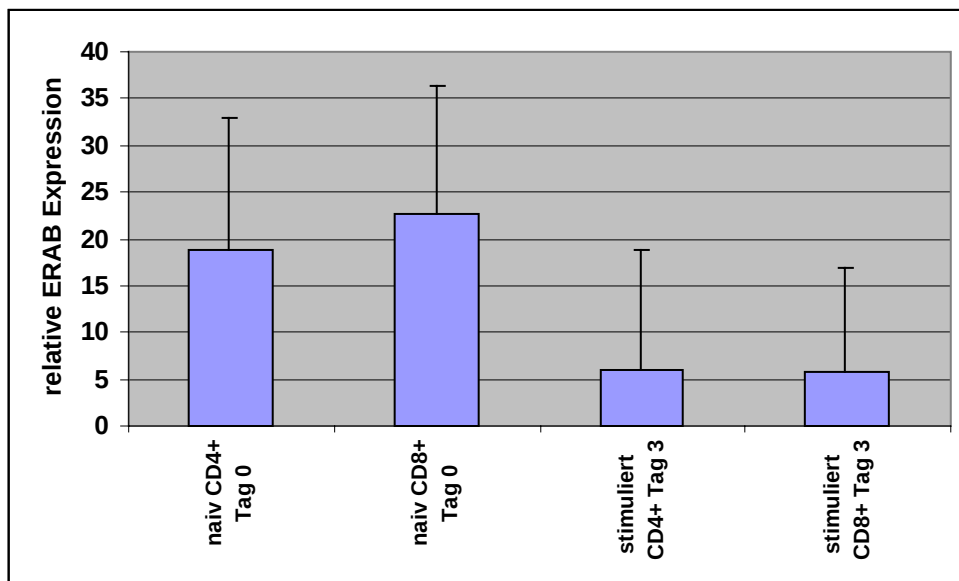


Abb. 27: ERAB-Expression in naiven und aktivierten T-Zellen

Zur Untersuchung der ERAB-Expression in aktivierten und naiven T-Zellen wurden Milzzellen von jeweils drei C57Bl/6 N Mäusen in drei unabhängigen Experimenten durch magnetische Beads in CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen aufgereinigt. Zur Aktivierung der Zellen wurden 1×10^6 Zellen pro Loch einer 24 Loch Platte für drei Tage *in vitro* mit Antikörpern gegen CD3 (3 µg/ml) und gegen CD28 (2 µg/ml) stimuliert. Die Zellen wurden dann für eine RNA- und cDNA-Synthese aufgearbeitet und die ERAB-Expression mit Hilfe einer quantitativen Real Time PCR ermittelt. Die relative Expression von ERAB wurde gegen den internen Standard HGPRT normalisiert.

Die Expression der naiven CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu den stimulierten CD4⁺ T-Zellen unterscheidet sich nicht signifikant ($p < 0,05$). Gleiches gilt für die Analyse der CD8⁺ T-Zellen.

Die Expression sowohl in naiven und stimulierten CD4⁺ T-Zellen als auch in naiven und stimulierten CD8⁺ T-Zellen unterscheidet sich durch die hohen Standardabweichungen nicht signifikant.

4.6.2. Verpaarungsschema zur Herstellung der ERAB/lck Knock-out Mäuse

Um das ERAB-Gen gezielt in T-Zellen ausschalten zu können, wurden lck transgene Männchen mit homozygoten ERAB/Flp Weibchen ($X^{\text{Flp rek.}} X^{\text{Flp rek.}}$) verpaart. Auch diese Cre Rekombinase ist nicht auf dem X-Chromosom lokalisiert (siehe Abb. 28).

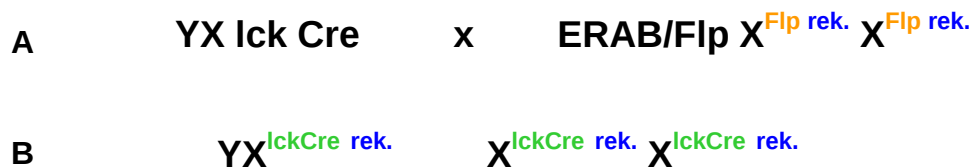


Abb. 28: Verpaarungsschema zur Generierung der Mauslinie ERAB/lck

A) Verpaarung eines homozygoten ERAB/Flp Weibchens mit einem heterozygoten lck Cre transgenen Männchen.

Die Cre Rekombinase ist nicht X-chromosomengebunden.

B) Durch diese Verpaarung konnten sowohl homozygote Männchen als auch homozygote Weibchen der Linie ERAB/lck erhalten werden.

Bei dieser T-zellspezifischen Knock-out Linie für ERAB konnten homozygote Männchen und Weibchen erhalten werden. Dies bedeutet, dass ein Fehlen dieses Gens in den T-Zellen von Mäusen keinen Einfluss auf die Entwicklung der Tiere hat. Die Mäuse konnten verpaart werden und waren in ihrem Verhalten unauffällig.

4.6.3. Test der Rekombination auf genomischer- und mRNA-Ebene

Zum Test der Rekombination auf genomischer DNA-Ebene wurden ERAB/lck Knock-out Tieren und Kontrolltieren der Linie ERAB/Flp Milz, Thymus und Lymphknoten entnommen, die $CD4^+$ - und $CD8^+$ T-Zellen aufgereinigt und genomische DNA präpariert. Mit Hilfe der Southern Blot Analyse konnte die Rekombination in beiden Zellpopulationen nachgewiesen werden (siehe Abb.29).

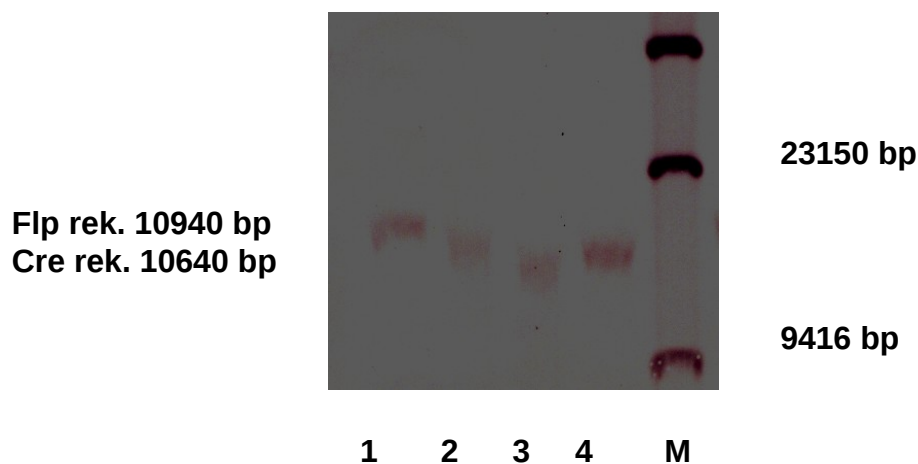


Abb. 29: Nachweis der Rekombination in genomischer DNA von $CD4^+$ - und $CD8^+$ T-Zellen von ERAB/lck Knock-out Mäusen

Zum Nachweis der Rekombination auf genomischer DNA-Ebene wurden von drei ERAB/lck Knock-out Tieren die Organe Milz, Thymus und Lymphknoten entnommen und davon die $CD4^+$ - und $CD8^+$ T-Zellen mittels magnetischer Beads aufgereinigt. Nach Vereinigung der $CD4^+$ - und $CD8^+$ T-Zellen wurden die beiden Zellpopulationen durch FACS-Analyse auf ihre Reinheit überprüft. Anschließend wurde von diesen Zellen die genomische DNA präpariert und mit den Restriktionsenzymen Hind III und Nco I verdaut. Der Southern Blot wurde mit der 3'-externen Probe hybridisiert.

Zum Vergleich wurden $CD4^+$ - und $CD8^+$ T-Zellen von drei ERAB/Flp Tieren (Banden 1 und 2) aufgereinigt und ebenfalls im Southern Blot getestet.

Bande 3 und 4 zeigen die Rekombination in den ERAB/lck Tieren.

M=Marker

Zum Test der Rekombination auf mRNA-Ebene wurden die CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen aufgereinigt und in einer quantitativen Real Time PCR auf die Expression von ERAB überprüft.

Vergleicht man die Werte mit der ERAB-Expression in den aufgereinigten T-Zellen von C57Bl/6 N Mäusen (siehe Abb. 30), erkennt man eine deutliche Abnahme der Expressionshöhe, besonders im Thymus. Hier betrug die Rekombination 91%. In den CD4⁺ T-Zellen der Lymphknoten lag sie bei 84% und in den CD8⁺ T-Zellen bei 82%. Die Rekombinationseffizienz in der Milz war somit am geringsten, in den CD4⁺ T-Zellen lag sie bei 58%, wohingegen sie in den CD8⁺ T-Zellen 65% betrug.

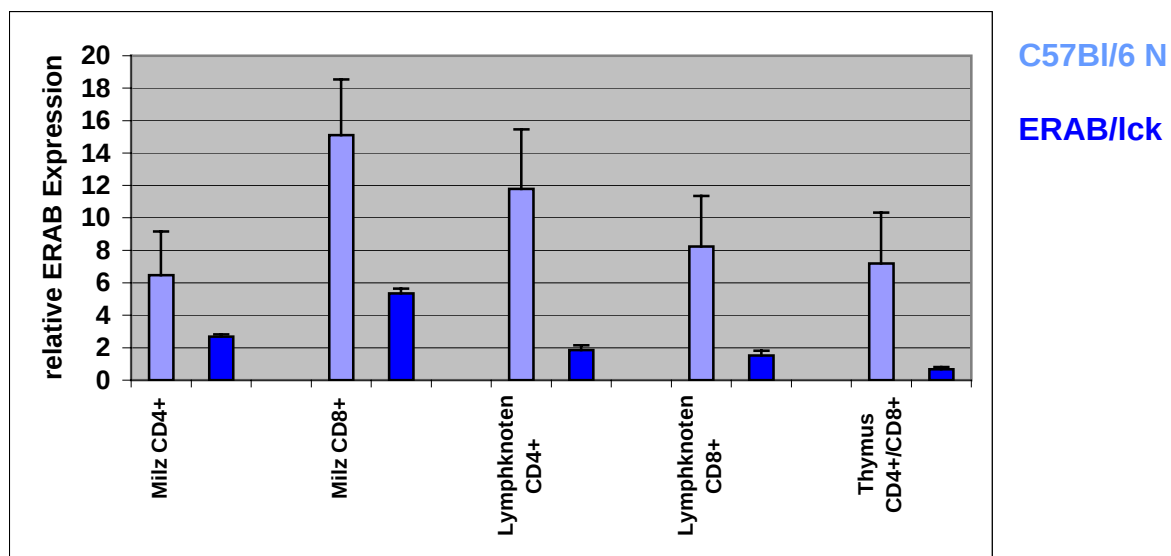


Abb. 30: Quantitative Real Time PCR zum Nachweis der Rekombination auf mRNA-Ebene in ERAB/lck Knock-out Tieren

Zum Nachweis der spezifischen Rekombination in T-Zellen wurden von drei ERAB/lck Knock-out Männchen T-Zellaufreinigungen mit magnetischen Beads für die CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen von Milz, Thymus und Lymphknoten durchgeführt. Die Reinheit der Zellpopulationen wurde mittels FACS-Analyse überprüft. Von den Zellen wurde mRNA und cDNA hergestellt und in einer quantitativen Real Time PCR analysiert. Die relative Expression von ERAB wurde gegen den internen Standard HGPRT normalisiert.

Im Vergleich zu den Werten der C57Bl/6 N Tiere ergab dies eine Rekombination von 58% in den CD4⁺- und von 65% in den CD8⁺ T-Zellen der Milz. Die Rekombination im Lymphknoten betrug für die CD4⁺ Zellen 84%, für die CD8⁺ T-Zellen 82%. Im Thymus war die Rekombination mit 91% am höchsten.

4.6.4. Zellzahlbestimmungen von Milz und Thymus der ERAB/lck Knock-out Mäuse

Um den Einfluss von ERAB auf die Entwicklung und Homöostase der T-Lymphozyten zu untersuchen, wurden die Zellzahlen von ERAB/lck Knock-out Tieren im Vergleich zu gleichaltrigen ERAB/Flp Kontrolltieren im Thymus und in der Milz dieser beiden Linien in verschiedenen Altersstufen verglichen.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen zeigte sich, dass die ERAB/lck Knock-out Tiere im Alter von 9 Wochen eine Thymozytenzahl von $\sim 18 \times 10^7$ hatten, wohingegen diese bei gleichaltrigen Kontrolltieren nur $\sim 13 \times 10^7$ betrug. Auch im Alter von 6 Monaten zeigten die Knock-out Tiere eine weniger stark ausgeprägte Abnahme der Thymozytenzahl ($\sim 8 \times 10^7$ im Vergleich zu $\sim 3 \times 10^7$ bei den Kontrolltieren) (siehe Abb. 31). Die Zellzahlen der Milzen waren in beiden Linien und in verschiedenen Altersstufen der Tiere vergleichbar.

Durch diese Daten wurde deutlich, dass bei den ERAB/lck Knock-out Tieren, sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen, die Thymusrückbildung viel langsamer abläuft als in den Kontrolltieren. Normalerweise ist eine Thymusrückbildung bereits im Alter von 2-3 Monaten der Tiere festzustellen, die mit einer Abnahme der Zellzahl verbunden ist. Es zeigte sich, dass die Knock-out Tiere schon zu Beginn, im Alter von 9 Wochen eine höhere Zellzahl in ihrem Thymus aufwiesen als die ERAB/Flp Kontrolltiere. Zwar nahm die Zellzahl dann ab einem Alter von 11 Wochen genauso stark ab, doch die Tiere hatten im Durchschnitt immer noch eine höhere Thymozytenzahl wie die Kontrolltiere.

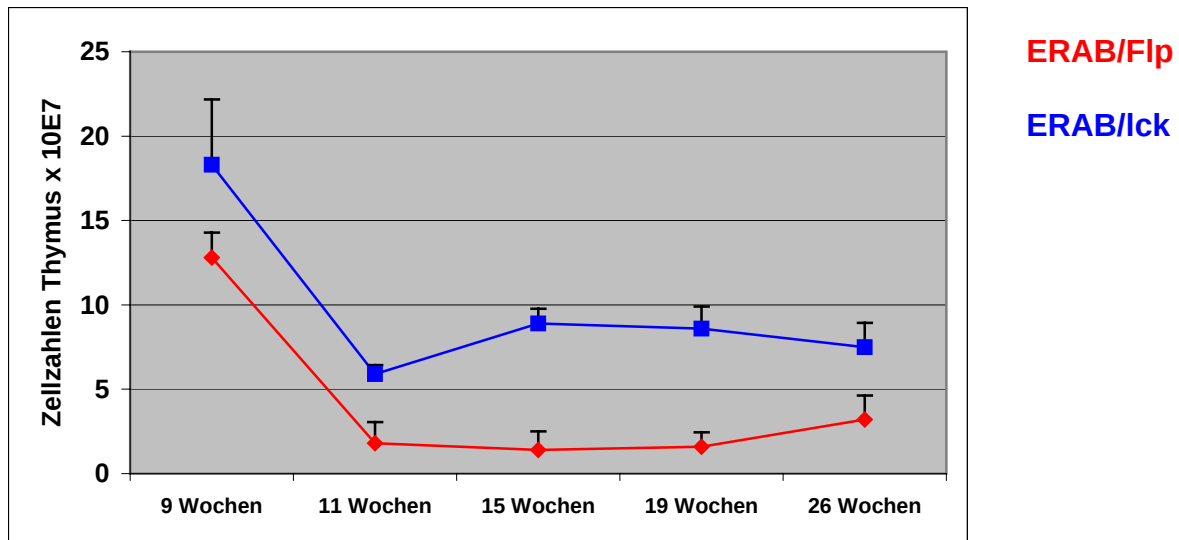


Abb. 31: Graphische Darstellung der Zellzahlen von Thymi der Linien

ERAB/Flp und ERAB/lck

Zur Untersuchung der Zellzahlen der Thymi von ERAB/Flp und ERAB/lck Tieren verschiedenen Alters wurden den Tieren die Thymi entnommen und die Thymozytenzahlen bestimmt. Dazu wurde eine Trypanblaufärbung durchgeführt, um tote Zellen auszuschließen.

Es wurden pro Zeitpunkt drei bis fünf Tiere der jeweiligen Linie analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Thymi der Knock-out Mäuse schon zu Beginn eine höhere Zellzahl aufwiesen, die auch im weiteren Lebensverlauf im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht blieb.

4.6.5. Untersuchung der Oberflächenmarker homozygoter ERAB/lck Mäuse

4.6.5.1. Verteilung der CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen

Für erste Untersuchungen wurden mit diesen Knock-out Tieren Analysen der Oberflächenmarker für T-Lymphozyten durchgeführt, um mögliche Veränderungen in den einzelnen T-Zellpopulationen feststellen zu können. Dazu wurden den Tieren die Organe Milz, Thymus und Lymphknoten entnommen und für die Analyse der Oberflächenmarker aufgearbeitet. Es wurden drei verschiedene Versuchsreihen durchgeführt, mit 2, 6 und 7 Monate alten Tieren. Als Kontrolltiere wurden die ERAB/Flp Tiere eingesetzt, da diese einen gemischten genetischen Hintergrund wie die Knock-out Tiere haben.

Diese ersten Versuche dienten dazu, die prozentuale Verteilung der CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen in den Organen zu untersuchen. Wie in Abb. 32 deutlich wird, ist die Verteilung der Populationen der ERAB/lck Tiere im Vergleich mit den Kontrolltieren identisch. Dargestellt sind die Analysen von Tieren in einem Alter von 6 Monaten. Auch in den 2 und 7 Monate alten Tieren war kein Unterschied festzustellen.

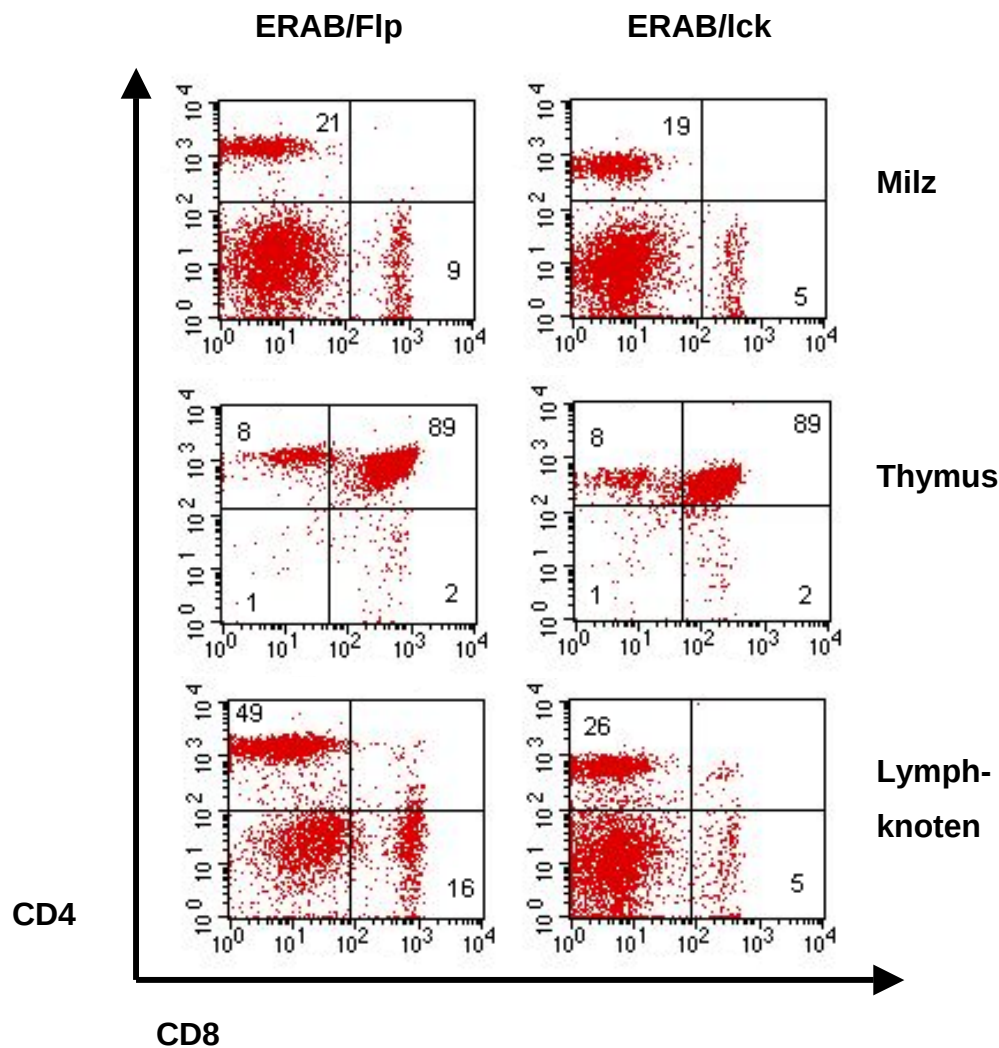


Abb. 32: Verteilung der CD4- und CD8 T-Zellen in den lymphatischen Organen der ERAB/Flp- und ERAB/lck Tiere

Für die Analyse wurden die Organe Milz, Thymus und Lymphknoten der Tiere entnommen und für eine FACS-Färbung aufgearbeitet. Die Zellen wurden mit den Antikörpern CD4 PE und CD8 FITC gefärbt, um die Verteilung der CD4- und CD8 T-Zellen in den Organen der Tiere zu untersuchen.

