

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

Genetische und histologische Charakterisierung der Apolipoprotein E knockout Ratte

Bachelorarbeit

im Studiengang Biotechnologie

Vorgelegt von
Carolin Zerahn
18. Oktober 2011

Erstgutachter: Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker
Zweitgutachter: Dr. Daniel Schürmann

Die Bachelorarbeit wurde betreut und erstellt im Labor der CSL Behring GmbH in Marburg

Danksagung

An dieser Stelle danke ich Herrn Dr. Daniel Schürmann ganz herzlich für die Bereitstellung des Themas sowie für die Übernahme der Zweitbegutachtung meiner Arbeit. Durch sein unglaubliches Engagement, seine Diskussionsbereitschaft und die professionelle Betreuung hat er maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker von der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg möchte ich mich für die Übernahme der Erstbegutachtung der vorliegenden Arbeit bedanken.

Außerdem möchte ich mich für die großartige Unterstützung, die mehr als herzliche Aufnahme in das Team und die vielen schönen Momente durch die CSL Behring-Mitarbeiter der Abteilung Pharmakologie/ Toxikologie bedanken. Mein besonderer Dank gilt Marion Hofmeister, Jennifer Krupka und Patrick Letmade für ihre freundliche Hilfsbereitschaft, und dafür, dass sie mir bei praktischen Fragen stets zur Seite standen.

Großer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium der Biotechnologie überhaupt erst ermöglichten. Ich bedanke mich herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich stets unterstützt und, wenn auch nur indirekt, die Erstellung dieser Arbeit vorangetrieben haben.

Inhaltsverzeichnis

1 Zielsetzung	1
2 Einleitung	3
2.1 Tiermodelle in der pharmazeutischen Forschung	3
2.2 Generierung von transgenen Mäusen mittels homologer Rekombination	4
2.3 Generierung von transgenen Tieren mittels homologer Rekombination und Non-Homologous End Joining	5
2.4 Lipoproteine und Apolipoproteine	8
2.5 Humanes Apolipoprotein E	10
2.6 Murines Apolipoprotein E und Folgen des Gen-knock-outs	11
2.7 Die Alzheimer-Erkrankung	12
3 Material und Methoden	15
3.1 Materialien	15
3.1.1 Versuchstiere	15
3.1.2 Verwendete Kits	16
3.1.3 Oligonukleotide	17
3.1.4 DNA-Größenmarker	20
3.1.5 Vektor	20
3.1.6 Enzyme	20
3.1.7 Bakterienstämme und Medien	21
3.1.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Genotypisierung	21
3.1.9 Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Gehirnpräparation und die Histologie	23
3.1.10 Chemikalien, Substanzen und Puffer	24
3.1.11 Ansätze für die Genotypisierung	26
3.1.12 Ansätze für die Histologie	26
3.2 Methoden	27
3.2.1 Genotypisierung	27
3.2.1.1 Serumgewinnung durch Punktion des retrobulbären Venenplexus	27
3.2.1.2 DNA-Reinigung	27
3.2.1.3 Touchdown Polymerase-Kettenreaktion	28
3.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion nach Vorgaben des SAGE™ Labs Protokolls	30
3.2.1.5 Standard Polymerase-Kettenreaktion	31

3.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese	32
3.2.1.7 DNA-Extraktion aus einem Agarosegel	32
3.2.1.8 Integration von DNA in einen Vektor	32
3.2.1.9 Transformation	33
3.2.1.10 Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> -Kulturen	33
3.2.1.11 Restriktionsverdau	34
3.2.1.12 DNA-Reinheitsanalyse und Konzentrationsbestimmung	34
3.2.1.13 DNA-Sequenzierung	34
3.2.2 Histologische Untersuchungen	35
3.2.2.1 Gehirnpräparation	35
3.2.2.2.Histochemische Untersuchungen	36
3.2.2.3 Färbung mit Hämatoxylin und Eosin	36
3.2.2.4 Färbung mit Kongorot und Hämatoxylin	37
3.2.2.5 Immunhistochemische Untersuchungen	37
3.2.2.6 Free Floating	40
4 Ergebnisse	42
4.1 Genotypisierung	42
4.1.1 DNA-Amplifikation mittels TD PCR	42
4.1.2 DNA-Amplifikation mittels PCR nach Vorgabe des Sage TM Labs Protokolls	44
4.1.3 DNA-Amplifikation mittels Standard PCR	45
4.1.4 Klonierung in den Expressionsvektor pCR [®] 4-TOPO [®]	47
4.2 Histologische Untersuchungen	50
4.2.1 Färbung mit Hämatoxylin und Eosin	50
4.2.2 Färbung mit Kongorot und Hämatoxylin	51
4.2.3 NeuN	52
4.2.4 Iba1	54
4.2.5 MPO	55
4.2.6 GFAP	55
5 Diskussion	57
6 Zusammenfassung	64
7 Literaturverzeichnis	65
7.1 Publikationen	65
7.2 Bücherquellen	69
8 Anhang	70

