Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS **I**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **VIII**

FACHWORTVERZEICHNIS **XIV**

1 EINLEITUNG **1**

1.1 Identifizierung und Charakterisierung der *Hspa4l* cDNA **1**

1.2 Die *Hsp110* 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 Ethanolfällung 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 *In situ*-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 *Hspa4l* 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 *Hspa4l* Gens 65
3.1.4 Reproduktive Defekte in männlichen *Hspa4l*$^{r/-}$ Mäusen 67
3.1.5 Beeinträchtigung der Spermatogenese und Anstieg der Apoptose in den testikulären Keimzellen infertiler *Hspa4l*$^{r/-}$ Mäuse 69
3.1.6 Expressionsanalyse verschiedener Hitzeschockproteine in *Hspa4l*$^{r/-}$ 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 *Hspa4l*$^{r/-}$ Mäusen 74

3.2 *Hspa4* 78

3.2.1 Expressionsanalyse für das murine *Hspa4* Gen 78

3.2.1.1 Expressionsanalyse für das *Hspa4* Gen in verschiedenen Organen 78

3.2.1.2 Expressionsanalyse für das *Hspa4* Gen im postnatalen Testis 79

3.2.1.3 Expressionsanalyse für das *Hspa4* 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 *Hspa4* Gen während der präimplantativen Embryonalentwicklung mittels RT-PCR 89

3.2.1.10 Analysen zur maternalen oder embryonalen *Hspa4* Genexpression 89

3.2.2 Zur Funktion des *Hspa4* Gens 91

3.2.2.1 Strategie zur Inaktivierung des *Hspa4* 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 *Hspa4* und Selektion homolog rekombinierter *Hspa4*$^{+/-}$ ES-Zellen 94

3.2.2.5 Herstellung und Charakterisierung der chimären Mäuse 95

3.2.3 Analyse *Hspa4* defizienter Mäuse 95

3.2.3.1 Genotypisierung *Hspa4* 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 *Hspa4* Gens 97

3.2.4 Phänotyp-Analyse der *Hspa4*$^{-/-}$ Mäuse des C57Bl/6J x 129/Sv-Hintergrundes 98

3.2.4.1 Analyse der Fertilität der *Hspa4*$^{-/-}$ Mäuse 98

3.2.4.2 Beeinträchtigung der Spermatogenese bei infertilen *Hspa4*$^{-/-}$ Mäusen 99

3.2.4.3 Expressionsanalysen für verschiedene Hitzeschockproteine im *Hspa4*$^{-/-}$ Testis 102

3.2.4.4 Expressionsanalyse von keimzellspezifischen Genen in Testes infertiler *Hspa4*$^{-/-}$ Mäuse 103

3.2.5 Phänotyp-Analyse der *Hspa4*$^{-/-}$ Mäuse des 129/Sv-Hintergrundes 105

3.2.5.1 *Hspa4*$^{-/-}$ Mäuse des 129/Sv-Hintergrundes 105

3.2.5.2 Phänotyp der überlebenden *Hspa4*$^{-/-}$ 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 *Hspa4*$^{-/-}$ Mäuse 111
3.2.5.5 Histologische Untersuchungen des Dünndarms und der Leber von *Hspa4*$^{-/-}$ Mäusen mittels HE-Färbung 114
3.2.5.6 Hypoglykämie bei *Hspa4*$^{-/-}$ Mäusen 115
3.2.5.7 Histologische Untersuchungen der Muskeln von *Hspa4*$^{-/-}$ Mäusen mittels HE-Färbung 117
3.2.5.8 Expressionsanalyse für das HSPA4 Protein im Gehirn mittels immunhistologischer Untersuchungen 119

3.3 *Hspa4l Hspa4* 120

3.4 *Hsph1* 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 *Hsph1* Gens 131
3.4.2.1 Strategie zur Inaktivierung des *Hsph1* 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-*Hsph1* und Selektion homolog rekombinierter *Hsph1*$^{+/-}$ ES-Zellen 136

4 DISKUSSION 138

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse 138
4.1.1 *Hspa4l* 138
4.1.2 *Hspa4* 139
4.1.3 *Hspa4l Hspa4* 140
4.1.4 *Hsph1* 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 *Hspa4l* 148

4.3.1 Funktionsanalyse des *Hspa4l* Gens 148

4.4 *Hspa4* 152

4.4.1 Molekularer Ursprung der beiden *Hspa4* Transkripte 152

4.4.2 Funktionsanalyse des *Hspa4* 153

4.4.2.1 Zur Analyse der Infertilität der *Hspa4*$^{-/-}$ Mäuse des Hybrid-Hintergrunds 153

4.4.2.2 Zur Analyse der Wachstumsretardierung und postnatalen Letalität der *Hspa4*$^{-/-}$ Mäuse des Inzucht-Hintergrunds 154

4.5 *Hspa4l Hspa4* 161

4.6 *Hsph1* 163

4.6.1 Genomische Strukturanalyse des *Hsph1* 163

4.6.2 Funktionsanalyse des *Hsph1* 164

5 ZUSAMMENFASSUNG 165

6 LITERATURVERZEICHNIS 168

7 ANHANG 181

LEBENSLAUF 182

DANKSAGUNG 183