Dargestellt ist eine Messung, durchgeführt mit einem ERAB/Flp- und einem ERAB/lck Weibchen. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Analyse 6 Monate alt. In den Abbildungen sind die Prozentzahlen der einzelnen T-Zellpopulationen angegeben.

4.6.5.2. Untersuchung der Gedächtniszellen in der Peripherie von ERAB/Flp- und ERAB/lck Knock-out Mäusen

Da in den vorausgegangenen Studien keine Veränderungen durch ein Fehlen des ERAB in den CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen zu erkennen war, wurden die Gedächtniszellen dieser Tiere untersucht. Bei einer Immunantwort kommt es zur Bildung von Effektorzellen. Nach der Beseitigung des Antigens bilden sich aus diesen Effektorzellen die Gedächtniszellen, die in die Peripherie einwandern und eine Immunität gegenüber dem gleichen Antigen gewährleisten. Wie schon unter 4.5.4. beschrieben, zeichnen sich die Gedächtniszellen durch die Expression der Oberflächenmarker CD44 und CD62L aus, wobei das CD44 in diesen Zellen hoch exprimiert ist, der CD62L hingegen eine niedrige Expression zeigt (CD44^{hoch} CD62L^{niedrig}). Daher sind sie sehr gut von den naiven T-Zellen zu unterscheiden, bei denen das CD44 niedrig und dagegen der CD62L eine hohe Expression zeigen (CD44^{niedrig} und CD62L^{hoch}).

Da festgestellt wurde, dass die Zellzahl in den Thymi der Knock-out Mäuse auch im Alter noch sehr hoch ist (siehe 4.6.4), könnte es sein, dass die Zellen an der Auswanderung aus dem Thymus in die Peripherie gehindert werden. Normalerweise wandern Thymozyten nach ihrer Reifung in die Peripherie ein, wo sie die ersten Kontakte mit ihrem Antigen haben und sich zu Effektor- und Gedächtniszellen entwickeln. Durch FACS-Analysen wurde die Zahl der Gedächtniszellen in Kontrolltieren und Knock-out Tieren untersucht. Es konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Linien festgestellt werden, d. h. trotz der hohen Zellzahl im Thymus, die auch im Alter der Tiere noch zu finden war, bildeten sich bei den Knock-out Tieren genau so viele Gedächtniszellen wie bei den Kontrolltieren (siehe Abbildung 33).

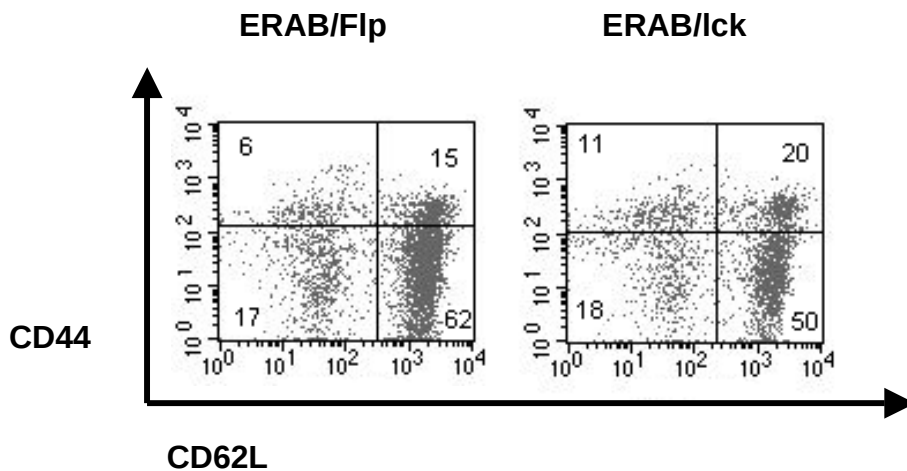


Abb. 33: Analyse der Gedächtniszellen in der Peripherie der ERAB/Flp- und ERAB/lck Tiere

Zur Analyse der Gedächtniszellen in der Peripherie wurden den Tieren die Milzen entnommen und für eine FACS-Färbung aufgearbeitet. Die Zellen wurden mit den Antikörpern CD62L PE und CD44 APC gefärbt.

Dargestellt ist eine Messung, durchgeführt mit einem ERAB/Flp Weibchen und einem ERAB/lck Weibchen. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Analyse 6 Monate alt. In den Abbildungen sind die Prozentzahlen der einzelnen T-Zellpopulationen angegeben. Die naiven Zellen zeichnen sich durch die Expression der Oberflächenmoleküle CD44^{niedrig} und CD62L^{hoch}, die Gedächtniszellen durch das Muster CD44^{hoch} CD62L^{niedrig} aus. Bei den Messungen wurde die CD8⁺ T-Zellpopulation auf Gedächtniszellen untersucht. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen dem Kontrolltier und dem Knock-out Tier.

Die Frage war, welche weiteren Zellpopulationen noch für die hohe Zellzahl im Thymus verantwortlich sein könnte. Eine Möglichkeit wäre eine große Anzahl an Vorläuferzellen innerhalb der Thymozytenpopulation, die auch bei älteren Tieren noch nachweisbar ist. Dies wurde im nächsten Abschnitt 4.6.5.3. weiter untersucht.

4.6.5.3. Untersuchung der Thymozyten von ERAB/Flp- und ERAB/lck Mäusen auf Vorläuferzellen

Da bei den Analysen der ERAB/lck Knock-out Tiere der Thymus besonders durch seine Größe auffiel, wurden die Thymozyten dieser Mäuse auf Vorläuferzellen untersucht. Bei der Entwicklung von T-Zellen gibt es Vorläuferzellen, die sich durch die Expression der Oberflächenmoleküle CD25 (α -Kette des IL-2 Rezeptors) und CD44 auszeichnen. Im Verlauf ihrer Reifung kommt es zu folgenden Expressionsmustern auf der Oberfläche der T-Zellen: $CD25^-CD44^+$, $CD25^+CD44^+$, $CD25^+CD44^-$, $CD25^-CD44^-$. Erst die voll ausgereiften T-Zellen, die einen funktionsfähigen T-Zellrezeptor exprimieren, sind $CD25^-CD44^-$. Daher kann man die Vorläuferzellen anhand ihres Musters an CD44 und CD25 unterscheiden.

Mit den Knock-out Tieren wurden Analysen der Oberflächenmarker durchgeführt, in denen der Prozentanteil der CD25- und CD44 positiven Zellen in der doppelt negativen ($CD4^-CD8^-$) T-Zellpopulation untersucht wurde. Es zeigten sich keine Veränderungen im Verhältnis der T-Zellpopulationen im Vergleich zu den Kontrolltieren der ERAB/Flp Linie ab. Beide Mauslinien hatten gleiche Anteile an Vorläuferzellen in ihren Thymozyten, in allen untersuchten Altersstufen von 2, 6 und 7 Monaten. Diese Analysen sind in Abbildung 34 für Tiere in einem Alter von 6 Monaten dargestellt.

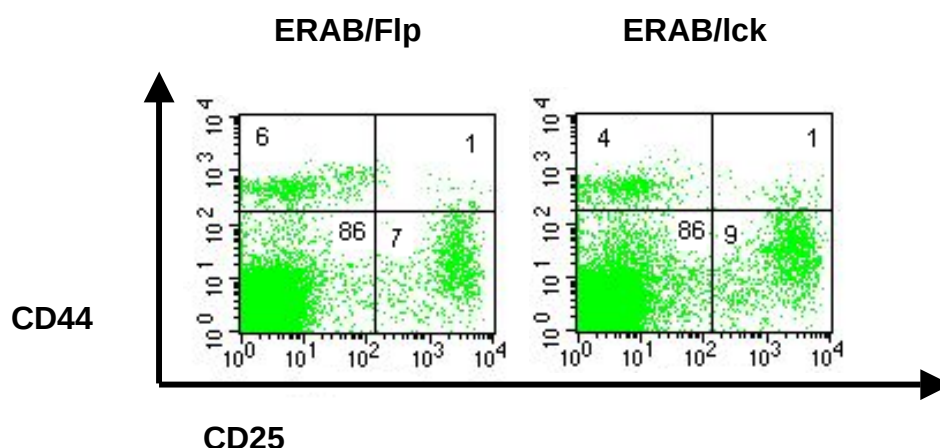


Abb. 34: Untersuchung der Vorläuferzellen in den Thymi von ERAB/Flp- und ERAB/lck Tieren

Für die Analyse der Vorläuferzellen wurden die Thymozyten der Tiere mit den Antikörpern CD44 APC und CD25 PE gefärbt. Dargestellt sind die Vorläuferzellen innerhalb der Population der $CD4^-CD8^-$ T-Zellen. Auch hier war kein Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den Knock-out Tieren zu sehen.

Dargestellt ist eine Messung mit sechs Monate alten Weibchen.

4.6.6. Die ERAB/lck Knock-out Linie und ihr Verhalten in Bezug auf Apoptose in Thymozyten

Durch Hinweise unseres Kooperationspartners D. Stern, dass ERAB Apoptose verhindern könnte, wurden Thymozyten der ERAB/lck Knock-out Tiere mit Dexamethason behandelt, um Apoptose über den intrinsischen Weg auszulösen. Von diesem Glucocorticoid ist bekannt, dass es den Zelltod besonders in unreifen, doppelt positiven Thymozyten auslösen kann (van den Brandt *et al.*, 2003). Andererseits wurden die Thymozyten dieser Tiere mit dem Liganden für den CD95-Todesrezeptor behandelt, um den Einfluss von ERAB auf den extrinsischen Weg der Apoptose zu untersuchen.

4.6.6.1. Die Apoptoseinduktion mit Dexamethason

Für die durch Glucocorticoide vermittelte Apoptoseinduktion wurden ERAB/Flp Männchen als Kontrollen und ERAB/lck Männchen in drei verschiedenen Altersstufen (11, 15 und 19 Wochen) eingesetzt. Den Tieren wurden die Thymi entnommen und die Thymozyten mit drei verschiedenen Konzentrationen an Dexamethason behandelt. Die Apoptoserate wurde nach 3,5 h, 8 h und 22 h durch Annexin V-Färbung und anschließende FACS-Analysen ermittelt. In der nachfolgenden Graphik (Abb. 35) sind die lebenden Zellen 22 Stunden nach Apoptoseinduktion mit Dexamethason dargestellt. Die Ergebnisse der drei Altersgruppen wurden zusammengefasst.

Während bei Kontrolltieren 22 Stunden nach Behandlung mit Dexamethason noch ~ 49% lebende Zellen vorhanden waren, hatten bei den Knock-out Tieren nur ~ 7% der Zellen überlebt. Beide Linien zeigten aber in ihren unbehandelten Kontrollen etwa die gleiche Anzahl an lebenden Zellen (~ 77% bei den Kontrollen, ~ 72% bei den Knock-out Tieren).

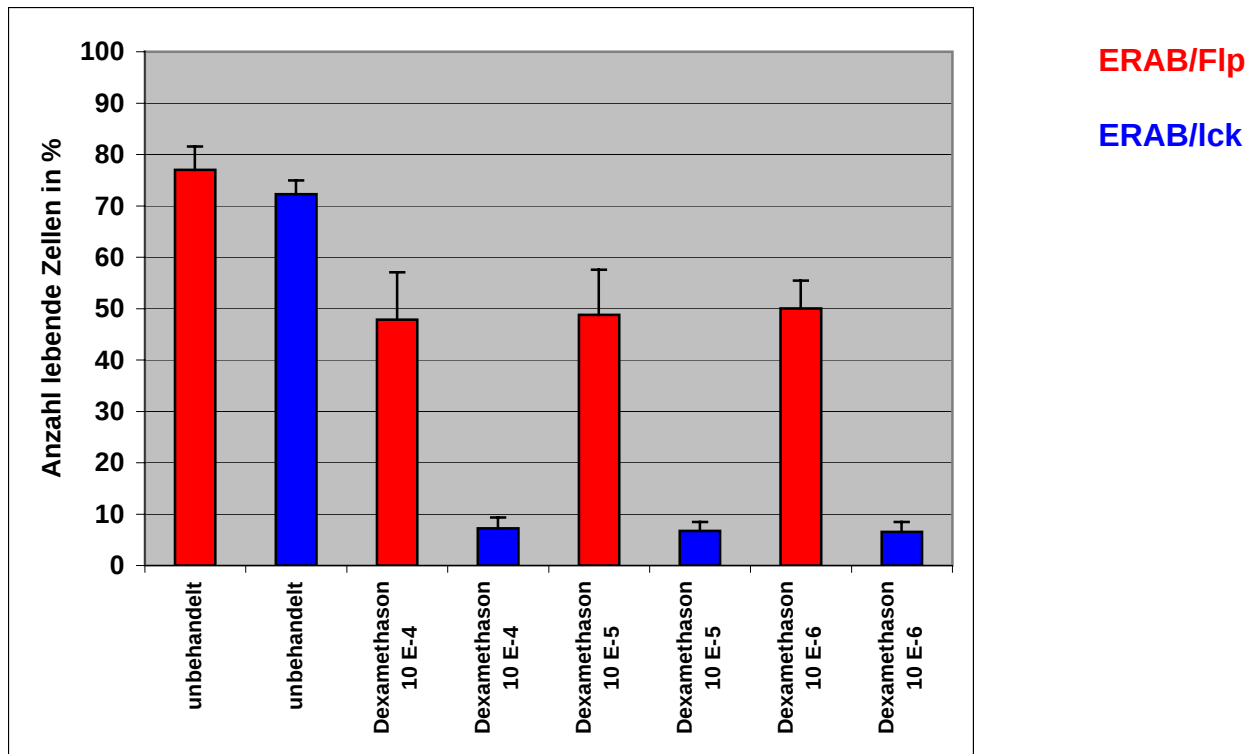


Abb. 35: Graphische Darstellung der lebenden Zellen 22 Stunden nach Dexamethasonbehandlung von ERAB/Flp- und ERAB/lck Tieren
Zusammenfassung der Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten

Bei jeweils fünf Tieren in den Altersgruppen von 11, 15 und 19 Wochen wurde der Thymus entnommen, die Zellzahlen bestimmt und 4×10^6 Zellen pro Loch in eine 12 Loch Platte ausgesät. Die Zellen wurden mit verschiedenen Dexamethason-Konzentrationen (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) für 3,5, 8 und 22 Stunden behandelt.

Dargestellt ist die Anzahl der lebenden Zellen 22 Stunden nach Glucocorticoidbehandlung, die durch eine FACS-Färbung mit Annexin V und Propidiumiodid (PI) ermittelt wurden.

Bei den Kontrolltieren überlebten nach Dexamethasonbehandlung ~ 49% der Thymozyten, bei den Knock-out Tieren hingegen nur ~ 7%. Die Zahl überlebender Zellen war bei beiden Mauslinien in allen drei Konzentrationen des Glucocorticoids fast gleich.

Die unbehandelten Zellen zeigten bei beiden Mauslinien eine ähnliche Anzahl an lebenden Zellen.

Die Stärke der Apoptoseinduktion durch Dexamethason war vom Alter der Tiere unabhängig. Da Thymozyten der ERAB/lck Tiere in Bezug auf den mitochondrial vermittelten Weg der Apoptose viel empfindlicher sind als Thymozyten aus ERAB/Flp Kontrolltieren, können wir daraus schliessen, dass ERAB in Thymozyten Apoptose verhindern kann.

Da die Knock-out Tiere erst kürzlich erhalten wurden, sind sie noch nicht auf den C57Bl/6 N Hintergrund zurückgekreuzt. Es wurden daher ERAB/Flp Tiere als Kontrollen eingesetzt, die ebenfalls einen gemischten Hintergrund der Linien 129P2/Ola Hsd und C57/Bl6 N besitzen wie die Knock-out Mäuse. Dennoch müssen

die erzielten Ergebnisse als vorläufig angesehen werden, bis Versuche mit genetisch definierten Tieren bestätigt worden sind.

4.6.6.2. Die Apoptoseinduktion mit CD95L

Als weiterer Test für Apoptose in Thymozyten wurde der über den Todesrezeptor CD95 vermittelte Weg, der als extrinsischer Weg der Apoptose bezeichnet wird, eingesetzt. Durch die Stimulation des Todesrezeptors CD95 kommt es zur Aktivierung verschiedener Caspasen, die mit einer Zerstörung der Zellintegrität endet.

Durch Behandlung der Thymozyten aus ERAB/Flp- und ERAB/lck Tieren mit einem Antikörper gegen CD95 (CD95L) konnte Apoptose induziert werden. Nach drei Stunden wurde bereits der Zelltod in den Thymozyten festgestellt. Sowohl die Thymozyten aus Kontrolltieren als auch aus Knock-out Tieren zeigten nach fünf Stunden ungefähr den gleichen Anteil an toten Zellen. Dies ist in nachfolgender Abbildung 36 graphisch dargestellt.