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Bindung von Zinkfinger-nuklease-Paaren an doppelsträngige DNA.....	8
Abbildung 2:	Aufbau eines Lipoproteins.....	10
Abbildung 3:	Diagramm eines Neurons von einem Alzheimer-Patienten.....	14
Abbildung 4:	Bindungsstellen des verwendeten Zinkfinger-nuklease-Paares.....	16
Abbildung 5:	DNA-Sequenz des ApoE-ko- und des wt-Tieres nach SAGE™ Labs Angaben.....	16
Abbildung 6:	Primer-Hybridisierung an die DNA.....	18
Abbildung 7:	Analyse der DNA-Amplifikation der TD PCR mit einem 2 %igen Agarosegel.....	43
Abbildung 8:	Analyse der DNA-Amplifikation mittels PCR nach Vorgabe des Sage™ Labs Protokolls mit einem 2 %igen Agarosegel.....	44
Abbildung 9:	Analyse der DNA-Amplifikation der Standard PCR mit einem 2 %igen Agarosegel.....	46
Abbildung 10:	Restriktionsverdau des pCR®4-TOPO®-Vektors mit vermeintlich integrierter DNA-Sequenz auf einem 1 %igem Agarosegel.....	49
Abbildung 11:	HE-Färbung des Hippocampus und des Striatums der wt- und ApoE-ko-Ratte.....	51
Abbildung 12:	Kongorot-Hämatoxylin-Färbung des Hippocampus der wt- und ApoE-ko-Ratte.....	52
Abbildung 13:	NeuN-Färbung des Hippocampus der wt- und ApoE-ko-Ratte.....	53
Abbildung 14:	NeuN-Färbung des Cortex der wt-Ratte.....	53
Abbildung 15:	Iba1-Färbung des Cortex der ApoE-ko-Ratte.....	54
Abbildung 16:	GFAP-Färbung des Hippocampus der wt- und ApoE-ko-Ratte.....	56
Abbildung 17:	Vektorkarte des pCR®4-TOPO®-Vektors (Fa. Invitrogen).....	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über die verwendeten Kits.....	17
Tabelle 2:	Kommerziell erworbene Primer.....	18
Tabelle 3:	Übersicht über die Enzyme für die Genotypisierung.....	20
Tabelle 4:	Übersicht über die Bakterienstämme für die Genotypisierung.....	21
Tabelle 5:	Übersicht über die für die Genotypisierung verwendeten Geräte.....	21
Tabelle 6:	Übersicht über die für die Genotypisierung verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	22
Tabelle 7:	Übersicht über die für die Gehirnpräparation und Histologie verwendeten Geräte.....	23
Tabelle 8:	Übersicht über die für die Gehirnpräparation und Histologie verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	23
Tabelle 9:	Übersicht über die für die Genotypisierung verwendeten Chemikalien, Substanzen und Puffer neben den in den Kits vorhandenen Lösungen.....	24
Tabelle 10:	Übersicht über die für die Gehirnpräparation und Histologie verwendeten Chemikalien, Substanzen und Puffer neben den in den Kits vorhandenen Lösungen.....	25
Tabelle 11:	Reaktionsansatz für die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels TD PCR.....	29
Tabelle 12:	Programmparameter der TD PCR.....	29
Tabelle 13:	Reaktionsansatz für die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Standard PCR nach Vorgabe des SAGE™ Labs Protokoll.....	30
Tabelle 14:	Programmparameter der Standard PCR nach Vorgabe des SAGE™ Labs Protokoll.....	31
Tabelle 15:	Programmparameter der Standard PCR.....	31
Tabelle 16:	Für die immunhistochemischen Untersuchungen verwendete Primärantikörper.....	38

