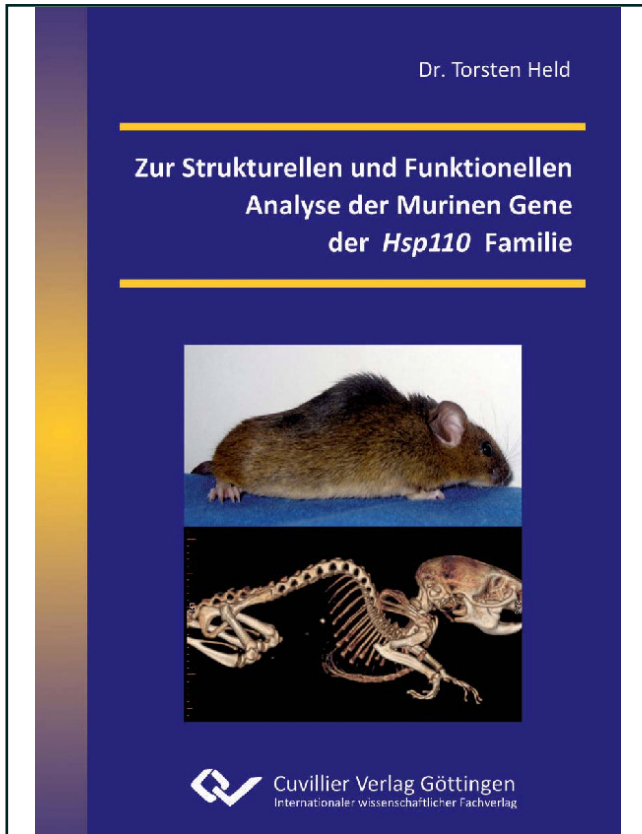




Torsten Held (Autor)

Zur Strukturellen und Funktionellen Analyse der Murinen Gene der Hsp110 Familie



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/550>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

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

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

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

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