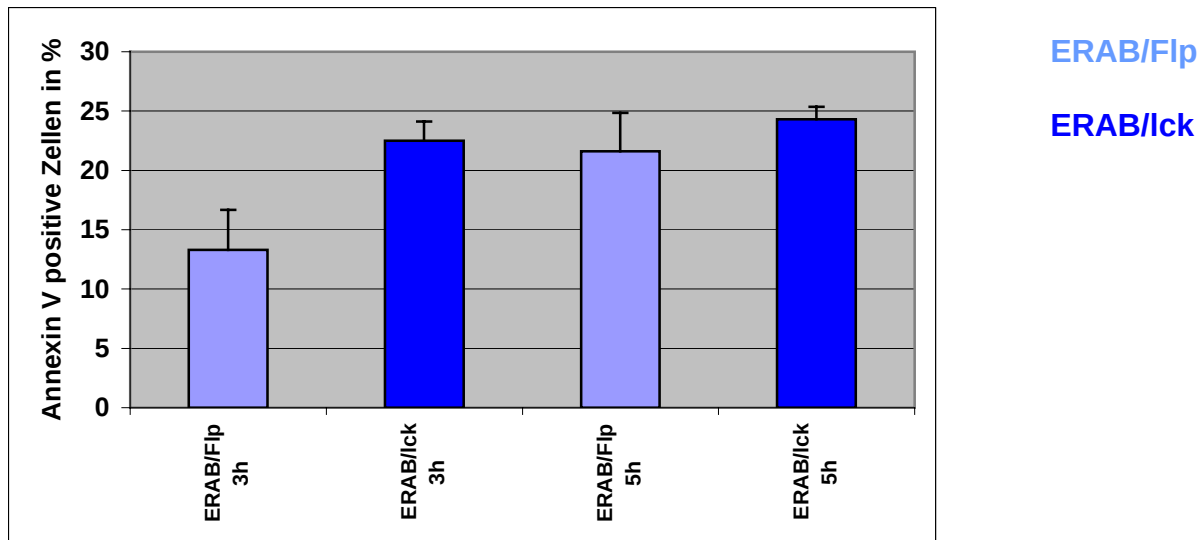


Abb. 36: Graphische Darstellung der Annexin V positiven Zellen drei bzw. fünf Stunden nach Apoptoseinduktion mit CD95L

Von jeweils vier Tieren jeder Linie im Alter von sechs Monaten wurde der Thymus entnommen, die Zellzahlen bestimmt und 2×10^6 Zellen in einer 12 Loch Platte ausgesät. Die Zellen wurden mit einer Antikörperkonzentration von $4 \mu\text{g/ml}$ für drei bzw. fünf Stunden behandelt. Dargestellt ist die Anzahl der apoptotischen Zellen in %, die mittels einer FACS-Färbung mit Annexin V und (Propidiumiodid) PI bestimmt wurden. Bei den Werten wurde der Hintergrund, d. h. Annexin V positive Zellen ohne Antikörperbehandlung, bereits abgezogen.

Nach fünf Stunden Behandlung mit dem Antikörper gegen CD95L war der Anteil der apoptotischen Zellen sowohl bei den ERAB/Flp als auch bei den ERAB/lck vergleichbar.

Während nach Behandlung der Thymozyten mit Dexamethason die Zellen der Knock-out Tiere im Vergleich zu denen der Kontrolltiere eine höhere Apoptoserate zeigten, war dies über den Weg des CD95-Todesrezeptors nicht der Fall.

In Tieren der Mauslinie ERAB/lck wurden größere Thymi mit einer deutlich höheren Thymozytenzahl als in Kontrolltieren der Linie ERAB/Flp beobachtet. Dies lässt auf einen Einfluss von ERAB auf die Thymusrückbildung schliessen. Des weiteren ist dieses Protein an der durch das Glucocorticoid Dexamethason induzierten Apoptose beteiligt, da T-Zellen ohne ERAB verstärkt in Apoptose gehen. Somit sind T-Zellen mit einer ERAB-Expression resistenter gegenüber diesem Zelltod. Jedoch konnte bei der über den Todesrezeptor (CD95)-vermittelten Apoptose kein Unterschied in der Apoptoserate der Thymozyten von Knock-out Tieren gegenüber Kontrolltieren nachgewiesen werden.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Generierung von Knock-out Mäusen für ERAB („endoplasmic reticulum-associated amyloid β -peptide binding protein“), um den Einfluss dieses Gens auf das Immunsystem untersuchen zu können. Mit einer Cre deleter Linie, die Cre-Rekombinase ubiquitär exprimiert, sollte ein kompletter Knock-out für dieses Gen hergestellt werden. Durch den Einsatz verschiedener Mauslinien, die Cre-Rekombinase unter einem zellspezifischen Promoter exprimieren, war es möglich, zwei zellspezifische Knock-out Linien, in denen ERAB in Endothelzellen und hämatopoetischen Stammzellen sowie in T-Lymphozyten inaktiviert werden konnte, zu erhalten.

5.1. Injektion der positiv rekombinierten ES-Zellklone in Blastocysten und Verpaarung der Chimären mit C57Bl/6 N Weibchen

Zur Generierung der Knock-out Mäuse wurde ein Konstrukt erstellt, bei dem es durch Cre-vermittelte Rekombination zur Inaktivierung des Exon 1 und somit zum Ausschalten der Genfunktion kommt. Dieses ERAB-Konstrukt wurde durch Elektroporation in männliche embryonale Stammzellen des Stammes 129 P2/Ola Hsd eingebracht, die ES-Zellen der beiden positiv rekombinierten Klone ERAB 183 und ERAB 303 durch Mikroinjektionen in Blastocysten von C57Bl/6 N Tieren injiziert und zur weiteren Entwicklung in Ammenmäuse transferiert.

Nach den ersten Injektionen konnten sechs chimäre Männchen erhalten werden. Diese Männchen zeichneten sich jedoch nur durch einen geringen Grad an Chimärismus (10-30%) aus. Daher war die Wahrscheinlichkeit, nach der Verpaarung dieser Mäuse mit C57Bl/6 N Weibchen Keimbahnchimären zu erhalten, sehr gering. Hier bestätigten sich die Angaben aus der Literatur (Fedorov *et al.*, 1997; Auerbach *et al.*, 2000; Seong *et al.*, 2004), dass nur ein hoher Anteil an injizierten ES-Zellen (>75%) in der chimären Maus zu einer erfolgreichen Keimbahntransmission führt. Durch weitere Injektionen des Klons ERAB 303 wurden zwei Männchen geboren, bei denen der Chimärismus 70-90% betrug. Nach Verpaarung dieser Tiere konnten von einem Männchen weibliche Keimbahnchimären erhalten werden. Diese Weibchen wurden zur Entfernung des Selektionsmarkers, des Neomycin-Resistenz-Gens, mit Flp deleter Tieren verpaart, um die Kontrolllinie ERAB/Flp zu generieren. Diese Tiere hatten somit für alle weiteren Experimente einen gemischten genetischen

Hintergrund der Linien 129 P2/Ola Hsd und C57Bl/6 N wie die nachfolgenden Knock-out Linien für ERAB. Außerdem wurde diese Mauslinie ERAB/Flp als Ausgangslinie für alle weiteren Verpaarungen mit Cre transgenen Linien eingesetzt.

5.2. Generierung von ERAB Knock-out Mäusen

Zur Generierung der ERAB Knock-out Mäuse wurden homozygote ERAB/Flp Tiere mit Cre deleter Tieren verpaart, die Cre Rekombinase unter einem ubiquitären Promoter konstitutiv in allen Geweben exprimieren (Schwenk *et al.*, 1995). Da sowohl ERAB als auch die Cre Rekombinase auf dem X-Chromosom liegen, hätten bereits in der ersten Generation Knock-out Männchen geboren werden müssen. Doch bei insgesamt 103 geborenen Tieren, unter denen sich 52 Männchen befanden, konnte kein Knock-out Männchen nachgewiesen werden. Auch die weiteren Verpaarungen zur Generierung von Knock-out Weibchen blieben erfolglos. Dies führte zum Ergebnis, dass Knock-out Mäuse, bei denen ERAB im gesamten Organismus ausgeschaltet wird, nicht lebensfähig sind.

5.2.1. ERAB und seine Homologie zu scully

Hinweise auf einen letalen Phänotyp zu diesem Gen sind aus Studien mit *Drosophila* bekannt (Torroja *et al.*, 1998). In diesen wird das homologe Gen zu ERAB *scully* genannt. *Scully* ist in *Drosophila* ein essentielles Gen in den frühen Phasen der Embryonalentwicklung und den folgenden Larvenstadien. Vier verschiedene Punktmutationen in diesem Gen führen zu einem letalen Phänotyp. Dabei kommt es schon durch einen einzelnen Aminosäureaustausch in der Kofaktorbindungsstelle des Gens, der Bindungsstelle für das NADH, zu einer Verminderung der Enzymaktivität. Durch das frühe Absterben der Fliegenlarven wurde für *scully* eine Rolle bei der Keimbahnbildung angenommen.

Die Homologie von ERAB und *scully* ist sehr hoch (~ 65%). Somit war ein letaler Phänotyp der ERAB Knock-out Mäuse nicht unerwartet. Da keine Knock-out Mäuse geboren wurden, wurde ein Absterben der Mausembryonen im Uterus der Mutter angenommen. Bei den Embryoanalysen ab Tag 7,5 bis 14,5 der Embryonalentwicklung konnte aber bei insgesamt 37 analysierten Embryonen kein Knock-out Tier nachgewiesen werden. Die RT-PCR-Analysen von C57Bl/6 N Embryonen am Tag 7,5 zeigten, dass ERAB in diesem frühen Stadium der

Entwicklung bereits exprimiert wird. Daher könnte das Absterben der Embryonen auch zu einem noch früheren Zeitpunkt in der Entwicklung stattfinden.

Ein weiteres sehr auffälliges Merkmal bei diesen Verpaarungen war, dass 25 Tiere ein bis zwei Tage nach der Geburt starben. Die Mäuse entsprachen jedoch Wildtypmännchen und heterozygoten Weibchen und sollten lebensfähig sein. Die Frage stellte sich nun, was der Grund für das frühe Sterben dieser Tiere war. Eine Möglichkeit wäre, dass die Knock-out Tiere durch ein Fehlen von ERAB bereits im Uterus absterben und dadurch toxische Substanzen wie Sauerstoffradikale freisetzen, die die anderen Embryonen so stark schädigen, dass diese nach der Geburt sterben.

5.2.2. Mögliche Ursachen für den letalen Phänotyp der ERAB Knock-out Mäuse

Für den embryonal letalen Phänotyp der Tiere gibt es mehrere Faktoren, die in Frage kommen könnten, da ERAB als multifunktionelles Enzym bei sehr vielen Stoffwechselwegen und bei neurologischen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt (Yan *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2000 a, b; He *et al.*, 1998; He *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2001; He *et al.*, 2002 a; Lustbader *et al.*, 2004; Tieu *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005 a). So könnte sein Fehlen im Gehirn der Embryonen mit einer peripheren neurologischen Störung verbunden sein, die eine Entwicklung der Embryonen nicht möglich macht. Bei der Alzheimer Krankheit führt die Blockierung der Enzymaktivität von ERAB durch A β zu Zellschädigungen, die mit der Apoptose der Neuronen im Gehirn verbunden ist (Yan *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2001; He *et al.*, 2002 a; Lustbader *et al.*, 2004; Takuma *et al.*, 2005). Somit wäre ein Fehlen von ERAB mit der Blockierung seiner enzymatischen Funktionen durch A β gleichzusetzen.

Durch die Expression von ERAB in den Mitochondrien besteht die Möglichkeit, dass ein Fehlen dieses Enzyms zu einer mitochondrialen Schädigung, verbunden mit dem Zelltod, führt. Da es ebenfalls in der mitochondrialen Atmungskette eine wichtige Rolle spielt (Lustbader *et al.*, 2004; Tieu *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2005; Takuma *et al.*, 2005), wären Störungen in den Komplexen der Atmungskette möglicherweise tödlich für die Embryonen. Dadurch würde es zur Sauerstoffunterversorgung der Embryonen im Uterus der Mutter kommen, was ebenso den frühen Tod der Knock-out Tiere erklären würde.

Des weiteren könnte ein Fehlen von ERAB in bestimmten Stoffwechselwegen, die der Energiegewinnung dienen, wie die mitochondriale β -Oxidation der Fettsäuren (He *et al.*, 1998; He *et al.*, 2000 a; Powell *et al.*, 2000) und die Beteiligung an der Ketonkörpersynthese als Energiequelle für das Gehirn (Yan *et al.*, 2000 a; Yan *et al.*, 2005) für den Tod der Embryonen verantwortlich sein.

In einer Studie mit dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) konnte gezeigt werden, dass der Alterungsprozess ein hormonell abhängiger Weg ist. Dieser wird durch den konservierten Insulin/IGF-1 Signalweg, gesteuert von DAF-16, einem Transkriptionsfaktor der FOXO-Familie, kontrolliert (Murphy *et al.*, 2003). DAF-16 reguliert die Expression von Genen, die den Alterungsprozess beeinflussen. Mit Hilfe von DNA Microarray Analysen konnte bestimmt werden, dass eine Reduktion in der Aktivität der kurzkettigen Dehydrogenase-Reduktase-Familie, zu denen auch das ERAB gehört, zu einer verkürzten Lebenserwartung in *C.elegans* führt.

Da ERAB in vielen Stoffwechselwegen beteiligt ist, ist es sehr schwer, die genaue Ursache für den letalen Phänotyp zu finden. Die bisher generierten und weitere zellspezifische Knock-out Linien für ERAB werden die Untersuchungen erleichtern.

5.3. Die Mauslinie ERAB/neo

5.3.1. Genexpressionsanalysen und Phänotyp der ERAB/neo Männchen

Durch die Verpaarung weiblicher Nachkommen des Chimären mit Cre deleter Mäusen wurden zum ersten Mal Männchen mit der Mutation (YX^{mut}) erhalten. Diese Männchen zeigten einen sehr stark ausgeprägten Phänotyp, obwohl noch keine Cre-vermittelte Rekombination zur Deletion des Exon 1 stattgefunden hatte. Dieser Phänotyp konnte nur durch das noch vorhandene neo-Gen entstanden sein. In der Literatur gibt es Veröffentlichungen die zeigen, dass die Insertion eines neo-Gens zu Problemen führen kann (Artelt *et al.*, 1991; Colledge *et al.*, 1995; Olson *et al.*, 1996; Byun *et al.*, 1998; DeJarnette *et al.*, 1998; Meyers *et al.*, 1998). Das neo-Gen kann nicht nur die Expression des Zielgens beeinflussen, sondern auch zu Störungen der Expression von Genen in unmittelbarer Umgebung führen. Daher ist das Entfernen des Selektionsmarkers besonders wichtig, um später eindeutige Ergebnisse, ohne Artefakte, erhalten zu können. Diese Mauslinie eignete sich jedoch sehr gut, um

Methoden und Techniken zu etablieren, die später für die zellspezifischen Knock-out Linien von ERAB benötigt wurden.

Durch Genexpressionsanalysen mit Hilfe der quantitativen Real Time PCR konnte die gestörte Genexpression in verschiedenen Organen der Tiere nachgewiesen werden. Diese äußerte sich in einer deutlichen Abnahme der Expression in Großhirn und Kleinhirn. Des weiteren war die Expression in der Leber, der Lunge, den Nieren und den Hoden vermindert. Ebenso Thymus und Lymphknoten zeigten eine reduzierte Genexpression. Nur in der Milz war eine Erhöhung zu beobachten.

Die ERAB/neo Männchen zeigten bereits in einem Alter von 11-14 Wochen die ersten Krankheitssymptome, die sich durch verlangsamtes Gehen, trübe Augen, Krämpfe und am Ende mit Bewegungsunfähigkeit äußerten. Die Tiere mussten spätestens im Alter von 24 Wochen getötet werden. Durch DNA-Analysen konnte in diesen Tieren in Milz, Niere, Hoden, Leber, Thymus, Darm und Gehirn Apoptose nachgewiesen werden.

5.3.2. Histologische Untersuchung der ERAB/neo Männchen

5.3.2.1. ERAB und seine Rolle im Androgenmetabolismus

Für weitere Untersuchungen des Phänotyps wurden histologische Untersuchungen durchgeführt. Dabei konnte eine Subfertilität dieser Männchen analysiert werden, die durch eine verminderte Anzahl an reifen Spermien in den Hoden zu erkennen war. Dieses Ergebnis erklärte, warum von diesen Männchen keine Nachkommen erhalten werden konnten.

Mäuse mit einer Azoospermie (Fehlen von beweglichen Spermien in der Samenflüssigkeit) zeigen eine deutlich höhere Expression von ERAB (Hansis *et al.*, 1998). Jedoch zeigten unsere Expressionsstudien, dass ERAB in den Hoden der ERAB/neo Männchen im Vergleich zu denen der ERAB/Flp Tiere eine verminderte Expression aufwies. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass mit zunehmendem Alter der Tiere die Menge an aktivem 17 β -HSD in den Leydig Zellen der Hoden abnimmt (Ivell *et al.*, 2003). Jedoch waren die ERAB/neo Mäuse zu Beginn der Verpaarung gerade sieben bis acht Wochen alt. Daher kann dies nicht der Grund für die fehlende Fertilität dieser Tiere sein.

In *Drosophila* führen Punktmutationen zur verminderten Hodengröße sowie zu unreifen Spermien und aberranten Mitochondrien. Die Spermien gewinnen ihre Energie aus der β -Oxidation der Fettsäuren. Da die Hoden der Fliegen eine Defizienz in der 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Aktivität, einem Enzym mit Homologien zu scully und ERAB aufweisen (Torroja *et al.*, 1998), sind Parallelen zum Phänotyp der ERAB/neo Mäuse zu erkennen. In der Literatur gibt es weitere Hinweise darauf, dass die Familie der kurzkettigen L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenasen eine Rolle im Androgenmetabolismus spielt. Als 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase ist ERAB das einzige Enzym dieser Familie, das die Oxidation des 5α -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diols (3α -adiol) zum aktiven Androgen Dihydrotestosteron (DHT) katalysiert (He *et al.*, 2000 a). Das DHT wird auch von der 5α -Reduktase im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Das ERAB könnte aber zusammen mit dieser 5α -Reduktase die wichtigste Quelle für die Synthese des DHT sein. Wird ERAB nicht mehr exprimiert, wäre dadurch eine verminderte DHT-Synthese möglich. Neuere Untersuchungen zur wichtigsten oxidativen 3α -Hydroxysteroid Dehydrogenase des Menschen zeigten jedoch, dass ERAB nur eine schwache Oxidase ist, die 3α -adiol nur oxidieren kann, wenn es in hohen Konzentrationen vorliegt (Baumann *et al.*, 2006). ERAB ist somit auf jeden Fall an der Synthese des Dihydrotestosteron beteiligt, wenn es auch nicht das Hauptenzym zur DHT-Gewinnung darstellt.

5.3.2.2. ERAB/neo Männchen haben verkleinerte Milzen

Die sehr stark verkleinerten Milzen dieser Männchen zeigten eine um das fünf-siebenfache reduzierte Zellzahl im Vergleich zu Milzen der Kontrolllinie ERAB/Flp. Das Organgewicht in Bezug auf das Körpergewicht war gegenüber C57Bl/6 N Tieren als Kontrolle verringert. Bei ERAB/neo Mäusen entsprach das Milzgewicht nur 0,16% des Körpergewichtes, wohingegen bei Kontrollen ein Milzgewicht von 0,47% zum Körpergewicht bestimmt werden konnte. In der Histologie zeigten sich bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen jedoch keine Veränderungen in der Beschaffenheit dieses Organs. Durch DNA-Analysen konnte aber eine verstärkte Apoptose in diesem Organ nachgewiesen werden.

Die Ursache für die stark verkleinerte Milz konnte in diesen Tieren noch nicht geklärt werden.

5.3.3. Der 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (MHBD)-Mangel

Bereits im Jahr 2000 wurde von einer Arbeitsgruppe der MHBD-Mangel beschrieben (Zschocke *et al.*, 2000). Das Enzym 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (MHBD) ist ein Homologes zu ERAB und im Abbauweg der verzweigtkettigen Aminosäure Isoleucin ein wichtiger Bestandteil. Isoleucin ist eine essentielle Aminosäure, bei deren Abbau ein Zwischenprodukt des Zitratzyklus entsteht, das Acetyl-CoA. Dieses Acetyl-CoA kann in der Ketonkörperbiosynthese verwendet werden. Ketonkörper sind eine wichtige Energiequelle für das Gehirn, besonders, wenn keine anderen Metabolite zur Verfügung stehen, wie z. B. in Stresssituationen oder bei mangelnder Nahrungsaufnahme. Ein weiteres Produkt des Isoleucin-Abbaus ist Propionyl-CoA, das auch beim Abbau ungeradzahlgiger Fettsäuren entsteht. Dieses kann nach seiner Umwandlung in Succinyl-CoA wieder in den Zitratzyklus eingeschleust werden. Der Zitratzyklus ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und dient der Erzeugung von Energie in Form von ATP.