Abkürzungsverzeichnis

AB-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
Apo	Apolipoprotein
ApoE	Apolipoprotein E
APP	amyloid precursor protein
AS	Aminosäuren
A β	β -Amyloid
bp	Basenpaare
dA	Desoxyadenosin
DAB	3-3'-Diaminobenzidin
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	2'-Desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphat
dT	Desoxythymidin
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ES	embryonale Stammzelle
Fa.	Firma
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GOI	gene of interest
HDL	high density lipoprotein
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HR	homologe Rekombination
HRP	horseradish peroxidase
Iba1	ionized calcium-binding adapter molecule 1

IDL	intermediate density lipoprotein
IgG	Immunoglobulin G
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
ki	knock-in
ko	knock-out
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LDL	low density lipoprotein
LP	Lipoprotein
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger RNA
NeuN	neuronal nuclei
NHEJ	non-homologous end joining
ORF	open reading frame
<i>p.a.</i>	<i>pro analysis</i>
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	ribonucleic acid
rpm	rotations per minute
S.O.C.-Medium	salt-optimized carbon medium
T _A	annealing temperature
TAE	Tris-acetate EDTA
TBST	Tris-buffered saline Tween 20
T _M	melting temperature

UV	Ultraviolet
VLDL	very low density lipoprotein
wt	Wildtyp
ZF	Zinkfinger
ZFN	Zinkfingernuklease
ZFP	Zinkfingerprotein
ZNS	Zentralnervensystem

1 Zielsetzung

Das Pharmaunternehmen CSL Behring GmbH, an dessen Marburger Standort diese Bachelorarbeit erstellt wurde, ist eines der weltweit führenden Hersteller von Plasmaderivaten für die Bereiche Gerinnungsstörung, Intensivmedizin und Immunglobuline. Das Unternehmen beschäftigt sich neben der Produktion mit Grundlagen- und angewandter Forschung zur Produktentwicklung.

Arzneimitteluntersuchungen dienen der Entwicklung sowie Testung neuer Biotherapeutika und werden in Tiermodellen durchgeführt. In dieser Arbeit werden insbesondere transgene Tiere betrachtet, die gezielt gentechnisch verändert und gezüchtet werden, um auf den Menschen übertragbare Erkenntnisse zu gewinnen. Soll beispielsweise ein Medikament gegen die Blutungsneigung von Hämophilie-A-Patienten an Mäusen getestet werden, müssen die Nagetiere eine mit dem Menschen vergleichbare Gerinnungsstörung aufweisen. Die Hämophilie-A resultiert aus einer genetisch bedingten Verminderung des Gerinnungsfaktor VIII. Den Mäusen wird daher das entsprechende Gen gezielt deaktiviert. Das bisher übliche Verfahren macht sich die homologe Rekombination zur Generierung der sogenannten knock-out-Tiere (ko) zu Nutze und kann ebenfalls für knock-in-Mutationen (ki) verwendet werden. Diese Methode ist in Mäusen etabliert, bei vielen anderen Säugetieren wurde bisher nur eine sehr geringe Effizienz erzielt oder war nicht erfolgreich. Die Generierung von ko- oder ki-Tieren benötigt unter Anwendung dieser Technik 12 - 18 Monate.

Das amerikanische Unternehmen Sigma-Aldrich lizenziert eine neue vielversprechende Methode von Sangamo BioSciences, dem weltweit führenden Hersteller der sogenannten Zinkfingertechnologie. Die gezielte Generierung von ki's mittels Zinkfingernukleasen (ZFN) basiert ebenfalls auf der homologen Rekombination, während ko-Mutanten durch die Nicht-Homologe-End-Verknüpfung entstehen. Die Zinkfingertechnologie ist in nur 4 - 6 Monaten in verschiedenen Organismen anwendbar.