Durch den MHBD-Mangel kommt es zur Anhäufung der Metabolite Tiglylglycin und MHBD im Urin der betroffenen Personen; beides sind Zwischenprodukte im Abbauweg des Isoleucins. Des weiteren haben betroffene Personen erhöhte Laktatwerte im Blut, die auf einen gestörten Energiestoffwechsel hinweisen. Ein Mangel an MHBD führt zu einer X-chromosomalen neurodegenerativen Erkrankung, die sich von einem milden bis hin zu einem progressiven Verlauf äußern kann. Dies konnte in mehreren Studien gezeigt werden (Ensenauer *et al.*, 2002; Olpin *et al.*, 2002; Sutton *et al.*, 2003; Poll-The *et al.*, 2004; Sass *et al.*, 2004; Garcia-Villoria *et al.*, 2004, 2005). Bei den betroffenen Patienten treten Entwicklungsverzögerungen mit Beeinträchtigungen der motorischen Fähigkeiten auf.

5.3.3.1. Urinalysen der ERAB/neo Männchen

Durch die beschriebenen Krankheitssymptome der Kinder mit MHBD-Mangel konnten Parallelen zu den ERAB/neo Mäusen festgestellt werden. Es wurden Urinalysen durchgeführt, um die Menge an Tiglylglycin und MHBD im Urin dieser Tiere nachweisen zu können. Doch diese Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf eine Störung des Isoleucinabbaus. Die Kontrolltiere ERAB/Flp zeigten eine fünffach höhere Konzentration an Tiglylglycin (250 mmol/mol Kreatinin) als die ERAB/neo Männchen (50 mmol/mol Kreatinin). Das MHBD, der wichtigste Metabolit,

konnte bei den Tieren leider nicht detektiert werden. Somit ist ein gestörter Isoleucin-Abbau nicht die Ursache für den Phänotyp der ERAB/neo Tiere.

5.3.3.2. Der MHBD-Mangel und seine Parallelen zur Alzheimer Krankheit

Die Mitochondrien können als Auslöser vieler neurodegenerativer Erkrankungen gesehen werden, wie z. B. der Alzheimer-, der Parkinson- oder der Huntington Krankheit. Als Ursache wurde oxidativer Stress, ausgelöst durch eine Störung in der Energieversorgung, angenommen (Beal *et al.*, 1993; Sims, 1996).

Wie bereits bei den Knock-out Tieren kurz erwähnt (siehe 5.2.2.), sind auch hier Parallelen zur Alzheimer Krankheit zu erkennen. Bei dieser Krankheit kommt es durch die Aggregation von A β im Gehirn zu neuronalen Schädigungen. Dadurch werden Sauerstoffradikale freigesetzt, die DNA fragmentiert, es kommt zu Störungen in der Atmungskette und zum Zelltod. Als Auslöser dafür wurde die Interaktion von ERAB mit A β angenommen, da A β die NAD-Bindungsstelle im Enzym blockiert und somit auch dessen Aktivität (Yan *et al.*, 1997; He *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2000 b; Yang *et al.*, 2001; He *et al.*, 2000 a; Yan *et al.*, 2005). Die Blockade der enzymatischen Aktivität von ERAB kann zur Apoptose in Neuronen führen. Ist die Bindungsstelle für A β blockiert, verringert sich auch die toxische Wirkung von A β . Diese Blockade der enzymatischen Aktivität könnte mit dem Fehlen des Enzyms gleichgesetzt werden. Somit würden die gleichen Mechanismen zum MHBD-Mangel und zur Alzheimer Krankheit beitragen.

Weitere Hinweise zur Klärung des Krankheitsbildes des MHBD-Mangels können die enzymatischen Untersuchungen von ERAB ergeben. Dazu wurden im Verlauf dieser Arbeit Ohrfibroblastenkulturen von ERAB/neo Männchen und ERAB/Flp Kontrolltieren angelegt. Diese Zellen sollen in Tests mit verschiedenen Substraten für ERAB neue Erkenntnisse zum Krankheitsbild des MHBD liefern. Da ERAB auch im Metabolismus der neuroaktiven Steroide beteiligt ist (He *et al.*, 2005 a, b), könnte eine Untersuchung der Neurosteroiden im Gehirn ebenfalls Aufschlüsse bringen.

5.4. Die Mauslinie ERAB/Tie2

5.4.1. Phänotyp der ERAB/Tie2 Knock-out Männchen

Die Tie2 transgene Mauslinie ermöglicht durch die Expression der Cre Rekombinase unter dem Tie2 Promoter eine spezifische Rekombination ausschließlich in Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen (Constien *et al.*, 2001). Durch die Verpaarung der homozygoten ERAB/Flp Tiere mit diesen Cre transgenen Mäusen konnten zellspezifische Knock-out Mäuse für ERAB generiert werden. Im weiteren Verlauf stellte sich heraus, dass die Knock-out Männchen subfertil waren, denn bei Verpaarungen mit diesen Männchen konnten keine Nachkommen erhalten werden. Des weiteren entwickelten diese Männchen im Alter von 20 Wochen einen ähnlichen Phänotyp wie die ERAB/neo Männchen, d. h. sie konnten langsamer gehen, litten unter Krämpfen und mussten spätestens im Alter von 26 Wochen getötet werden. Bei den ERAB/neo Männchen traten die ersten Krankheitssymptome bereits im Alter von 11-14 Wochen auf und die Tiere mussten spätestens im Alter von 24 Wochen getötet werden. Somit wiesen die ERAB/Tie2 Männchen einen schnelleren Krankheitsverlauf auf.

Die Untersuchung der Oberflächenmarker von T-Zellen in Thymus, Milz und Lymphknoten zeigten keine Veränderungen im Vergleich zu Kontrolltieren. Damit ist ERAB in der frühen T-Zellentwicklung im Knochenmark kein entscheidender Faktor.

Es konnte gezeigt werden, dass Knock-out Männchen, bei denen ERAB in Endothelzellen und hämatopoetischen Stammzellen ausgeschaltet ist, nicht lebensfähig sind. Auffällig ist, dass homozygote Knock-out Weibchen für ERAB/Tie2 lebensfähig sind. Bis jetzt wurden zwei dieser Weibchen geboren, die in ihrem Verhalten unauffällig sind. Eines dieser Tiere ist mittlerweile 10 Monate alt. Von diesem Tier konnten auch Nachkommen erhalten werden. Der Grund für das Überleben dieser Weibchen ist noch nicht geklärt. Damit ist dieser zellspezifische Knock-out für ERAB nur für Männchen letal.

5.4.2. Histologische Untersuchungen der ERAB/Tie2 Knock-out Männchen

Histologische Untersuchungen der ERAB/Tie2 Knock-out Männchen erbrachten die gleichen Befunde wie die der ERAB/neo Männchen. Auch die Hoden der ERAB/Tie2 Tiere zeigten eine verminderte Anzahl an reifen Spermien. Der Grund für die fehlende Fertilität wurde bereits bei den ERAB/neo Mäusen besprochen (siehe 5.3.2.1.). Die Milz dieser Tiere war ebenso stark verkleinert, histologisch jedoch unauffällig. Die Blase war ebenfalls vergrößert, auch die Blutungen im Darm waren deutlich sichtbar.

Da die Zuchterfolge mit dieser Mauslinie sehr begrenzt sind und sich der ausgeprägte Phänotyp dieser Linie erst im Alter von 5-6 Monaten zeigt, konnten bis jetzt noch nicht genügend Tiere für ausführlichere Studien erhalten werden. Jedoch konnte mit Hilfe der ERAB/neo Linie bereits einiges über den Phänotyp dieser Tiere gelernt werden. Mit der Linie ERAB/Tie2 können in weiteren Studien die Ergebnisse, die mit der ERAB/neo Linie erhalten wurden, bestätigt werden. Diese Tiere werden in Zukunft für alle Untersuchungen eingesetzt, da es sich bei dieser Knock-out Linie um eine definierte Mauslinie handelt.

5.5. Die Mauslinie ERAB/lck

Zur weiteren Untersuchung der Funktionen von ERAB im Immunsystem wurden die homozygoten ERAB/Flp Tiere mit lck Cre transgenen Mäusen verpaart. Dadurch konnten homozygote Männchen und Weibchen der Linie ERAB/lck erhalten werden, in denen das Gen in T-Lymphozyten ausgeschaltet wurde.

Das lck ist eine Proteintyrosinkinase aus der Familie der Src-Kinasen und für die Signalgebung in den T-Zellen mit verantwortlich. Diese Kinase wird bereits sehr früh in der T-Zellentwicklung exprimiert, und zwar nach der Bildung der β -Kette des T-Zellrezeptors und vor dessen Bildung der α -Kette. Aus Studien mit Knock-out Mäusen für lck ist bekannt, dass diese Tiere sowohl eine Reduktion in ihrer Thymusgröße als auch eine stark verminderte Anzahl an doppelt positiven Thymozyten zeigen (Molina *et al.*, 1992; Anderson *et al.*, 1993).

5.5.1. Die Thymusrückbildung: Analyse der Zellzahlen in den Thymi von ERAB/lck- und ERAB/Flp Tieren verschiedenen Alters

Die Thymusentwicklung ist bei Mäusen nach den ersten vier bis sechs Wochen ihres Lebens abgeschlossen. Der Thymus erreicht dabei seine maximale Größe mit der höchsten Anzahl an Thymozyten. Nach dieser Zeit kommt es zum deutlichen Gewichtsverlust dieses Organs und der Reduktion der Thymozytenneubildung, denn der Thymus ist ein Organ, das einer altersbedingten Rückbildung unterliegt (Hirokawa *et al.*, 1975; Aspinall *et al.*, 1997; Aspinall, 2000 b; Goronzy *et al.*, 2005). Als Folge werden immer weniger naive T-Zellen in den peripheren T-Zellpool ausgeschleust und es kommt zum Anstieg der Gedächtniszellen, um die Homöostase aufrecht zu erhalten (Linton *et al.*, 2004).

Bei ersten Untersuchungen der Tiere der ERAB/lck Linie zeigten sich deutliche Unterschiede in der Thymusgröße und den Thymozytenzahlen im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrolltieren der Linie ERAB/Flp. Dabei stellte sich heraus, dass die ERAB/lck Tiere im Alter von 9 Wochen im Durchschnitt eine Thymozytenzahl von $\sim 18 \times 10^7$ hatten, wohingegen diese bei den Kontrollen nur $\sim 13 \times 10^7$ betrug. Bei den Kontrollen nahm die Zellzahl in einem Altersbereich von 11-26 Wochen auf $\sim 3 \times 10^7$ ab, bei den Knock-out Tieren konnte noch eine Zellzahl von $\sim 8 \times 10^7$ nachgewiesen werden.

In einer Studie mit weiblichen Balb/c Mäusen konnte demonstriert werden, dass die Thymozytenzahl in bestimmten Altersstufen abnimmt. In Bereichen von 1-1,5 Monaten, 1,5-3 Monaten, 3-7 Monaten, im Alter von 12-18 Monaten und dann nochmals im Alter von 22-27 Monaten bleibt die Zellzahl relativ konstant (Ortman *et al.*, 2002). Ähnliche Ergebnisse wurden mit C57Bl/10 Mäusen erzielt (Aspinall, 1997). Bis jetzt wurden in der vorliegenden Arbeit nur Tiere in einem Alter von 2-6,5 Monaten analysiert. Diese zeigten eine Reduktion der Thymozytenzahlen zwischen 2 und 3 Monaten, wohingegen die Zellzahlen zwischen 3 und 6,5 Monaten relativ konstant blieben. Dies entspricht somit den Beobachtungen von Ortman *et al.* (2002) in den Balb/c Mäusen und von Aspinall (1997) in den C57Bl/10 Tieren. Um die stufenweise Abnahme der Zellzahlen in den Thymi analysieren zu können, müssen von Tieren, die 7 Monate und älter sind, die Zellzahlen noch bestimmt werden. Doch diese Tiere konnten aufgrund des Alters bis zum Ende dieser Arbeit noch nicht in ausreichender Zahl erhalten werden.

5.5.1.1. Die Thymusrückbildung und ihr Einfluss auf die Struktur des Organs

Ein weiterer wichtiger Punkt sind histologische Untersuchungen zur Beschaffenheit des Thymus von ERAB/lck Mäusen im Vergleich zu ERAB/Flp Mäusen. Möglicherweise kommt es durch die fehlende Thymusrückbildung in den Knock-out Tieren zu keinen Veränderungen in der Struktur dieses Organs. Histologisch wird die Thymusrückbildung mit einem Verlust des Kortex und keinen Veränderungen im Thymusmark beschrieben. In der Veröffentlichung von Li *et al.* (2003) konnte in den DBA/2 Mäusen sowohl bei 3 als auch 15 Monate alten Tieren eine deutliche Größenabnahme des ganzen Thymus und eine Abnahme im Verhältnis von Kortex zu Mark festgestellt werden.

Für diese Untersuchungen konnten bis zum Ende dieser Arbeit noch nicht genügend Tiere in einem Alter von 15 Monaten und älter erhalten werden. Die histologischen Analysen werden, sobald ausreichend Tiere vorhanden sind, durchgeführt.

5.5.1.2. Welche Faktoren beeinflussen die Thymusrückbildung?

Die genauen Mechanismen, die zur Rückbildung dieses Organs beitragen, sind nicht geklärt. Bei diesem Prozess ändern sich sowohl die Architektur und die Zellzusammensetzung des Thymus als auch das Thymusstroma (Mackall *et al.*, 1998). Moleküle, die Einfluss auf die Thymusrückbildung haben könnten, sind das Wachstumshormon, das IGF-1 („insulin-like growth factor-1“), der NGF („nerve growth factor“), IL-7, IL-6 und TGF- β . Ob die Expressionsänderungen dieser Moleküle jedoch die Thymusrückbildung verursachen oder die Rückbildung die Ursache für die Änderung ihrer Expressionen ist, ist nicht geklärt (Gray *et al.*, 2005). Die Thymusrückbildung ist ein intrinsischer Effekt und wird nicht durch Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ausgelöst. Dies wurde durch Analysen mit Knochenmarkschimären gezeigt, bei der die Rekonstitution älterer Mäuse mit Knochenmark junger Mäuse die Thymusrückbildung nicht aufheben konnte (Doria *et al.*, 1997; Mackall *et al.*, 1998; Aspinall, 2000 b). Der IL-7-Rezeptor wird bereits auf den frühesten Vorläuferzellen der T-Lymphozyten (CD25⁻CD44⁺) exprimiert. Die Expressionshöhe nimmt im Verlauf der Differenzierung zu reifen T-Zellen ab (Su *et al.*, 1997). Als ein möglicher Faktor für die Rückbildung dieses Organs wurde die Reduktion der IL-7 Produktion angenommen, das von den kortikalen thymischen Epithelzellen produziert wird (Aspinall *et al.*, 2000 a; Andrew *et al.*, 2002). Doch in

einer neueren Studie wurde diese Aussage revidiert, denn Philips *et al.* konnten durch die Injektion von IL-7 sekretierenden Stromazellen in Thymi von Mäusen eine Thymusrückbildung nicht verhindern (Philips *et al.*, 2004).

Des weiteren ist bekannt, dass der Anstieg der Sexualhormone eine altersbedingte Thymusrückbildung fördert. Durch Kastration kann die Rückbildung wieder aufgehoben werden, die Proliferation der Thymuszellen wird erhöht und die Differenzierung zu reifen T-Zellen gefördert (Heng *et al.*, 2005; Sutherland *et al.*, 2005). Rezeptoren für Östrogen, Androgen und Progesteron findet man sowohl auf den Thymozyten als auch den thymischen Stromazellen (Pearce *et al.*, 1983; Kawashima *et al.*, 1992; Olsen *et al.*, 2001).

Um die Frage der verzögerten Thymusrückbildung in den ERAB/lck Tieren zu klären, können Genexpressionsanalysen durchgeführt werden, die ein bestimmtes Expressionsmuster in Thymi von Mäusen verschiedenen Alters zeigen. Dies wurde bereits von Ortman *et al.* (2002) dargestellt. In dieser Arbeit wurden Gene untersucht, die sowohl bei der Entwicklung der T-Zellen vom doppelt negativen zum doppelt positiven Stadium als auch im Thymusstroma eine entscheidende Rolle spielen. Damit könnte durch unterschiedliche Genexpressionsmuster eine verzögerte Thymusrückbildung sowie Änderungen im Expressionsmuster der T-Zellpopulationen in ERAB/lck Tieren charakterisiert werden.

5.5.1.2.1. Glucocorticoide und ihr Einfluss auf die Thymusrückbildung

Ein weiterer Faktor in diesem Prozess könnten Glucocorticoide sein. Diese spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung, der Differenzierung, der Homöostase und der Apoptose von T-Zellen (King *et al.*, 1995; Ashwell *et al.*, 1996; Ashwell *et al.*, 2000; Vacchio *et al.*, 2000; Pazirandeh *et al.*, 2002; Brewer *et al.*, 2002; Distelhorst, 2002; Schmidt *et al.*, 2004). Während basale Glucocorticoidmengen möglicherweise für das Wachstum und für die Homöostase der Thymozyten verantwortlich sind, führt eine erhöhte Menge, ausgelöst z. B. durch Stressreaktionen, zur Apoptose. Während des Alterns kommt es zum graduellen Verlust der Glucocorticoid-Synthese in den thymischen Epithelzellen. Dies könnte ein Beitrag zur Thymusrückbildung sein (Jondal *et al.*, 2004). Das endogene Glucocorticoide die altersbedingte Rückbildung verzögern, wurde in einer Studie mit transgenen Mäusen gezeigt, die eine Überexpression des Glucocorticoidrezeptors auf ihren T-Zellen haben. Bei älteren Tieren (> 5 Monate) konnte eine verzögerte Thymusrückbildung sowie eine erhöhte

Anzahl an Thymozyten gefunden werden (Pazirandeh *et al.*, 2004). Ein Einfluss auf das Apoptoseverhalten der Thymozyten wurde nicht beobachtet.

Bereits in einer Veröffentlichung von Vacchio *et al.* (1994) wurde gezeigt, dass thymische Epithelzellen steroidaktive Enzyme exprimieren. In späteren Studien konnten dann die Enzyme identifiziert werden, die Cholesterol in Corticosteron umwandeln. Somit sind die Epithelzellen des Thymus selbst in der Lage, Glucocorticoide zu synthetisieren. Bei der Synthese der endogenen Glucocorticoide des Thymus ist auch das Enzym 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (3 β -HSD) beteiligt (Pazirandeh *et al.*, 1999; Lechner *et al.*, 2000), das ein ähnliches Mitglied der Familie der Hydroxysteroid Dehydrogenasen ist wie ERAB (17 β -HSD) (Yan *et al.*, 2005). Die 3 β -HSD kann sowohl Pregnenolon in Corticosteron als auch 17 α -Hydroxypregnenolon in Cortisol umwandeln. Auf der Suche nach neuen Substratspezifitäten sowohl für die humane 17 β -HSD als auch für die von *Drosophila* (scully) konnte eine 20 β -OH und 21 β -OH Dehydrogenase-Aktivität mit C₂₁-Steroiden beobachtet werden. Daher wurde für die 17 β -HSD eine allgemeine Rolle bei der Kontrolle der Progesteron- und Glucocorticoidhormonmengen vorgeschlagen (Shafqat *et al.*, 2003). Somit könnte ein Fehlen von ERAB zu einer gestörten Glucocorticoidproduktion im Thymus führen und dadurch die Thymusrückbildung verzögert oder sogar aufgehoben sein.

Zur Aufklärung der endogenen Glucocorticoidproduktion im Thymus können die Corticosteronmengen im Serum dieser Tiere mit Hilfe eines Radioimmunoassays bestimmt werden. Dann würde sich zeigen, ob die 3 β -HSD eine ausreichende Homologie zu ERAB hat, um für die Glucocorticoidproduktion im Thymus verantwortlich zu sein.

5.5.2. Analyse der Oberflächenmarker

5.5.2.1. Verteilung der T-Zellpopulationen in den Thymi von ERAB/lck- und ERAB/Flp Mäusen

Der Großteil der T-Zellen im Thymus gehört zur Population der doppelt positiven Thymozyten, d. h. der $CD4^+CD8^+$ T-Zellen. Durch die Analyse der Oberflächenmarker der Thymozyten von ERAB/lck- und ERAB/Flp Tieren wurden die Verhältnisse der $CD4^+/CD8^+$ T-Zellen in den Thymi verschieden alter Mäuse (2, 6 und 7 Monate) untersucht. Dabei konnten keine Unterschiede in diesen T-Zellpopulationen festgestellt werden, weder in den verschiedenen Altersstufen noch zwischen den beiden Mauslinien.

Untersuchungen der einzelnen T-Zellpopulationen in Thymi von C57Bl/10 Mäusen zeigten, dass es im Alter zwischen 3 und 20 Monaten zur Reduktion der Thymozytenzahl um 83% kommt. Die größte Veränderung zeigt sich dabei in der $CD4^+CD8^+$ Population (Aspinall 1997; Aspinall, 2000 a). Daher muss der Grund für die verminderte Zahl an doppelt positiven Thymozyten innerhalb oder vor der Bildung der $CD4^+CD8^-$ Population liegen. In älteren Tieren konnte eine Reduktion in der Zahl der $CD25^+CD44^+$ und der $CD25^+CD44^-$ Vorläuferzellen gefunden werden. Dadurch kommt es zum Anstieg der $CD25^-CD44^+$ Zellen in der doppelt negativen T-Zellpopulation in älteren Tieren und zur Störung in der Differenzierung der T-Zellen (Thoman *et al.*, 1995; Aspinall, 1997; Mackall *et al.*, 1997; Thoman, 1997; Lacorazza *et al.*, 1999; Aspinall, 2000 a). In jüngeren Tieren hingegen exprimieren viele doppelt negativen Zellen CD25, d. h. sie sind in der Lage, sich von Vorläuferzellen zu prä-T-Zellen zu entwickeln (Thoman, 1997). Die $CD25^-CD44^+$ T-Zellen zeigen in älteren Tieren eine verminderte Proliferations- und höhere Apoptoserate (Min *et al.*, 2004).

Eine mögliche Ursache für die erhöhte Zellzahl in den Thymi der Knock-out Mäuse könnte somit auch eine vermehrte Anzahl an noch vorhandenen Vorläuferzellen in diesem Organ sein. Die Analyse dieser Vorläuferzellen anhand der CD25- und CD44 Expression gaben jedoch keine Hinweise auf die erhöhte Zellzahl in den Thymi der ERAB/lck Tiere, da diese Mäuse prozentual die gleiche Anzahl an Vorläuferzellen in ihren Thymi hatten wie die Thymi der Kontrollen, und das in allen drei untersuchten Altersstufen (2, 6 und 7 Monate). Somit wiesen die Knock-out Tiere insgesamt nur eine höhere Zellzahl in ihren Thymi, im Vergleich zu den Thymi der ERAB/Flp Tiere, auf, die aber keine Änderungen im Verhältnis der einzelnen T-Zellpopulationen verursachte. Jedoch könnte hier wiederum das Alter der analysierten Tiere ein Grund

dafür sein, dass keine Unterschiede zwischen den beiden Linien gefunden werden konnten. Denn deutliche Unterschiede in den Thymozytenpopulationen werden, wie anhand der veröffentlichten Daten verdeutlicht wurde, erst zu einem viel späteren Zeitpunkt sichtbar. Daher werden diese Analysen nochmals mit älteren, genetisch definierten Tieren durchgeführt. Die Tiere werden dazu auf den C57Bl/6 N Hintergrund zurückgekreuzt.

5.5.2.2. Verteilung der T-Zellpopulationen in der Peripherie von ERAB/lck- und ERAB/Flp Mäusen

Die Konsequenz der altersbedingten Thymusrückbildung ist die Reduktion im Export von naiven T-Zellen aus dem Thymus in die Peripherie (Scollay *et al.*, 1980; Berzins *et al.*, 1998; Aspinall *et al.*, 2000 b). Doch trotz der fehlenden naiven T-Zellen bleibt die Anzahl der T-Zellen in der Peripherie konstant. Dieser T-Zellpool unterliegt einem homöostatischen Kontrollmechanismus, dem eine Umverteilung in der Zusammensetzung der T-Zellpopulationen zugrunde liegt. Dabei kommt es zum Anstieg der Gedächtniszellen. Der periphere T-Zellpool setzt sich somit aus den naiven T-Zellen und den Gedächtniszellen zusammen (Freitas *et al.*, 1993; Ernst *et al.*, 1993; Tanchot *et al.*, 1995; Aspinall *et al.*, 2000 a) .

Als mögliche Ursache für die erhöhte Zellzahl in den Thymi der Knock-out Mäuse wurde eine verminderte Zahl an T-Zellen vermutet, die in die Peripherie einwandert. Daher müsste es in der Peripherie zu einem Anstieg der Population der Gedächtniszellen kommen, um die Homöostase aufrecht zu erhalten. Durch die Untersuchungen der Gedächtniszellen auf ihre Oberflächenmarker CD44 und CD62L wurde keine erhöhte Anzahl an Gedächtniszellen in den ERAB/lck Tieren nachgewiesen.

5.5.3. ERAB in der Apoptose

Zur Analyse der Funktion von ERAB in der Apoptose von T-Lymphozyten wurden zwei Wege zur Apoptoseinduktion eingesetzt. Der erste war der intrinsische Weg, der über die Mitochondrien verläuft und durch Glucocorticoide ausgelöst werden kann. Der zweite war der extrinsische Weg über den Todesrezeptor CD95, ausgelöst durch den Liganden des Rezeptors.

5.5.3.1. ERAB und seine Rolle in der durch Glucocorticoide ausgelösten Apoptose

Bei der durch das Glucocorticoid Dexamethason ausgelösten Apoptose zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Apoptoserate der Thymozyten der beiden Mauslinien ERAB/lck und ERAB/Flp. Die T-Zellen der Knock-out Tiere waren sehr viel sensibler gegenüber diesem Zelltod als die Kontrollen. Im Durchschnitt überlebten nach 22 Stunden Dexamethasonbehandlung ~ 49% der T-Zellen der ERAB/Flp Linie, jedoch nur ~ 7% der T-Zellen der Knock-out Tiere. Durch Analysen dieser Mauslinien in verschiedenen Altersstufen (11, 15, 19 Wochen) konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt unabhängig vom Alter der Tiere ist.

An der durch die Mitochondrien vermittelten Apoptose ist die PT-Pore („Permeability Transition Pore“) beteiligt, die aus dem Adeninnukleotidtransporter ANT und dem spannungsabhängigen Anionenkanal VDAC, an den das Cyclophilin D binden kann, besteht. Des weiteren kann das pro-apoptotische Molekül Bax, ein Mitglied der Bcl-2 Familie, an den VDAC binden (Shimizu *et al.*, 1999; Narita *et al.*, 1998; Sharpe *et al.*, 2004; Zoratti *et al.*, 2005). Als Inhibitor der PT-Pore wurde Cyclosporin A, ein Immunsuppressivum angenommen. Cyclosporin A bindet an Cyclophilin D und blockiert so die Pore, indem es die Bindung des Cyclophilin D an den ANT verhindert (Connern *et al.*, 1992; Pacher *et al.*, 2001; Waldmeier *et al.*, 2003; Forte *et al.*, 2005). Ein möglicher Mechanismus für ERAB und seine Funktion in der Apoptose wurde erst kürzlich in einer Veröffentlichung diskutiert. Dabei wurde angenommen, dass ERAB an ein Mitglied der PT-Pore, nämlich dem Cyclophilin D, binden und dadurch die Apoptose verhindern kann. Durch diese Bindung wird das Cyclophilin D daran gehindert, von der mitochondrialen Matrix zur inneren Mitochondrienmembran zu translozieren. Dadurch ist es nicht in der Lage, mit anderen Komponenten der PT-Pore zu interagieren und die Mitochondrien zu destabilisieren (Yan *et al.*, 2005) (siehe Abb. 2). Diese Hypothese bestätigt die Ergebnisse mit den ERAB/lck Mäusen,

bei denen durch die Behandlung der Thymozyten mit dem Glucocorticoid Dexamethason verstärkt Apoptose ausgelöst wurde. Durch das Fehlen von ERAB kann es zur Destabilisierung der Mitochondrienmembran durch Cyclophilin D kommen, was zur Apoptose führt. Auch in den ERAB/neo Tieren konnte in einigen Organen durch eine verminderte ERAB-Expression bereits Apoptose nachgewiesen werden (siehe 5.3.1.).

In kürzlich veröffentlichten Studien wurde die Rolle des Cyclophilin D an der PT-Pore genauer untersucht. Durch die Generierung von Cyclophilin D Knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass Cyclophilin D und die Öffnung der Pore zur Vermittlung des durch Calcium- und oxidativem Stress vermittelten nekrotischen Zelltodes benötigt werden. Die Cyclophilin Defizienz verhindert in Fibroblasten einerseits die durch Calcium und oxidativem Stress induzierte Cytochrom c-Freisetzung und andererseits die durch diese Stimuli ausgelöste Nekrose. (Nakagawa *et al.*, 2005; Baines *et al.*, 2005; Basso *et al.*, 2005; Schinzel *et al.*, 2005; Tsujimoto *et al.*, 2006).

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Cyclophilin D vor Apoptose schützen kann (Lin *et al.*, 2002; Schubert *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Basso *et al.*, 2005). Der Mechanismus ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Lin *et al.* (2002) zeigten, dass CypD durch seine enzymatischen Eigenschaften als Peptidyl-Prolyl-Isomerase den apoptotischen Zelltod unterdrücken kann. Jedoch weisen die Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe auf einen Peptidyl-Prolyl-Isomerase unabhängigen Mechanismus hin (Schubert *et al.*, 2004; Basso *et al.*, 2005). Des weiteren stabilisiert CypD die mitochondrial gebundene Hexokinase II, was den anti-apoptotischen Effekt noch verstärkt. Durch die Bindung der Hexokinase II an den VDAC kommt es zur Inhibierung der Bindung von Bax an den VDAC und damit wird Apoptose verhindert (Pastorino *et al.*, 2002; Lucken-Ardjomande *et al.*, 2005; Machida *et al.*, 2006).

Cyclophilin D zeigt somit immer mehr Merkmale, die für einen nekrotischen Zelltod sprechen. Jedoch wird eine Beteiligung an der Apoptose nicht ausgeschlossen. Ist die Öffnung der Pore nur transient, wird die ATP-Produktion aufrechterhalten und die Zellen sterben durch Apoptose. Bleibt die Pore jedoch offen, wird das ATP zerstört und die Zellen sterben durch Nekrose (Halestrap, 2005). In weiteren Studien konnte auch gezeigt werden, dass es während des Alterns zu einer vermehrten Öffnung der PT-Pore in Lymphozyten kommt (Mather *et al.*, 2000; Crompton *et al.*, 2004).

Auch die Rolle des ANT an der PT-Pore wurde weiter untersucht. Dabei konnte in isolierten Mitochondrien ohne ANT ebenso eine Cytochrom c-Freisetzung beobachtet werden. Jedoch war eine höhere Calciumkonzentration dazu notwendig als in ANT-haltigen Mitochondrien (Kokoszka *et al.*, 2004).

Eine Möglichkeit, um die Bindung des ERAB an Cyclophilin D zu bestätigen, würde sich aus Analysen von Verpaarungen der ERAB/Flp Tiere mit CypD-defizienten Mäusen ergeben.

5.5.3.2. ERAB und seine Rolle in der durch CD95-Ligand ausgelösten Apoptose

Die Rolle der Mitochondrien im CD95-vermittelten Weg der Apoptose wurde lange diskutiert. Möglicherweise sind alle Formen der Apoptose von einer Aktivierung der Mitochondrien abhängig (Marchetti *et al.*, 1996; Kroemer *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass es zwei verschiedene Wege der CD95-vermittelten Apoptose gibt, die von der Menge der aktiven Caspase 8 am DISC abhängig sind. In sogenannten Typ I Zellen führt eine hohe Menge an aktivierter Caspase 8 am DISC zur Aktivierung der Effektorcaspase 3 und zur Apoptose der Zellen. In Typ II Zellen wird nur eine geringe Menge an Caspase 8 am DISC produziert und somit auch nur eine kleine Menge davon aktiviert. Daher ist die Apoptose in diesen Zellen von der Bcl-2-Familie abhängig (Strasser *et al.*, 1995; Scaffidi *et al.*, 1998) .

Thymozyten werden den Typ I Zellen zugeordnet und somit war die ausgelöste Apoptose in den Thymozyten der ERAB/lck Knock-out Mäuse über den CD95-Todesrezeptor nicht mitochondrienabhängig. In der über den extrinsischen Weg ausgelösten Apoptose durch den Todesrezeptor CD95 konnten keine Unterschiede in der Apoptoserate der Thymozyten zwischen den beiden Linien ERAB/lck und ERAB/Flp festgestellt werden.

5.6. Ausblick

Da bereits Punktmutationen von *sucly*, dem homologen Gen zu ERAB („endoplasmic reticulum-associated amyloid β -peptide binding protein“) in *Drosophila* zu einem letalen Phänotyp führen, war dieser auch in kompletten Knock-out Mäusen für ERAB nicht unerwartet. Die in der Arbeit generierten konditionalen Knock-out Mäuse für dieses Gen erlaubten jedoch die Untersuchung seiner Funktionen in definierten Zellen und Geweben des Organismus.

Die T-zellspezifischen Knock-out Tiere für ERAB sind in Bezug auf die Untersuchung von Autoimmunerkrankungen, bei denen Mechanismen, die zum Zelltod autoreaktiver T-Zellen führen, außer Kraft gesetzt sind, besonders interessant. In dieser Arbeit haben wir erste Hinweise erhalten, dass ERAB Apoptose in Thymozyten, ausgelöst durch das Glucocorticoid Dexamethason, verhindern kann. In weiteren Experimenten werden nun die T-Zellen in der Peripherie in Bezug auf die Apoptose und den aktivierungsinduzierten Zelltod sowie auf die Expansion und Kontraktion nach einer Antigenstimulation untersucht.

Die erhaltenen ERAB/*Tie2* Knock-out Mäuse sind für die klinische Forschung von großer Bedeutung, da sie neue Erkenntnisse zu neurologischen Krankheiten wie der Alzheimer- und Parkinson Krankheit liefern und zur Aufklärung des 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (MHBD)-Mangels beitragen könnten. Des weiteren ergeben sich mit den kürzlich etablierten Gehirn-spezifischen Knock-out Mäusen für ERAB neue Möglichkeiten, diese Krankheiten genauer zu untersuchen.

Die in dieser Arbeit generierte Mauslinie ERAB/*Flp* ist besonders wertvoll, da sie als Ausgangslinie für alle weiteren Verpaarungen mit zellspezifischen Cre deleter Linien eingesetzt und dadurch ERAB in vielen weiteren Zelltypen untersucht werden kann.

Literaturverzeichnis

Abuin, A., Bradley, A. (1996). Recycling selectable markers in mouse embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Biology* **16**: 1851-1856.

Adamski, J., Jakob, F.J. (2001). A guide to 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology* **171**: 1-4.

Akagi, K., Sandig, V., Vooijs, M., Van der Valk, M., Giovannini, M., Strauss, M. and Berns, A. (1997). Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic Acids Research* Vol. **25**, No. **9**: 1766-1773.

Akira, S. (2003). Mammalian Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology* **15**: 5-11.

Amsterdam, A., Tajima, K., Sasson, R. (2002). Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. *Biochemical Pharmacology* **64**: 843-850.

Anderson, S.J., Levin, S.D. and Perlmutter, R.M. (1993). Protein tyrosine kinase p56lck controls allelic exclusion of T-cell receptor beta-chain genes. *Nature* **365**: 552-554.

Andreeva, L., Heads, R. and Green, C.J. (1999). Cyclophilins and their possible role in stress response. *International Journal of Experimental Pathology* **80**: 305-315.

Andrew, D., Aspinall, R. (2002). Age-associated thymic atrophy is linked to a decline in IL-7 production. *Experimental Gerontology* **37**: 455-463.

Arnold, B., Schönrich, G. and Hämmerling, G.J. (1993). Multiple levels of peripheral tolerance. *Immunology Today* Vol. **14**, No. **1**: 12-14.

Artelt, P., Grannemann, R., Stocking, C., Friel, J., Bartsch, J. and Hauser, H. (1991). The prokaryotic neomycin-resistance-encoding gene acts as a transcriptional silencer in eukaryotic cells. *Gene* **99**: 249-254.

Ashwell, J.D., King, L.B., Vacchio, M.S. (1996). Cross-Talk between the T Cell Antigen Receptor and the Glucocorticoid Receptor Regulates Thymocyte Development. *Stem Cells* **14**: 490-500.

Ashwell, J.D., Lu, F.W.M., and Vacchio, M.S. (2000). Glucocorticoids in T Cell Development And Function. *Annual Review of Immunology* **18**: 309-345.

Aspinall, R. (1997). Age-Associated Thymic Atrophy in the Mouse Is Due to a Deficiency Affecting Rearrangement of the TCR During Intrathymic T Cell Development. *Journal of Immunology* **158** (7): 3037-3045.

Aspinall, R., Andrew, D. (2000 a). Thymic atrophy in the mouse is a soluble problem of the thymic environment. *Vaccine* **18**: 1629-1637.

Aspinall, R., Andrew, D. (2000 b). Thymic involution in aging. *Journal of Clinical Immunology* **20**: 250-6.

Auerbach, W., Dunmore, J.H., Fairchild-Huntress, V., Fang, Q., Auerbach, A.B., Huszar, D., and Joyner, A.L. (2000). Establishment and chimera analysis of 129/SvEv- and C57Bl/6-derived mouse embryonic stem cell lines. *Biotechniques* **31**: 1022-1024.

Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn II, G.W., Robbins, J. & Molkentin, J.D. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*, **Vol. 434**: 658-662.

Banner, D.W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H.J., Broger, C., Loetscher, H., and Lesslauer, W. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF β complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* **73**: 431-445.

Basso, E., Fante, L., Fowlkes, J., Petronilli, V., Fortes, M.A., and Bernardi, P. (2005). Properties of the Permeability Transition Pore in Mitochondria Devoid of Cyclophilin D. *The Journal of Biological Chemistry*, **Vol. 280, No.19**: 18558-18561.

Baumann, D.R., Steckelbroeck, S., Williams, M.V., Peehl, D., and Penning, T. M. (2006). Identification of the major oxidative 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase in human prostate that converts 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol to 5 α -dihydrotestosterone: A potential therapeutic target for androgen dependent disease. *Molecular Endocrinology* **20**: 444-458.

Beal, M.T., Hyman, B.T., and Koroshetz, W. (1993). Do effects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative disease? *Trends in Neuroscience* **16**: 125-131.

Beato, M. (1991). Transcriptional control by nuclear receptors. *FASEB Journal* **5**: 2044-51.

Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* **83**: 851-57.

Berki, T., Palinkas, L., Boldizsar, F., Nemeth, P. (2002). Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *International Immunology* **14**: 463-469.

Bernardi, P., Veronese, P., and Petrollini, V. (1993). Modulation of the Mitochondrial Cyclosporin A-sensitive Permeability Transition Pore. *The Journal of Biological Chemistry* **268 (2)**: 1005-1010.