Die CSL Behring GmbH hat von SAGETM Labs, ein Tochterunternehmen von Sigma-Aldrich, eine Wildtyp- (wt) und eine mit ZFN generierte Apolipoprotein E (ApoE) ko-Ratte erworben. Das ko-Tier wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion und Western Blot von SAGETM Labs hinsichtlich der Mutation des ApoE-Gens analysiert, und die DNA der ApoE-ko- und wt-Ratte wurde sequenziert. Die Unterlagen über die Genotypisierung sowie die DNA-Sequenzen beider Tiere wurden von SAGETM Labs zur Verfügung gestellt. Die Aufgabe während der Bachelorarbeit besteht darin, die ko-Ratte erneut genotypisch zu

untersuchen und mit der wt-Ratte zu vergleichen, um die Mutation des ApoE-Gens sicher zu belegen. Der Sequenzvergleich mit der von SAGETM Labs ermittelten DNA-Sequenz sollte die Funktionalität des neuen ko-Systems, und die Übertragbarkeit auf andere Gene und weitere Spezies nachweisen. Des Weiteren wird die ApoE-ko-Ratte im Zuge dieser Arbeit als Tiermodell zur histologischen Untersuchung einer neuronalen Alzheimer-Erkrankung genutzt. Aufgrund der Mutation des ApoE-Gens exprimiert das Tier kein ApoE-Protein, wodurch der Lipidmetabolismus gestört wird. Die ApoE-ko-Ratte dient daher als Modellorganismus für Arteriosklerose, Alzheimer und Nervenregeneration nach einer Schädigung.

2 Einleitung

In der Einleitung wird zunächst auf die Bedeutung von Tiermodellen in der pharmazeutischen Forschung eingegangen. Danach wird das in Mäusen etablierte Verfahren zur Generierung von transgenen Tieren beschrieben und mit der innovativen Zinkfingernuklease-Methode verglichen. Die Thematisierung des Lipidmetabolismus erfolgt im Hinblick auf die Funktion von Apolipoprotein E (ApoE) und den Auswirkungen des Gen-knock-outs. Abschließend wird die Alzheimer-Erkrankung beschrieben.

2.1 Tiermodelle in der pharmazeutischen Forschung

Die pharmazeutische Forschung hat das Ziel Therapeutika zu entwickeln, und betreibt Ursachenforschung humaner Krankheiten. Die Erforschung der Genfunktionen ist dabei von großer Bedeutung. Die physiologische Funktion eines Gens wird vor allem durch Inaktivierung oder Veränderung dessen Funktion untersucht. Mit Hilfe der Genmanipulation werden knock-in- (ki) oder knock-out-Tiere (ko) generiert, die als Modellorganismen verwendet werden. Humane Krankheiten können simuliert und dessen Mechanismen untersucht werden (Schenkel 2006).

Die Maus stellt das am häufigsten verwendete Tiermodell dar. Mäuse eignen sich für genetische Studien, während die Ratte wegen ihrer Größe als Tiermodell für physiologische und biotherapeutische Studien bevorzugt wird (Jacob 1999). Beide Nagetiere lassen sich kostengünstig halten und besitzen eine für die Züchtung vorteilhafte kurze Generationsdauer. Allerdings finden die aus den Tiermodellen gewonnenen Erkenntnisse nur bedingt Anwendung auf den Menschen, weil die Physiologie und die Pathophysiologie eines Tiermodells nicht immer analog übertragbar sind (Schenkel 2006).

Das Genom der Tiermodelle wird für die Erforschung der Genfunktion und der Krankheitsmechanismen modifiziert. Sogenannte transgene Tiere besitzen spezifische Mutationen, die sie an ihre Nachkommen vererben. Die Mutation kann darin bestehen, dass Gene inaktiviert und die Proteinbiosynthese unterbunden (knock-out), bzw. die Transkriptionseffizienz eines Gens mit der damit verbundenen Translation gesenkt wird

(knock-down). Außerdem können ein oder auch mehrere Gene in das Genom eines Tieres eingefügt und exprimiert werden (knock-in).