Berzins, S.P., Boyd, R.L., and Miller, F.A.P. (1998). The role of the thymus and recent thymic migrants in the maintenance of the adult peripheral lymphocyte pool. *Journal of Experimental Medicine* **187**: 1839-1848.

Beyreuther, K., and Masters, C.L. (1997). The ins and outs of amyloid- β . *Nature*, Vol. **389**: 677-678.

Bhandoola, A. and Sambandam, A. (2006). From stem cell to T cell: one route or many? *Nature Reviews Immunology* Vol. **6**: 117-127.

Blomquist, C.H. (1995). Kinetic analysis of enzymatic activities: prediction of multiple forms of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **55**: 515-524.

Bockamp, E., Maringer, M., Spangenberg, C., Fees, S., Fraser, S., Eshkind, L., Oesch, F., and Zabel, B. (2002). Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiological Genomics* **11**: 115-132.

Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G., and Thompson, C.B. (1993). bcl-xL, a bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* **74**: 597-608.

Boise, L.H., Noel, P. and Thompson, C.B. (1995 a). CD28 and apoptosis. *Current Opinion in Immunology* **7**: 620-625.

Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M.A., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (1995 b). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-X_L. *Immunity* **3**: 87-98.

Bommhardt, U., Beyer, M., Hünig, T. and Reichardt, H.M. (2004). Molecular and cellular mechanisms of T cell development. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**: 263-280.

Bouneaud, C., Kourilsky, P., and Bousso, P. (2000). Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* **13**: 829-840.

Brewer, J.A., Kanagawa, O., Sleckman, B.P., and Muglia, L. (2002). Thymocyte Apoptosis Induced by T Cell Activation Is Mediated by Glucocorticoids In Vivo. *Journal of Immunology* **169** (4): 1837-1843.

Brocard, J., Warot, X., Wendling, O., Messaddeq, N., Vonesch, J.L., Chambon, P., and Metzger, D. (1997). Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 14559-14563.

Buchholz, F., Ringrose, L., Angrand, P.O., Rossi, F., Stewart, A.F. (1996). Different thermostabilities of Flp and Cre recombinases. Implications for applied site-specific recombination. *Nucleic Acids Research* **24** (21): 4256-4262.

Buchholz, F., Angrand, P.O., and Stewart, A.F. (1998). Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nature Biotechnology* **16**: 657-662.

Buchholz, F., Bishop, J.M. (2001). LoxP-Directed Cloning: Use of Cre Recombinase as a universal Restriction Enzyme. *Biotechniques* **31** (4): 906-918.

Byun, J., Kim, J. M., Robbins, P. D. and Kim, S. (1998). The selectable marker neo gene down-regulates gene expression from retroviral vectors containing an internal ribosome entry site. *Gene Therapy* **5** (10): 1441-4.

Capecchi, M.R. (1989 a). Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244** (4910): 1288-1292.

Capecchi, M.R. (1989 b). The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends in Genetics* **5** (3): 70-76.

Chang, B.H., Liao, W., Li, L., Nakamuta, M., Mack, D., and Chan, L. (1999). Liver-specific inactivation of the abetalipoproteinemia gene completely abrogates very low density lipoprotein/low density lipoprotein production in a viable conditional knockout mouse. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 6051-6055.

Chao, D.T., Korsmeyer, S.T. (1998). Bcl-2 family: regulators of cell death. *Annual Review of Immunology* **16**: 395-419.

Cohen, P.L., Eisenberg, R.A. (1991). Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annual Review of Immunology* **9**: 243-269.

Cole, T.J., Blendy, J.A., Monaghan, A.P., Krieglstein, K., Schmid, W., Aguzzi, A., Fantuzzi, G., Hummler, E., Unsicker, K. and Schütz, G. (1995). Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes and Development* **9**: 1608-1621.

Cole, T.J., Myles, K., Purton, J.F., Brereton, P.S., Solomon, N.M., Godfrey, D.I., Funder, J.W. (2001). GRKO mice express an aberrant dexamethasone-binding glucocorticoid receptor, but are profoundly glucocorticoid resistant. *Molecular and Cellular Endocrinology* **173**: 193-202.

Colledge, W.H., Abella, B.S., Southern, K.W., Ratcliff, R., Jiang, C., Cheng, S.H., MacVinish, L.J., Anderson, J.R., Cuthbert, A.W. and Evans, M.J. (1995). Generation and characterization of a $\Delta F508$ cystic fibrosis mouse model. *Nature Genetics* **10**: 445-452.

Connern, C.P. and Halestrap, A.P. (1992). Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin. *Biochemical Journal* **284**: 381-385.

Connern, C.P. and Halestrap, A.P. (1994). Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel. *Biochemical Journal* **302**: 321-324.

Constien, R., Forde, A., Liliensiek, B., Gröne, H.J., Nawroth, P., Hämmerling, G.J., and Arnold, B. (2001). Characterization of a novel EGFP reporter mouse to monitor Cre recombination as demonstrated by a Tie2 Cre mouse line. *Genesis* **30**: 36-44.

Costantini, F., Lacey, E. (1981). Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line. *Nature* **294 (5836)**: 92-94.

Crompton, M., Virji, S., Ward, J.M. (1998). Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *European Journal of Biochemistry* **258**: 729-735.

Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochemical Journal* **341**: 233-249.

Crompton, M. (2004). Mitochondria and aging: a role for the permeability transition? *Aging Cell* **3**: 3-6.

Danial, N.N. and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell Death: Critical Control Points. *Cell*, Vol. **116**: 205-219.

Dauer, W. and Przedborski, S. (2003). Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron*, Vol. **39**: 889-909.

Davis, M.M., and Bjorkman, P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* **334**: 395-402.

DeJarnette, J.B., Sommers, C.L., Huang, K., Woodside, K.J., Emmons, R., Katz, K., Shores, E.W. and Love, P.E. (1998). Specific requirement for CD3epsilon in T cell development. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* **95 (25)**: 14909-14.

Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., and Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nature Immunology* **2**: 1032-1039.

Distelhorst, C.W. (2002). Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **9**: 6-19.

Doria, G., Mancini, C., Utsuyama, M., Frasca, D., Hirokawa, K. (1997). Aging of the recipients but not of the bone marrow donors enhances autoimmunity in syngeneic radiation chimeras. *Mechanisms of Ageing and Development* **95 (12)**: 131-42.

Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* **68**: 383-424.

Eaton, S., Bartlett, K., Pourfarzam, M. (1996). Mammalian mitochondrial β -oxidation. *Biochemical Journal* **320**: 345-357.

Ensenauer, R., MD, Niederhoff, H., MD, Ruiter, J.P.N., Wanders, R.J.A., PhD, Schwab, K.O., MD, Brandis, M., MD, and Lehnert, W., PhD (2002). Clinical Variability in 3-Hydroxy-2-Methylbutyryl-CoA Dehydrogenase Deficiency. *Annals of Neurology*, Vol. **51**, No. **5**: 656-659.

Ernst, D.N., Weigle, W.O., Noonan, D.J., McQuitty, D.N., and Hobbs, M.V. (1993). The age-associated increase in IFN- γ synthesis by mouse CD8⁺ T cells correlates with shifts in the frequencies of cell subsets defined by membrane CD44, CD45RB, 3G11, and MEL-14 expression. *Journal of Immunology* **151**: 575.

Ernst, B., Lee, D.S., Chang, J.M., Sprent, J., Surh, C.D. (1999). The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* **11**: 173-181.

Fedorov, L.M., Haegel-Kronenberger, H. and Hirchenhain, J. (1997). A comparison of the germline potential of differently aged ES cell lines and their transfected descendants. *Transgenic Research* **6**: 223-231.

Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., and Chambon, P. (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 10887-10890.

Ferber, I., Schönrich, G., Schenkel, J., Mellor, A.L., Hämmerling, G.J. and Arnold, B. (1994). Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science* **263**: 674-676.

Ferri, K.F., and Kroemer, G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology* **3**: E255-E263.

Fisher, G.H., Rosenberg, F.J., Strauss, S.E., Dale, J.K., Middleton, L.A., Lin, A.Y., Strober, W., Lenardo, M.L., and Puck, J.M. (1995). Dominant Interfering Fas Gene Mutations Impair Apoptosis in a Human Autoimmune Lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**: 935-946.

Fleisher, T.A., Puck, J.M., Strober, W., Dale, J.K., Lenardo, M.J., Siegel, R.M., Straus, S.E., Bleesing, J.J. (2001). The autoimmune lymphoproliferative syndrome. A disorder of human lymphocyte apoptosis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* **20** (1): 109-120.

Forde, A., Constien, R., Gröne, H.J., Hämmerling, G., and Arnold, B. (2002). Temporal Cre-Mediated Recombination Exclusively in Endothelial Cells Using Tie2 Regulatory Elements. *Genesis* **33**: 191-197.

Forte, M. and Bernardi, P. (2005). Genetic Dissection of the Permeability Transition Pore. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, Vol. **37**, No. **3**: 121-128.

Fowlkes, B.J. and Ramsdell, F. (1993). T-cell tolerance. *Current Opinion in Immunology* **5** : 873-879.

- Frackowiak, J., Mazur-Kolecka, B., Kaczmarksi, W., Dickson, D. (2001).** Deposition of Alzheimer's vascular amyloid- β is associated with decreased expression of brain L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase (ERAB). *Brain Research* **907**: 44-53.
- Frank, M.M., Fries, L.F. (1991).** The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunology Today* **12**: 322-326.
- Fraser, J.D., Irving, B.A., Crabtree, G.R., and Weiss, A. (1991).** Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* **244**: 460-463.
- Freitas, A.A. and Rocha, B.B. (1993).** Lymphocyte lifespans: homeostasis, selection and competition. *Immunology Today* **14**: 25.
- Fuhrmann-Benzakein, E., Garcia-Gabay, I., Pepper, M.S., Vassalli, J.D., and Herrera, P.L. (2000).** Inducible and irreversible control of gene expression using a single transgene. *Nucleic Acids Research* **28**: E99.
- Fung-Leung, W.P. and Mak, T.W. (1992).** Embryonic stem cells and homologous recombination. *Current Opinion in Immunology* **4**: 189-194.
- Furuta, S., Kobayashi, A., Miyazawa, S., Hashimoto, T. (1997).** Cloning and expression of cDNA for a newly identified isozyme of bovine liver 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and its import into mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* **1350**: 317-324.
- Garcia-Villoria, B.A., Ofman, R., Navarro-Sastre, A., Ramos, J., Ruiz-Echarri, M.P., Wanders, R.J.A., Ribes, A. (2004).** Clinical and biochemical variability in three female patients with 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Diseases* **27**: Suppl 1:83.
- Garcia-Villoria, J., Ofman, R., Sala, P.R., Merinero, B., Ramos, J., Garcia-Silva, M.T., Beseler, B., Dalmau, J., Wanders, R.J.A., and Ugarte, M. (2005).** 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase (MHBDD) Deficiency: An X-linked Inborn Error of Isoleucine Metabolism that May Mimic a Mitochondrial Disease. *Pediatric Research*, Vol. **58**, No. **3**: 488-491.
- Germain, R.N. (2002).** T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nature Reviews Immunology* **2**: 309-322.
- Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993).** A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3⁺CD4⁺CD8⁻ triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *Journal of Immunology* **150**: 4244-4252.
- Godfrey, D.I., Kennedy, J., Mombaerts, P., Tonegawa, S., and Zlotnik, A. (1994).** Onset of TCR β -expression during CD3⁺CD4⁺CD8⁻ thymocyte differentiation. *Journal of Immunology* **152**: 4783-4792.

Goldrath, A.W., Sivakumar, P.V., Glaccum, M., Kennedy, M.K., Bevan, M.J., Benoist, C., Mathis, D., and Butz, E.A. (2002). Cytokine requirements for acute and basal homeostatic proliferation of naïve and memory CD8⁺ T cells. *Journal of Experimental Medicine* **195**: 1515-1522.

Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., and Ruddle, F.H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**: 7380-7384.

Goronzy, J. and Weyand, C.M. (2005). T cell development and receptor diversity during aging. *Current Opinion in Immunology* **17**: 468-475.

Gossen, M., Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 5547-5551.

Gray, D.H.D., Ueno, T., Chidgey, A.P., Malin, M., Goldberg, G.L., Takahama, Y. and Boyd, R.L. (2005). Controlling the thymic microenvironment. *Current Opinion in Immunology* **17**: 137-143.

Green, D.R. and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309-1312.

Green, D.R., and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**: 626-629.

Gross, A., McDonnell, J.M. and Korsmeyer, S.J. (1999). Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes and Development* **13**: 1899-1911.

Gruber, J., Sgonc, R., Hu, Y.H., Beug, H., Wick, G. (1994). Thymocyte apoptosis induced by elevated endogenous corticosterone levels. *European Journal of Immunology* **24**: 1115-21.

Gu, H., Marth, J.D., Orban, P.C., Mossmann, H., Rajewsky, K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* **265** (5168): 103-106.

Hämmerling, G.J., Vogt, A.B., and Kropshofer, H. (1999). Antigen processing and presentation – towards the millenium. *Immunological Reviews* **172**: 5-9.

Halestrap, A.P., McStay, G.P., Clarke, S.J. (2002). The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* **84**: 153-166.

Halestrap, A.P. and Brenner, C. (2003). The Adenine Nucleotide Translocase: A Central Component of the Mitochondrial Permeability Transition Pore and Key Player in Cell Death. *Current Medicinal Chemistry* **10**: 1507-1525.

Halestrap, A. (2005). A pore way to die. *Nature* **434**: 578-579.

Hanahan, D. (1998). Peripheral-antigen-expressing cells in thymic medulla: factors in self-tolerance and autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* **10**: 656-662.

Hansis, C., Jähner, D., Spiess, A.N., Boettcher, K. and Ivell, R. (1998). The gene for the Alzheimer-associated β -amyloid-binding protein (ERAB) is differentially expressed in the testicular Leydig cells of the azoospermic by w/w^v mouse. *European Journal of Biochemistry* **258**: 53-60.

Harding, F.A., McArthur, J.G., Gross, J.A., Raulet, D.H., and Allison, J.P. (1992). CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* **356**: 607-609.

He, X.Y., Schulz, H., and Yang, S.Y. (1998). A Human Brain L-3-Hydroxyacyl-coenzyme A Dehydrogenase Is Identical to an Amyloid β -Peptide-binding Protein Involved in Alzheimer's Disease. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. **273**, No. **17**: 10741-10746.

He, X.Y., Merz, G., Mehta, P., Schulz, H., Yang, S.Y. (1999). Human Brain Short Chain L-3-Hydroxyacyl Coenzyme A Dehydrogenase is a Single-domain Multifunctional Enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* **274** (**21**): 15014-15019.

He, X.Y., Merz, G., Yang, Y.Z., Pullakart, Mehta, P., Schulz, H., Yang, S.Y., (2000 a): Function of human brain short chain L-3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase in androgen metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* **1484**: 267-277.

He, X.Y., Yang, Y.Z., Schulz, H., and Yang, S.Y. (2000 b). Intrinsic alcohol dehydrogenase and hydroxysteroid dehydrogenase activities of human mitochondrial short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *Biochemical Journal* **345**: 139-143.

He, X.Y., Merz, G., Yang, Y.Z., Mehta, P., Schulz, H., Yang, S.Y. (2001). Characterization and localization of human type 10 17β -hydroxysteroid. *European Journal of Biochemistry* **268**: 4899-4907.

He, X.Y., Wen, G.Y., Merz, G., Lin, D., Yang, Y.Z., Mehta, P., Schulz, H., Yang, S.Y. (2002 a). Abundant type 10 17β -hydroxysteroid dehydrogenase in the hippocampus of mouse Alzheimer's disease model. *Molecular Brain Research* **99**: 46-53.

He, L., Lemasters, J.J. (2002 b). Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? *FEBS Letters* **512**: 1-7.

He, X.Y., Yang, Y.Z., Peehl, D.M., Lauderdale, A., Schulz, H., Yang, S.Y. (2003). Oxidative 3α -hydroxysteroid dehydrogenase activity of human type 10 17β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **87**: 191-198.

- He, X.Y., Wegiel, J., Yang, Y.Z., Pullarkat, R., Schulz, H., Yang, S.Y. (2005 a).** Type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase catalyzing the oxidation of steroid modulators of γ -aminobutyric acid type A receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology* **229**: 111-117.
- He, X.Y., Wegiel, J., Yang, S.Y. (2005 b).** Intracellular oxidation of allopregnanolone by human brain type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Brain Research* **1040**: 29-35.
- Heng, T.S.P., Goldberg, G.L., Gray, D.H.D., Sutherland, J.S., Chidgey, A.P., and Boyd, R.L. (2005).** Effects of Castration on Thymocyte Development in Two Different Models of Thymic Involution. *The Journal of Immunology*: 2982-2993.
- Hengartner, M.O. (1997).** The Biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-776.
- Herold, M.J., McPherson, K.G. and Reichardt, H.M. (2006).** Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**: 60-72.
- Hirokawa, K., Makinodan, T. (1975).** Thymic involution: effect on T cell differentiation. *Journal of Immunology* **114 (6)**: 1659-64.
- Hockenbery, D.M., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D. & Korsmeyer, S.J. (1990).** Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**: 334-336.
- Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L. & Korsmeyer, S.J. (1991 a).** Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* **75**: 241-251.
- Hockenbery, D.M., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M., Korsmeyer, S.J. (1991 b).** Bcl2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 6961-65.
- Hockenbery, D.M., Oltavi, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L. and Korsmeyer, S.J. (1993).** Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* **75 (2)**: 241-251.
- Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F., and Lacy, E. (1994).** Manipulating the Mouse Embryo: a Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory*.
- Indra, A.K., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J.M., Xiao, J.H., Chambon, P., and Metzger, D. (1999).** Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Research* **27**: 4324-4327.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., and Nagata, S. (1991).** The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**: 233-243.

Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., and Sakaguchi, S. (1999). Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *Journal of Immunology* **162**: 5317-5326.

Ivell, R., Balvers, M., Anand, R.J.K., Paust, H.J., McKinnell, C., and Sharpe, R. (2003). Differentiation-Dependent Expression of 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase, Type 10, in the Rodent Testis: Effect of Aging in Leydig Cells. *Endocrinology* **144 (7)**: 3130-3137.

Jameson, S.C., and Bevan, M.J. (1998). T-cell selection. *Current Opinion in Immunology* **10**: 214-219.

Janeway, C.A.J., Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* **20**: 197-216.

Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J., Ghosh, D. (1995). Short-chain-dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**: 6003-6013.

Jondal, M., Pazirandeh, A. and Okret, S. (2004). Different roles for glucocorticoids in thymocyte homeostasis? *Trends in Immunology*, **Vol. 25, No. 11**: 595-600.

Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H. and Persson, B. (2002). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). Coenzyme-based functional assignments in completed genomes. *European Journal of Biochemistry* **269**: 4409-4417.

Kashiwaya, Y., Takeshima, T., Mori, N., Nakashima, K., Clarke, K., and Veech, R.L. (2000). D- β -Hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **Vol. 97, No.10**: 5440-5444.

Kawashima, I., Seiki, K., Sakabe, K., Ihara, S., Akatsuka, A., and Katsumata, Y. (1992). Localization of estrogen-receptors and estrogen receptor-mRNA in female mouse thymus. *Thymus* **20**: 115-121.

Keach, S.M., Tan, J.T., Wherry, E.J., Konieczny, B.T., Surh, C.D., Ahmed, R. (2003). Selective expression of the interleukin-7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nature Immunology* **4**: 1191-1198.

Kellendonk, C., Tronche, F., Monaghan, A.P., Angrand, P.O., Stewart, F., and Schütz, G. (1996). Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucleic Acids Research* **24**: 1404-1411.

Kellendonk, C., Tronche, F., Casanova, E., Anlag, K., Opherk, C., and Schütz, G. (1999). Inducible site-specific recombination in the brain. *Journal of Molecular Biology* **285**: 175-182.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* **26** (4): 239-257.

Kieper, W.C., Tan, J.T., Bondi-Boyd, B., Gapin, L., Sprent, J., Ceredig, R., and Surh, C.D. (2002). Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8⁺ T cells. *Journal of Experimental Medicine* **195**: 1533-1539.

Kilby, N.J., Snaith, M.R., Murray, J.A.H. (1993). Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends in Genetics* **9** (12): 413-421.

Kim, J.S., He, L., and Lemasters, J.J. (2003). Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304**: 463-470.

King, L.B., Vacchio, M.S., Dixon, K., Hunziker, R., Margulies, D.H., and Ashwell, J.D. (1995). A targeted glucocorticoid receptor antisense transgene increases thymocyte apoptosis and alters thymocyte development. *Immunity* **3**: 647-656.

Kishimoto, H. and Sprent, J. (2000). The Thymus and Central Tolerance. *Clinical Immunology* Vol. **95**, No. **1**: S3-S7.

Kissinger, C.R., Rejto, P.A., Pelletier, L.A., Thomson, J.A., Showalter, R.E., Abreo, M.A., Agree, C.S., Margosiak, S., Meng, J.J., Aust, R.M., Vanderpool, D., Li, B., Tempczyk-Russell, A. and Villafranca, J.E. (2004). Crystal Structure of Human ABAD/HSD10 with a Bound Inhibitor: Implications for Design of Alzheimer's Disease Therapeutics. *Journal of Molecular Biology* **342**: 943-952.

Klas, C., Debatin, K.M., Jonker, R.R., and Krammer, P.H. (1993). Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *International Immunology* **5**: 625-630.

Klein, L., Klein, T., Ruther, U. and Kyewski, B. (1998). CD4 T cell tolerance to human C-reactive protein, an inducible serum protein, is mediated by medullary thymic epithelium. *Journal of Experimental Medicine* **188**: 5-16.

Klein, L., and Kyewski, B. (2000). "Promiscuous" expression of tissue antigens in the thymus: a key to T-cell tolerance and autoimmunity? *Journal of Molecular Medicine* **78** (9): 483-494.

Kobayashi, A., Jaing, L., Hashimoto, T. (1996). Two mitochondrial 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenases in bovine liver. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* **119**: 775-782.

Kokoszaka, J.E., Waymire, K.G., Levy, S.E., Sligh, J.E., Cai, J., Jones, D.P., MacGregor, G.R., and Wallace, D.C. (2004). The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* Vol. **427**: 461-465.

Kopp, E.B., Medzhitov, R. (1999). The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Current Opinion in Immunology* **11**: 13-18.

Krammer, P.H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, **Vol. 407**: 789-795.

Kroemer, G., Zamzami, N. and Susin, S.A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today* **Vol. 18, No. 1**: 44-51.

Kroemer, G. and Reed, J.C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine* **6**: 513-519.

Kühn, R., Schwenk, F., Aquet, M., Rajewsky, K. (1995). Inducible Gene targeting in Mice. *Science* **269**: 1427-1429.

Kühn, R., Schwenk, F. (1997). Advances in gene targeting methods. *Current Opinion in Immunology* **9**: 183-188.

Kurts, C., Miller, J.F., Subramaniam, R.M., Carbone, F.R. and Heath, W.R. (1998). Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those related during cellular destruction. *Journal of Experimental Medicine* **188**: 409-414.

Kyewski, B. and Klein, L. (2006). A Central Role for Central Tolerance. *Annual Review of Immunology* **24**: 571-606.

Labrie, F., Luu-The, V., Lin, S.X., Labrie, C., Simard, J., Breton, R., and Belanger, A. (1997). The key role of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids* **62**: 148-158.

Lacorazza, H.D., Guevara Patino, J.A., Weksler, M.E., Radu, D. and Nikolic-Zugic, J. (1999). Failure of rearranged TCR transgenes to prevent age-associated thymic involution. *Journal of Immunology* **163**: 4262.

Lechner, O., Wieggers, G.J., Oliveira-dos-Santos, A.J., Dietrich, H., Recheis, H., Waterman, M., Boyd, R. and Wick, G. (2000). Glucocorticoid production in the murine thymus. *European Journal of Immunology* **30**: 337-436.

Lee, Y.H., Sauer, B., Johnson, P.F., and Gonzales, F.J. (1997). Disruption of the *c/ebp* alpha gene in adult mouse liver. *Molecular Cell Biology* **17**: 6014-6022.

Lenardo, M.J. (1991). Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* **353**: 858-861.

Lewandowski, M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nature Reviews Genetics* **2**: 743-755.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**: 479-489.

Li, L., Hsu, H.C., William, G.E., Stockard, C.R., Ho, K.J., Lott, P., Yang, P.A., Zhang, H.G., Mountz, J.D. (2003). Cellular Mechanism of Thymic Involution. *Scandinavian Journal of Immunology* **57**: 410-422.

Li, Y., Johnson, N., Capano, M., Edwards, M. and Crompton, M. (2004). Cyclophilin-D promotes the mitochondrial permeability transition but has opposite effects on apoptosis and necrosis. *Biochemical Journal* **383**: 101-109.

Limmer, A., Sacher, T., Alferink, J., Kretschmar, M., Schönrich, G., Nichterlein, T., Arnold, B. and Hämmerling, G.J. (1998). Failure to induce organ-specific autoimmunity by breaking of tolerance: importance of the microenvironment. *European Journal of Immunology* **28**: 2395-2406.

Lin, D.T. and Lechleiter, J.D. (2002). Mitochondrial Targeted Cyclophilin D Protects Cells from Cell Death by Peptidyl Prolyl Isomerization. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. **277**, No. **34**: 31134-31141.

Linton, P.J. & Dorshkind, K. (2004). Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nature Immunology* Vol. **5**, No. **2**: 133-139.

Liu, G.Y., Fairchild, P.J., Smith, R.M., Prowle, J.R., Kioussis, D., and Wraith, D.C. (1995). Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance. *Immunity* **3**: 407-415.

Logie, C., Stewart, A.F. (1995). Ligand-regulated site-specific recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92** (13): 5940-5944.

Lohmann, T., Leslie, R.D., and Londei, M. (1996). T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes. *Journal of Autoimmunity* **9**: 385-389.

Lucken-Ardjomande, S. and Martinou, J.C. (2005). Newcomers in the process of mitochondrial permeabilization. *Journal of Cell Science* **118**: 473-483.

Luo, M.J., Mao, L.F., and Schulz, H. (1995). Short-Chain 3-Hydroxy-2-methylacyl-CoA Dehydrogenase from Rat Liver: Purification and Characterization of a Novel Enzyme of Isoleucine Metabolism. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, Vol. **321**, No. **1**: 214-220.

Lustbader, J.W., Cirilli, M., Lin, C., Xu, H.W., Takuma, K., Wang, N., Caspersen, C., Chen, X., Pollak, S., Chaney, M., Trinchese, F., Liu, S., Gunn-Moore, F., Lue, L.F., Walker, D.G., Kuppusamy, P., Zewier, Z.L., Arancio, O., Stern, D., Yan, S.S., Wu, H. (2004). ABAD Directly Links A β to Mitochondrial Toxicity in Alzheimer's Disease. *Science*, Vol. **304**: 448-452.

Machida, K., Ohta, Y., and Osada, H. (2006). Suppression of Apoptosis by Cyclophilin D via Stabilization of Hexokinase II Mitochondrial Binding in Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. **281**, No. **20**: 14314-14320.

Mackall, C.L. and Gress, R.E. (1997). Thymic aging and T-cell regeneration. *Immunological Review* **160**: 91.

Mackall, C.L., Punt, J.A., Morgan, P., Farr, A.G., Gress, R.E. (1998). Thymic function in young/old chimeras: substantial thymic T cell regenerative capacity despite irreversible age-associated thymic involution. *European Journal of Immunology* **28 (6)**: 1886-93.

Mackay, C.R. (1993). Homing of naïve, memory and effector lymphocytes. *Current Opinion in Immunology* **5**: 423-427.

Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. and Evans, R.M. (1995). The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* **83 (6)**: 835-839.

Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S.A., Zamzami, N., Hirsch, T., Macho, A., Haeflner, A., Hirsch, F., Geuskens, M., and Kroemer, G. (1996). Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* **184 (3)**: 1155-1160.

Marrack, P., Lo, D., Brinster, R., Palmiter, R., Burkly, L., Flavell, R.H., and Kappler, J. (1988). The effect of thymus environment on T cell development and tolerance. *Cell* **53**: 627-634.

Marsden, V.S., Strasser, A. (2003). Control of apoptosis in the immune system. *Annual Review of Immunology* **21**: 71-105.

Martinou, J.C. (1999). Key to the mitochondrial gate. *Nature*, **Vol. 399**: 411-412.

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L., Prevost, M.C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C., Kroemer, G. (1998). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* **281**: 2027-2031.

Mather, M. and Rottenberg, H. (2000). Aging Enhances the Activation of the Permeability Transition Pore in Mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **273**: 603-608.

Medzhitov, R., Janeway, C.A. Jr. (2000). The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends in Microbiology* **8**: 452-456.

Meikle, A.W., Tyler, F.H. (1977). Potency and duration of action of glucocorticoids. Effects of hydrocortisone, prednisone and dexamethasone on human pituitary-adrenal function. *American Journal of Medicine* **63**: 200-7.

Metzger, D., und Feil, R. (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Current Opinion in Biotechnology* **10**: 470-476.

Metzger, D. and Chambon, P. (2001). Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* **24**: 71-80.

- Meyers, E.N., Lewandowski, M., and Martin, G.R. (1998).** An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nature Genetics* **18**: 136-141.
- Min, H., Montecino-Rodriguez, E., and Dorshkind, K. (2004).** Reduction in the Developmental Potential of Intrathymic T Cell Progenitors with Age. *Journal of Immunology* **173** (1): 245-250.
- Mindnich, R., Möller, G., Adamski, J. (2004).** The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology* **218**: 7-20.
- Molina, T., Kishihara, K., Siderovskid, D.P., Van Ewijk, W., Narendran, A., Timms, E. (1992).** Profound block in thymocyte development in mice lacking p56^{lck}. *Nature* **357**: 161-163.
- Murphy, K.M., Heimberger, A.B., and Loh, D.Y. (1990).** Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺TCR^{lo} thymocytes in vivo. *Science* **250**: 1720-1723.
- Murphy, C.T., McCarroll, S.A., Bargmann, C.I., Fraser, A., Kamath, R.S., Ahringer, J., Li, H. and Kenyon, C. (2003).** Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **424**: 277-283.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., and Dixit, V.M. (1996).** FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/Apo-1) death-inducing signalling complex. *Cell* **85**: 817-827.
- Nagata, S. (1997).** Apoptosis by death factor. *Cell* **88**: 355-65.
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T. & Tsujimoto, Y. (2005).** Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*, Vol. **434**: 652-657.
- Nakakijima, H., and Leonard, W.J. (1997).** Impaired peripheral deletion of activated T cells in mice lacking the common cytokine receptor gamma-chain: defective Fas ligand expression in gamma-chain-deficient mice. *Journal of Immunology* **159**: 4737-4744.
- Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1998).** Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Vol. **95**: 14681-14686.
- Neefjes, J.J., and Momburg, F. (1993).** Cell biology of antigen presentation. *Current Opinion in Immunology* **5**: 27-34.

Ofman, R., Ruiter, J.P.N., Feenstra, M., Duran, M., Poll-The, B.T., Zschocke, J., Ensenauer, R., Lehnert, W., Sass, J.O., Sperl, W., and Wanders, R.J.A. (2003). 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase Deficiency Is Caused by Mutations in the *HADH2* Gene. *American Journal of Human Genetics* **72**: 1300-1307.

Ohashi, P.S., Oehen, S., Buerki, K., Pircher, H., Ohashi, C.T., Odermatt, B., Malissen, B., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1991). Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* **65**: 305-317.

Oldstone, M.B., Nerenberg, M., Southern, P., Price, J., and Lewicki, H. (1991). Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. *Cell* **65**: 319-331.

Olpin, S.E., Pollitt, R.J., McMenamin, J., Manning, N.J., Besley, G., Ruiter, J.P.N. and Wanders, R.J.A. (2002). 2-Methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency in a 23-year-old man. *Journal of Inherited Metabolic Diseases* **25**: 477-482.

Olsen, N.J., Olsen, G., Viselli, S.M., Gu, X., and Kovacs, W.J. (2001). Androgen receptors in thymic epithelium modulate thymus size and thymocyte development. *Endocrinology* **142**: 1278-1283.

Olson, E.N., Arnold, H.H., Rigby, P.W. and Wold, B.J. (1996). Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell* **85 (1)**: 1-4.

Opferman, J.T., Korsmeyer, S.J. (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nature Immunology* **4**: 410-5.

Oppermann, U.C., Filling, C., Berndt, K.D., Persson, B., Benach, J., Ladenstein, R. and Jörnvall, H. (1997). Active site directed mutagenesis of 3 β /17 β -hydroxysteroid dehydrogenase establishes differential effects on short-chain dehydrogenase/reductase reactions. *Biochemistry* **36**: 34-40.

Oppermann, U.C.T., Salim, S., Tjernberg, L.O., Terenius, L., Jörnvall, H. (1999). Binding of amyloid β -peptide to mitochondrial hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (ERAB): regulation of an SDR enzyme activity with implications for apoptosis in Alzheimer's disease. *FEBS Letters* **451**: 238-242.

Oppermann, U.C.T., Filling, C., Jörnvall, H. (2001). Forms and functions of human SDR enzymes. *Chemico-Biological Interactions* **130-132**: 699-705.

Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafquat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafquat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B., Jörnvall, H. (2003). Short-chain dehydrogenase/reductases (SDR): the 2002 update. *Chemico-Biological Interactions* **143-144**: 247-253.

Orrenius, S. (2004). Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicology Letters* **149**: 19-23.

- Ortman, C.L., Dittmar, K.A., Witte, P.L. and Le, P.T. (2002).** Molecular characterization of the mouse involuted thymus: aberrations in expression of transcription regulators in thymocyte and epithelial compartments. *International Immunology* **Vol. 14, No. 7:** 813-822.
- Pacher, P. and Hajnoczky, G. (2001).** Propagation of the apoptotic signal by mitochondrial waves. *The EMBO Journal* **20 (15):** 4107-4121.
- Pastorino, J.G., Shulga, N., and Hoek, J.B. (2002).** Mitochondrial Binding of Hexokinase II Inhibits Bax-induced Cytochrome c Release and Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **Vol. 277, No. 9:** 7610-7618.
- Pazirandeh, A., Xue, Y., Rafter, I., Sjövall, J., Jondal, M., and Okret, S. (1999).** Paracrine glucocorticoid activity produced by mouse thymic epithelial cells. *The FASEB Journal* **Vol. 13:** 893-901.
- Pazirandeh, A., Xue, Y., Presteggaard T., Jondal, M., Okret, S. (2002).** Effects of altered glucocorticoid sensitivity in the T cell lineage on thymocyte and T cell homeostasis. *The FASEB Journal* **16:** 727-9.
- Pazirandeh, A., Jondal, M., and Okret, S. (2004).** Glucocorticoids Delay Age-Associated Thymic Involution through Directly Affecting the Thymocytes. *Endocrinology* **145 (5):** 2392-2401.
- Pearce, P.T., Khalid, B.A., and Funder, J.W. (1983).** Progesterone receptors in rat thymus. *Endocrinology* **113:** 1287-1291.
- Penning, T.M. (1997).** Molecular Endocrinology of Hydroxysteroid Dehydrogenases. *Endocrine Reviews* **Vol. 18., No. 3:** 281-305.
- Penninger, J. M., and Kroemer, G. (1998).** Molecular and cellular mechanisms of T lymphocyte apoptosis. *Advances in Immunology* **68:** 51-144.
- Peter, M.E., and Krammer, P.H. (2003).** The CD95 (Apo-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differentiation* **10:** 26-35.
- Philips, J.A., Brondstetter, T.I., English, C.A., Lee, H.E., Virts, E.L., and Thoman, M.L. (2004).** IL-7 Gene Therapy in Aging Restores Early Thymopoiesis without Reversing Involution. *Journal of Immunology* **173 (8):** 4867-4874.
- Pircher, H., Rohrer, U.H., Moskophidis, D., Zinkernagel, R.M. and Hengartner, H. (1991).** Lower receptor avidity required for thymic clonal deletion than for effector T-cell function. *Nature* **351:** 482-485.
- Poirier, D. (2003).** Inhibitors of 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases. *Current Medicinal Chemistry* **10:** 453-477.

Poll-The, B.T., Wanders, R.J.A., Ruiter, J.P.N., Ofman, R., Majoie, C.B.L.M., Barth, P.G., and Duran, M. (2004). Spastic diplegia and periventricular white matter abnormalities in 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency, a defect of isoleucine metabolism: differential diagnosis with hypoxic-ischemic brain diseases. *Molecular Genetics and Metabolism* **81**: 295-299.

Postik, C., Shiota, M., Niswender, K.D., Jetton, T.L., Chen, Y., Moates, J.M., Shelton, K.D., Lindner, J., Cherrington, A.D., and Magnuson, M.A. (1999). Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 305-315.

Powell, A.J., Read, J.A., Banfield, M.J., Gunn-Moore, F., Yan, S.D., Lustbader, J., Stern, A.R., Stern, D.M., and Brady, R.L. (2000). Recognition of Structurally Diverse Substrates by Type II 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (HADH II)/Amyloid- β Binding Alcohol Dehydrogenase (ABAD). *Journal of Molecular Biology* **303**: 311-327.

Radvanyi, L.G., Shi, Y., Vaziri, H., Sharma, A., Dhala, R., Mills, G.B., and Miller R.G. (1996). CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. *Journal of Immunology* **156**: 1788-1798.

Rajewsky, K., Gu, H., Kühn, R., Betz, U.A.K., Müller, W., Roes, J., Schwenk, F. (1996). Conditional Gene Targeting. *Journal of Clinical Investigation* **98 (3)**: 600-603.

Reichardt, H.M., Schütz, G. (1998 a). Glucocorticoid-signaling – multiple variations of a common theme. *Molecular and Cellular Endocrinology* **146**: 1-6.

Reichardt, H.M., Kaestner, K.H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessley, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P., Schütz, G. (1998 b). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* **93**: 531-41.

Reichardt, H.M., Umland, T., Bauer, A., Kretz, O., and Schütz, G. (2000). Mice with an Increased Glucocorticoid Receptor Gene Dosage Show Enhanced Resistance to Stress and Endotoxic Shock. *Molecular And Cellular Biology*, **Vol. 20, No. 23**: 9009-9017.

Reichardt, H.M., Tuckermann, J.P., Göttlicher, M., Vujic, M., Weih, F., Angel, P., Herrlich, P. and Schütz, G. (2001). Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *The EMBO Journal* **20**: 7168-7173.

Rickert, R.C., Roes, J., and Rajewsky, K. (1997). B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Research* **25**: 1317-1318.

Rinaldo, P. and Matern, D. (2002). Fatty Acid Oxidation Disorders. *Annual Reviews of Physiology* **64**: 477-502.

Ringrose, L., Lounnas, V., Ehrlich, L., Buchholz, F., Wade, R., and Stewart, A.F. (1998). Comparative kinetic analysis of FLP and Cre recombinases: mathematical models for DNA binding and recombination. *Journal of Molecular Biology* **284**: 363-384.

Rocha, B., and von Boehmer, H. (1991). Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science* **251**: 1225-1228.

Rodewald, H.R. and Fehling, H.J. (1998). Molecular and cellular events in early thymocyte development. *Advances in Immunology* **69**: 1-112.