Es gibt verschiedene Methoden, um transgene Tiere zu generieren. Die wichtigsten Techniken sind die Vorkerninjektion, mit der ein knock-down erzielt wird, und die homologe Rekombination (HR) zur Generierung von ko's und ki's. Die Vorkerninjektion wird in vielen Spezies erfolgreich angewendet, allerdings ist die Lokalisation der Mutation nicht vorhersehbar. Dagegen wird bei der HR Template-DNA in das Genom gezielt eingefügt (Schenkel 2006). Dieses Verfahren ist jedoch nur für Mausmodelle etabliert, da es bisher nicht gelang für andere Spezies pluripotente embryonale Stammzellen (ES) effektiv zu kultivieren, und diese nach der Transgenese in die Keimbahn zu transmittieren (Tong et al. 2011). Weitere Schwierigkeiten bereiten die geringe Effizienz der HR in Säugetierzellen und die hohe Rate unspezifischer DNA-Integrationen in das Wirtsgenom (Vasquez et al. 2001). Für die gezielte und effektive Veränderung des Genoms wurde ein Zinkfinger-nuklease-Verfahren (ZFN) etabliert. In den folgenden Kapiteln wird zum besseren Verständnis zunächst die HR zur Generierung von transgenen Mäusen, und dann die ZFN-Technik beschrieben. Dieses Verfahren kann auf eine Vielzahl von Spezies übertragen werden und ist bereits beispielsweise in Pflanzen, Ratten, *Drosophila* und Zebrafischen etabliert (Mashimo et al. 2010; Geurts et al. 2009; Doyon et al. 2008).

2.2 Generierung von transgenen Mäusen mittels homologer Rekombination

Die gezielte Genmodifikation (engl. gene targeting) mittels HR ist in Mäusen etabliert und ermöglicht spezifische Genmutationen innerhalb von 12 - 18 Monaten (Mashimo et al. 2010). Ursprünglich wurde diese Technik zur Generierung von ko's verwendet. Inzwischen wird die Methode auch für Mutanten genutzt, in denen ein Gen modifiziert oder integriert werden soll (Schenkel 2006).

Die Generierung der Modellorganismen bedarf der künstlichen Herstellung eines Vektors. Dieser enthält homologe Sequenzen des Zielgens, um später die Hybridisierung mit dem Mausgenom zu ermöglichen, die gewünschte Mutation in einem Template, Markergene und eine Restriktionsschnittstelle. Die Vektoren für ko- und ki-Mutationen sind sich sehr ähnlich, allerdings muss bei letzteren darauf geachtet werden, dass das zu mutierende Gen im Vektor durch die Lage der Markergene nicht seine Funktion verliert. Der Vektor wird mit einem

Restriktionsenzym linearisiert, und beispielsweise durch Elektroporation in Mausblastozysten transfiziert (Hall et al. 2009). Diese ES-Zellen sind pluripotent und können, im Gegensatz zu ES aus anderen Spezies, unter Verhinderung der Ausdifferenzierung *in vitro* kultiviert werden (Tong et al. 2011). Der Einbau der mutierten DNA erfolgt durch den zelleigenen Mechanismus der HR. Die HR beschreibt die Zusammenlagerung der homologen Sequenzen des Zielgens und der Vektorsequenz, welche gegen die Mutation auf dem Zielgen ausgetauscht wird (Hall et al. 2009). Dieser Mechanismus findet in ungefähr einer von 10^5 bis 10^7 Zellen statt (Vasquez et al. 2001). Die Verwendung von Markern ist daher notwendig, um rekombinante Zellen zu selektieren. Mit Hilfe der Sequenzierung kann die Genommodifikation der Zellen überprüft werden. Die Mutation führt bei ko-Tieren beispielsweise zur Inaktivierung von Exons im Genlocus der Wirtszelle. Bei ki-Mutanten wird meistens ein Exon so mutiert, dass sich das kodierende Protein verändert. Anschließend werden die ES-Zellen in eine Blastozyste eingesetzt und in die Gebärmutter einer pseudoträchtigen Leihmutter implantiert. Die heranwachsenden Tiere enthalten in einigen Zellen und Fortpflanzungsorganen die Mutation. Durch Kreuzung dieser chimären Tiere werden homozygote Tiere generiert, bei denen in allen Zellen das Gen mutiert ist (Schenkel 2006).