Rodriguez, C.I., Buchholz, F., Galloway, J., Sequerra, R., Kasper, J., Ayala, R., Stewart, A.F., and Dymecki S.M. (2000). High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nature Genetics* **25**: 139-140.

Sadowski, P.D. (1993). Site-specific genetic recombination: hops, flips, and flops. *FASEB Journal* **7**: 760-767.

Sakaguchi, S. (2000). Regulatory T cells: Key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* **101**: 455-458.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M, Takahashi, T. (2001). Immunologic tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity and transplantation tolerance. *Immunological Reviews* **182**: 18-32.

Sakaguchi, S. (2004). Naturally Arising CD4⁺ Regulatory T cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immunue Response. *Annual Review of Immunology* **22**: 531-562.

Salim, S., Filling, C., Martensson, E., Oppermann, U.C.T. (2000). Lack of quinone reductase activity suggests that amyloid- β peptide/ERAB induced lipid peroxidation is not directly related to production of reactive oxygen species by redoxcycling. *Toxicology* **144**: 163-168.

Santori, F.R., Kieper, W.C., Brown, S.M., Lu, Y., Neubert, T.A., Johnson, K.L., Naylor, S., Vukmanovic, S., Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2002). Rare, structurally homologous self-peptides promote thymocyte positive selection. *Immunity* **17**: 131-142.

Sass, J.O., Forstner, R., Sperl, W. (2004). 2-Methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency: impaired catabolism of isoleucine presenting a neurodegenerative disease. *Brain & Development* **26**: 12-14.

Scaffidy, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (Apo-1/Fas) signalling pathways. *The EMBO Journal* Vol. **17**, No. **6**: 1675-1687.

Schinzel, A.C., Takeuchi, O., Huang, Z., Fisher, J.K., Zhou, Z., Rubens, J., Hetz, C., Danial, N.N., Moskowitz, M.A., and Korsmeyer, S.J. (2005). Cyclophilin D is a component of mitochondrial transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **Vol. 102, No. 34:** 12005-12010.

Schluns, K.S., Kieper, W.C., Jameson, S.C., and Lefrancois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nature Immunology* **1:** 426-432.

Schmidt, S., Rainer, J., Ploner, C., Presul, E., Riml, S. and Kofler R. (2004). Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death and Differentiation* **11:** S45-S55.

Schönrich, G., Kalinke, U., Momburg, F., Malissen, M., Schmitt-Verhulst, A.M., Malissen, B., Hämmerling, G.J., and Arnold, B. (1991). Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* **65:** 293-304.

Schönrich, G., Momburg, F., Hämmerling, G.J., and Arnold, B. (1992). Anergy induced by thymic medullary epithelium. *European Journal of Immunology* **22:** 1687-1691.

Schubert, A. and Grimm, S. (2004). Cyclophilin D, a Component of the Permeability Transition Pore, Is an Apoptosis Repressor. *Cancer Research* **64:** 85-93.

Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., Peter, M.E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *European Journal of Biochemistry* **254:** 439-459.

Schwenk, F., Baron, U., Rajewsky, K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Research* **23 (24):** 5080-5081.

Schwenk, F., Kuhn, R., Angrand, P.O., Rajewsky, K. and Stewart, A.F. (1998). Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Research* **26:** 1427-1432.

Scollay, R.G., Butcher, E.C., Weisman, I.L. (1980). Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *European Journal of Immunology* **10:** 210-218.

Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M.F., and Ohashi, P. (1999). Selection of the T Cell Repertoire. *Annual Review of Immunology* **17:** 829-74.

Semana, G., Gausling, R., Jackson, R.A., and Hafler, D.A. (1999). T cell autoreactivity to proinsulin epitopes in diabetic patients and healthy subjects. *Journal of Autoimmunity* **12:** 259-267.

Seong, E., Saunders, T.L., Stewart, C.L. and Burmeister, M. (2004). To knock-out in 129 or in C57Bl/6: that is the question. *Trends in Genetics* **Vol. 20, No. 2:** 59-62.

Shafqat, N., Marschall, H.U., Filling, C., Nordling, E., Wu, X.Q., Björk, L., Thyberg, J., Martensson, E., Salim, S., Jörnvall, H., and Oppermann, U. (2003). Expanded substrate screening of human and Drosophila type 10 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) reveal multiple specificities in bile acid and steroid hormone metabolism: characterization of multifunctional 3 α /7 α /7 β /17 β /20 β /21-HSD. *Biochemical Journal* **376:** 49-60.

Sharpe, J.C., Arnoult, D., Youle, R.J. (2004). Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochimica et Biophysica Acta* **1644:** 107-113.

Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **Vol: 399:** 483-487.

Shortman, K. & Wu, L. (1996). Early T lymphocyte progenitors. *Annual Review of Immunology* **14:** 29-47.

Siggs, O.M., Makaroff, L.E. and Liston, A. (2006). The why and how of thymocyte negative selection. *Current Opinion in Immunology* **18:** 175-183.

Sims, N.R. (1996). Energy metabolism, oxidative stress and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurodegeneration* **5:** 435-440.

Smith, C.A., Farrah, T., and Goodwin, R.G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76:** 959-966.

Smith, K.M., Olson, D.C., Hirose, R., and Hanahan, D. (1997). Pancreatic gene expression in rare cells of thymic medulla: evidence for functional contribution to T cell tolerance. *International Immunology* **9:** 1355-1365.

Sprent, J. (1995). Central tolerance of T cells. *International Reviews of Immunology* **13:** 95-105.

Sprent, J., and Surh, C.D. (2001 a). Generation and maintenance of memory T cells. *Current Opinion in Immunology* **13:** 248-254.

Sprent, J., Tough D.F. (2001 b). T cell death and memory. *Science* **293:** 245-248.

Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annual Review of Immunology* **21:** 139-176.

Strasser, A., Harris, A.W., Huang, D.C.S., Krammer, P.H. and Cory, S. (1995). Bcl-2 and Fas/Apo-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *The EMBO Journal* **Vol. 14, No. 24:** 6136-6147.

Straus, S.E., Sneller, M., Lenardo, M.J., Puck, J.M., and Strober, W. (1999). An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Annals of Internal Medicine* **130**: 591-601.

Su, D.M., Wang, J., Lin, Q., Cooper, M.D., Watanabe, T. (1997). Interferons alpha/beta inhibit IL-7-induced proliferation of CD4⁻CD8⁻CD3⁻CD44⁺CD25⁻ thymocytes, but do not inhibit that of CD4⁻CD8⁻CD3⁻CD44⁻CD25⁺ thymocytes. *Immunology* **90**: 543-549.

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzani, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**: 441-446.

Sutherland, J.S., Goldberg, G.L., Hammett, M.V., Uldrich, A.P., Berzins, S.P., Heng, T.S., Blazar, B.R., Millar, J.L., Malin, M.A., Chidgey, A.P., and Boyd, R.L. (2005). Activation of Thymic Regeneration in Mice and Humans following Androgen Blockade. *Journal of Immunology* **175** (4): 2741-2753.

Sutton, V.R., O'Brien, W.E., Clark, G.D., Kim, J., Wanders, R.J. (2003). 3-Hydroxy-2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Diseases* **26**: 69-71.

Tafari, A., Alferink, J., Moller, P., Hämmerling, G.J., Arnold, B. (1995). T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science* **270**: 630-633.

Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C.I., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Suda, T., and Nagata, S. (1994). Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* **76**: 969-976.

Takeda, K., Clausen, B.E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Forster, I., and Akira, S. (1999). Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* **10**: 39-49.

Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology* **21**: 335-376.

Takuma, K., Yao, J., Huang, J., Xu, H., Chen, X., Luddy, J., Trillat, A.C., Stern, D.M., Arancio, O., and Yan, S.S. (2005). ABAD enhances A β -induced cell stress via mitochondrial dysfunction. *The FASEB Journal* **19** (6): 597-608.

Tan, J.T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K.I., and Surh, C.D. (2001). IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naïve T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 8732-8737.

Tan, J.T., Ernst, B., Kieper, W.C., LeRoy, E., Sprent, J., and Surh, C.D. (2002). Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8⁺ cells but are not required for memory phenotype CD4⁺ cells. *Journal of Experimental Medicine* **195**: 1523-1532.

Tanchot, C., Rocha, B. (1995). The peripheral T cell repertoire: independent homeostatic regulation of virgin and activated CD8⁺ T cell pool. *European Journal of Immunology* **25** (8): 2127-2136.

Tanchot, C., Rosado, M.M., Agenes, F., Freitas, A.A. & Rocha, B. (1997 a). Lymphocyte homeostasis. *Seminars in Immunology* **9**: 331-337.

Tanchot, C., Lemonnier, F.A., Perarnau, B., Freitas, A.A., & Rocha, B. (1997 b). Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naïve or memory T cells. *Science* **276**: 2057-2062.

Tarcic, N., Ovadia, H., Weiss, D.W., Weidenfeld, J. (1998). Restraint stress-induced thymic involution and cell apoptosis are dependent on endogenous glucocorticoids. *Journal of Neuroimmunology* **82**: 40-46.

Tarutani, M., Itami, S., Okabe, M., Ikawa, M., Tezuka, T., Yoshikawa, K., Kinoshita, T., and Takeda, J. (1997). Tissue-specific knockout of the mouse Pig-a gene reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 7400-7405.

Thoman, M.L. (1995). The pattern of T lymphocyte differentiation is altered during thymic involution. *Mechanisms of Ageing and Development* **82**: 155-170.

Thoman, M.L. (1997). Early steps in T cell development are affected by aging. *Cellular Immunology* **178**: 117-23.

Thomas, K.R., Capecchi, M.R. (1987). Site-directed Mutagenesis by Gene Targeting in Mouse Embryo-Derived Stem Cells. *Cell* **51**: 503-512.

Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* **281**: 1312-1316.

Tieu, K., Perier, C., Caspersen, C., Teismann, P., Wu, D.C., Yan, S.D., Naini, A., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Ramasamy, R., and Przedborski, S. (2003). D-β-Hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. **112**, No. **6**: 892-901.

Tieu, K., PhD, Perier, C., PhD, Vila, M., MD, PhD, Caspersen, C., PhD, Zhang, H.P., MD, Teismann, P., PhD, Jackson-Lewis, V., PhD, Stern, D.M., MD, Yan, S.D., MD, and Przedborski, S., MD, PhD (2004). L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase II Protects in a Model of Parkinson's Disease. *Annals of Neurology* **56** (1): 51-60.

Tolosa, E., King, L.B., and Ashwell, J.D. (1998). Thymocyte glucocorticoid resistance alters positive selection and inhibits autoimmunity and lymphoproliferative disease in MRL-lpr/lpr mice. *Immunity* **8**: 67-76.

Tomlinson, S. (1993). Complement defense mechanisms. *Current Opinion in Immunology* **5**: 83-89.

Torroja, L., Ortuno-Sahagun, D., Ferrus, A., Hämmerle, B., and Barbas, J.A. (1998). Scully, an Essential Gene of Drosophila, is Homologous to Mammalian Mitochondrial Type II L-3-hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase/Amyloid- β Peptide-binding Protein. *The Journal of Cell Biology*, Vol. **141**, No **4**: 1009-1017.

Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H.M. and Schütz, G. (1998). Genetic dissection of glucocorticoid receptor function in mice. *Current Opinion in Genetics & Development* **8**: 532-538.

Tschopp, J., Irmeler, M., and Thome, M. (1998). Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Current Opinion in Immunology* **10**: 552-558.

Tsujimoto, Y., Nakagawa, T., Shimizu, S. (2006). Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (Bioenergetics)*, in press.

Tuckermann, J.P., Kleiman, A., McPherson, K.G. and Reichardt, H.M. (2005). Molecular Mechanisms of Glucocorticoids In The Control Of Inflammation And Lymphocyte Apoptosis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, **42** (**1**): 71-104.

Vacchio, M.S., Papadopoulos, V. and Ashwell J.D. (1994). Steroid production in the thymus: implications for thymocyte selection. *Journal of Experimental Medicine* **179**: 1835-1846.

Vacchio, M.S., Ashwell, J.D. (2000). Glucocorticoids and thymocyte development. *Seminars in Immunology* **12**: 475-85.

van den Brandt, J., Wang, D., Reichardt, H.M. (2004). Resistance of single-positive thymocytes to glucocorticoid-induced apoptosis is mediated by CD28 signaling. *Molecular Endocrinology* **18**: 687-95.

Van der Weyden, L., Adams, D.J., and Bradley, A. (2002). Tools for targeted manipulation of the mouse genome. *Physiological Genomics* **11**: 133-164.

Van Parijs, L., Biuckians, A., and Abbas, A.K. (1998). Functional Roles of Fas and Bcl-2-Regulated Apoptosis of T Lymphocytes. *Journal of Immunology* **160** (**5**): 2065-2071.

Vihko, P., Härkönen, P., Oduwale, O., Törn, S., Kurkela, R., Porvari, K., Pulkka, A., Isomaa, V. (2003). 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenases and cancers. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **83**: 119-122.

von Boehmer, H., Aifantis, I., Feinberg, J., Lechner, O., Saint-Ruf, C., Walter, U., Buer, W. and Azougi, O. (1999). Pleiotropic changes controlled by the pre-T-cell receptor. *Current Opinion in Immunology* **11**: 135-142.

Vooijs, M., Jonkers, J., and Berns, A. (2001). A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent. *EMBO Report* **2**: 292-297.

Wakita, T., Taya, C., Katsume, A., Kato, J., Yonekawa, H., Kanegae, Y., Saito, I., Hayashi, Y., Koike, M., and Kohara, M. (1998). Efficient conditional transgene expression in hepatitis c virus cDNA transgenic mice mediated by the Cre/loxP system. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 9001-9006.

Waldmeier, P.C., Zimmermann, K., Qian, T., Tintelnot-Blomley, M. and Lemasters, J.J. (2003). Cyclophilin D as a Drug Target. *Current Medicinal Chemistry* **10**: 1485-1506.

Wanders, R.J.A., Vreken, P., Den Boer, M.E.J., Wijburg, F.A., Van Gennip, A.H. and IJlst, L. (1999). Disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA β -oxidation. *Journal of Inherited Metabolic Diseases* **22**: 442-487.

Wang, D., Müller, N., McPherson, K.G., and Reichardt, H.M. (2006). Glucocorticoids Engage Different Signal Transduction Pathways to Induce Apoptosis in Thymocytes and Mature T Cells. *Journal of Immunology* **176 (3)**: 1695-1702.

Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nagata, S. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* **356**: 314-317.

Wen, G.Y., Yang, S.Y., Kaczmarek, W., He, X.Y., Pappas, K.S. (2002). Presence of hydroxysteroid dehydrogenase type 10 in amyloid plaques (APs) of Hsiao's APP-Sw transgenic mouse brains, but absence in APs of Alzheimer's disease brains. *Brain Research* **954**: 115-122.

Woodfield, K., Ruck, A., Brdiczka, D., Halestrap, A.P. (1998). Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochemical Journal* **336**: 287-290.

Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**: 555-556.

Yan, S.D., Fu, J., Soto, C., Chen, X., Zhu, H., Al-Mohanna, F., Collison, K., Zhu, A., Stern, E., Saido, T., Tohyama, M., Ogawa, S., Roher, A., Stern, D. (1997). An intracellular protein that binds amyloid- β peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* **389**: 689-695.

Yan, S.H., Shi, Y., Zhu, A., Fu, J., Zhu, H., Zhu, Y., Gibson, L., Stern, E., Collison, K., Al-Mohanna, F., Ogawa, S., Roher, A., Clarke, S.G., Stern, D.M. (1999). Role of ERAB/L-3-Hydroxyacyl-coenzyme A Dehydrogenase Type II Activity in $A\beta$ -induced Cytotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry* **274 (4)**: 2145-2156.

Yan, S.D., Zhu, Y., Stern, E.D., Hwang, Y.C., Hori, O., Ogawa, S., Frosch, M.P., Connolly, E.S. Jr., McTaggart, R., Pinsky, D.J., Clarkes, S., Stern, D.M., and Ramasamy, R. (2000 a). Amyloid β -Peptide-binding Alcohol Dehydrogenase Is a Component of the Cellular Response to Nutritional Stress. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. **275**, No. **35**: 27100-27109.

Yan, S.D., Roher A., Chaney, M., Zlokovic, B., Schmidt, A.M., Stern, D. (2000 b). Cellular cofactors potentiating induction of stress and cytotoxicity by amyloid beta-peptide. *Biochimica et Biophysica Acta* **1502**: 145-157.

Yan, S.D., and Stern. D.M. (2005). Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease: role of amyloid- β peptide alcohol dehydrogenase (ABAD). *International Journal of Experimental Pathology* **86**: 161-171.

Yang, S.Y., He, X.Y. (2001). Role of type 10 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Advances in experimental medicine and biology* **487**: 101-110.

Yang, S.Y., He, X.Y. and Schulz, H. (2005 a). 3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in human health and disease. *FEBS Journal* **272**: 4874-4883.

Yang, S.Y., He, X.Y. and Schulz, H. (2005 b). Multiple functions of type 10 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **Vol. 16, No. 4**: 167-175.

Zamzami, N., and Kroemer, G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2 (1)**: 67-71.

Zhang, Y., Riesterer, C., Ayrall, A.M., Sablitzky, F., Littlewood, T.D. and Reth, M. (1996). Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research* **Vol. 24, No. 4**: 543-548.

Zhang, N., Hartig, H., Dzhagalov, I., Draper, D., He, Y.W. (2005). The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell Research* **15 (10)**: 749-769.

Zoratti, M, Szabo, I. (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta* **1241**: 139-176.

Zoratti, M., Szabo, I., De Marchi, U. (2005). Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? *Biochimica et Biophysica Acta* **1706**: 40-52.

Zschocke, J., Ruiter, J.P.N., Brand, J., Lindner, M., Hoffmann, G., Wanders, R.J.A., and Mayatepek, B. (2000). Progressive Infantile Neurodegeneration Caused by 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase Deficiency: A Novel Inborn Error of Branched-Chain Fatty Acid and Isoleucine Metabolism. *Pediatric Research* **Vol. 48, No. 6**, 852-855.

Abkürzungsverzeichnis

ABAD	Amyloid-beta-peptidbindende Alkoholdehydrogenase („amyloid β -peptide binding alcohol dehydrogenase“)
A β Peptid	Amyloid beta Peptid
APC	Allophycocyanin
APCs	antigenpräsentierende Zellen
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat-toluidinsalz
bp	Basenpaare
bio	Biotin
BZR	B-Zellrezeptor
CD	Differenzierungscluster (cluster of differentiation)
CD95L	CD95-Ligand
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure(complementary DNA)
Cre	Cre Rekombinase
DC	dendritische Zelle
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
Dexa	Dexamethason
DHT	Dihydrotestosteron
Dig	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium (Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2´-Deoxynucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERAB	endoplasmic reticulum-associated amyloid β -peptide binding protein
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FACScan/Calibur	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Scanner
FCS	fötales Kälberserum
Feeder-Zellen	primäre embryonale Fibroblastenzellen
FITC	Fluoreszein-Isotiozyanat

Flp	Flp Rekombinase
g	Gramm
G418	Ganciclovir
GC	Glucocorticoid
GR	Glucocorticoidrezeptor
h	Stunde
HE	Hämatoxylin/Eosin
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HSD	Hydroxysteroid Dehydrogenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
loxP	locus of crossing over of P1 bacteriophage
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mg	Milligramm
MHBD	2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
mut	Mutation
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
OD	optische Dichte
PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline (Dulbecco's Phosphat-Gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin

Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
rek.	rekombiniert
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
SA	Streptavidin
sec.	Sekunde(n)
SSC	Standard Saline Citrat
TE	Tris-EDTA Puffer
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris (hydroxymethyl) amino-methan
TZR	T-Zellrezeptor
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
wt	Wildtyp