2.3 Generierung von transgenen Tieren mittels homologer Rekombination und Non-Homologous End Joining

Das amerikanische Unternehmen Sigma-Aldrich lizenziert die sogenannte Zinkfinger-Technologie (ZF) von Sangamo BioSciences (Geurts und Moreno 2010). Diese Technologie ermöglicht die gezielte Genmodifikation in verschiedenen Spezies innerhalb von nur 4 - 6 Monaten (Mashimo et al. 2010). Die Methode ist bereits in vielen verschiedenen Organismen, beispielsweise in Pflanzen, Ratten, *Drosophila* und Zebrafischen erfolgreich erprobt (Mashimo et al. 2010; Geurts et al. 2009; Doyon et al. 2008). Anders als beim zuvor beschriebenen Verfahren entstehen keine chimären Tiere, da Zygoten anstelle der aus einem späteren Entwicklungsstadium stammenden Blastozysten verwendet werden. Heterozygote Tiere werden gekreuzt um homozygote Tiere zu erhalten (Geurts et al. 2009).

Zunächst wird mit Hilfe von Endonukleasen ein Doppelstrangbruch in der genomischen DNA erzeugt. Natürlich vorkommende Restriktionsenzyme eignen sich nicht für die gezielte Genmanipulation, da sie meistens nur eine 4 - 6 bp große DNA-Sequenz erkennen und damit zu unspezifisch sind (Kim et al. 1996). Ein lange verfolgtes Ziel war es daher Restriktionsenzyme so zu verändern, dass sie an eine längere Erkennungssequenz binden. 1994 berichteten Kim und Chadrasegaran von der Konstruktion der ersten chimären Restriktionsendonuklease. Die DNA bindende Ultrabithorax Homöodomäne von *Drosophila* wurde mit der Schneidedomäne der *FokI* Endonuklease aus dem *Flavobacterium okeanokoites* verbunden (Kim und Chadrasegaran 1994). Mittlerweile basieren die bedeutendsten chimären Nukleasen auf DNA-bindenden Zinkfingerproteinen (ZFP) (Chandrasegaran und Smith 1999). Die ZF besitzen im Gegensatz zu den Homöodomänen eine modulare Struktur, wodurch sequenzspezifische ZFN designt werden können (Kim et al. 1996). ZFN sind Proteine, die aus einer C-terminalen DNA-Schneidedomäne, der Endonuklease *FokI*, und einer N-terminalen ZF-DNA-Erkennungsdomäne bestehen. Für die ZFN werden Cys₂His₂-ZF verwendet, die aus 30 Aminosäuren (AS) bestehen. Die Proteine nehmen eine $\beta\beta\alpha$ -Konformation ein und falten sich um ein zentrales Zink-Ion (Zn²⁺), wodurch sie die namensgebende Fingerform erhalten. Ein ZF bindet an doppelsträngige DNA, indem die α -Helix des Proteins in die große Furche der DNA-Stränge eingefügt wird, und Wechselwirkungen mit einem Basentriplett eingeht (Kim et al. 1996; Porteus und Carroll 2005). Daraus folgt, dass die Kombination von drei oder mehr ZF die hochspezifische Erkennung und die gezielte Bindung an eine DNA-Sequenz erlaubt, und dass bei Modifikation der AS-Zusammensetzung die DNA-Spezifität verändert wird. Die Erkennungsdomäne der Zinkfinger-Motive kann daher auf mRNA- oder DNA-Ebene spezifisch designt werden, und zusammen mit *FokI* erhält man hochselektive ZFN (Porteus und Carroll 2005).

Zum Schneiden der DNA muss *FokI* dimerisieren, weshalb ZFN-Paare erforderlich sind (Porteus und Carroll 2005). Die ZFN-Paare gelangen in Form von kodierender mRNA oder Plasmid-DNA durch Mikroinjektion in das Vorkernstadium einer Zygote. Alternativ kann die ZFN-mRNA in das Zytoplasma der befruchteten Eizelle injiziert werden (Geruts et al. 2009). In der Zelle wird die mRNA oder DNA transient abgelesen und ZFN werden exprimiert. Die ZFN binden hochspezifisch in invertierter Orientierung an die DNA. Zwischen den Bindungsstellen liegt meistens eine 6 bp-Nukleotidsequenz, welche die Zusammenlagerung der beiden Endonukleasen erlaubt (siehe Abb. 1). Die dimerisierten Schneidedomänen sind nicht sequenzspezifisch und erzeugen einen Doppelstrangbruch in jeder beliebigen Sequenz.

Der Strangbruch wird durch die zelleigene Nicht-Homologe-End-Verknüpfung (engl. non-homologous end joining, NHEJ) oder die HR repariert. Die NHEJ ist der in Säugetierzellen am häufigsten vorkommende Reparaturmechanismus. Wie der Name bereits suggeriert, ist kein Template mit homologen Sequenzen erforderlich, weshalb der Mechanismus fehleranfällig ist (Geurts und Moreno 2010). Es entsteht eine zufällige Deletion oder Integration von Nukleotiden meistens im offenen Leseraster (engl. open reading frame, ORF) eines Exons. Die Mutation bewirkt ein Gen-ko und führt damit zum Verlust der Proteinbiosynthese (Mashimo et al. 2010).

Die HR wird dagegen nach der Generierung des Doppelstrangbruchs stimuliert, wenn eine Donor-Plasmid-DNA mit homologen Sequenzen mit der ZFN-mRNA in den Vorkern einer Zygote co-transfiziert wird (Geurts und Moreno 2010; Cui et al. 2011). Die homologen Sequenzen des Zielgens und der Insert-DNA lagern sich zusammen und werden ausgetauscht. Die Arbeitsgruppe um Urnov berichtet, dass in rund 20 % der transfizierten Zellen ein ki generiert wird, auch ohne Verwendung von Selektionsmarkern (Urnov et al. 2005). Die Effizienz der ZFN-Methode ist deutlich höher als bei dem bisher üblichen Verfahren in Mausblastozysten, da der Doppelstrangbruch die HR stimuliert (Geurts und Moreno 2010). Die Effektivität und Spezifität der HR zeigt das Potential der ZFN Methode, die zukünftig für die Gentherapie monogener Krankheiten verwendet werden könnte (Urnov et al. 2005; Porteus und Carroll 2005).

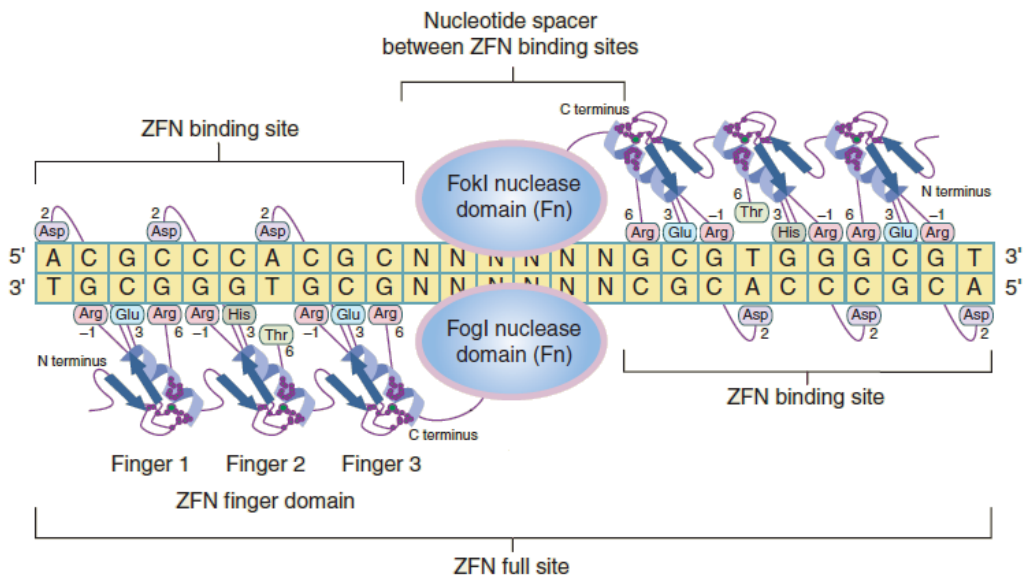


Abbildung 1: Bindung von Zinkfinger-nuklease-Paaren an doppelsträngige DNA

Die Abbildung zeigt zwei ZFN, die jeweils aus drei Zinkfingern bestehen und mit FokI verbunden sind. Das ZFN-Paar bindet in invertierter Orientierung an eine DNA-Zielsequenz, wobei jeder ZF mit einem Basentriplett interagiert. Zwischen den Bindungsstellen liegt eine 6 bp-Nukleotidsequenz, welche die Zusammenlagerung der beiden Endonukleasen ermöglicht. Die sequenzunspezifische Endonuklease dimerisiert und erzeugt einen Doppelstrangbruch in jeder beliebigen Sequenz. Diese Abbildung ist eine Modifikation der Abbildung 2 von Porteus und Carroll 2005.

2.4 Lipoproteine und Apolipoproteine

Lipide werden in Säugetieren in mizellenähnlichen Molekülkomplexen, den sogenannten Lipoproteinen (LP) transportiert. LP bestehen aus einem lipophilen Inneren und aus einer amphiphilen Hülle, in die Proteine eingelagert sind. Unpolare Triacylglycerine und Cholesterinester bilden den hydrophoben Kern. Die Außenschicht besteht aus Phospholipiden und Cholesterinen, sowie aus den sogenannten Apolipoproteinen (Apo) (siehe Abb. 2) (Horn 2009).

Es gibt verschiedene Apo (die Hauptgruppen sind A, B, C und E), die als Strukturelemente, als Rezeptor-Liganden oder als Enzymaktivatoren dienen. Die Apo-Zusammensetzung ist in den LP unterschiedlich und verändert sich mit der Verstoffwechslung der LP. Die LP werden in Chylomikronen, VLDL, IDL, LDL und HDL klassifiziert und unterscheiden sich in der Kombination der einzelnen Komponenten, und damit in ihrer Größe und Dichte (Horn 2009).

Chylomikronen sind die größten LP und transportieren die im Darm resorbierten Nahrungslipide, hauptsächlich Triacylglycerine, unter Umgehung der Pfortader direkt in die Lymphe. Von dort aus gelangen die Chylomikronen in die Peripherie, wo das ApoCII als Cofaktor für die endotheliale Lipoproteinlipase fungiert und diese aktiviert. Das Enzym spaltet Triacylglycerine in Glycerin und freie Fettsäuren, die insbesondere von Muskel- und Fettzellen aufgenommen werden. Die verbliebenen Chylomikron-Remnants binden mittels ApoE an Leberrezeptoren, werden endozytiert und in VLDL (engl. very low density lipoprotein) umgewandelt. Die VLDL enthalten von der Leber nicht verwertete und neu synthetisierte Lipide, ApoB₁₀₀, ApoE und ApoCII, und werden ins Blut sezerniert. ApoCII aktiviert die Lipoproteinlipase, wodurch Triacylglycerine gespalten werden. Die freien Fettsäuren werden an die peripheren Gewebe abgegeben und ApoCII wird auf die HDL (engl. high density lipoprotein) übertragen, wodurch die VLDL an Größe verlieren (Silbernagel und Despopoulos 2003). Es entstehen IDL (engl. intermediate density lipoprotein), die zum größten Teil über den ApoE-Leberrezeptor aufgenommen und erneut in VLDL umgewandelt werden. Aus den restlichen IDL entstehen durch Kontakt mit hepatischer Lipase LDL (engl. low density lipoprotein). Durch Abgabe von Triacylglycerinen und ApoC und E erhöht sich der prozentuale Cholesteringehalt und die Partikel werden kleiner. Die LDL verbleiben einige Tage im Körper und stellen einen ständig verfügbaren Cholesterinspeicher dar. Bei einem hohen Cholesterinspiegel bleiben die LP länger im Blut und werden beispielsweise oxidiert, wodurch das Arterioskleroserisiko steigt. Die LDL binden anschließend entweder an den ApoE/ApoB₁₀₀-Leber-Rezeptoren, oder an LDL-Rezeptoren in peripheren Geweben, und werden aufgenommen (Horn 2009).

Die gerade beschriebene Funktion der Chylomikronen/ -Remnants, VLDL, IDL und der LDL besteht in der Versorgung der Zellen mit Triacylglycerinen und Cholesterinen. Die Funktion der HDL besteht dagegen in der Aufnahme überflüssigen Cholesterins aus der Peripherie und dem Blut. Die HDL regulieren außerdem die Verteilung der Triacylglycerine und der Cholesterinester unter den LP, und nehmen ApoC und E von den VLDL und IDL auf, um diese auf die Chylomikronen zu übertragen (Horn 2009). Das ApoAI der HDL aktiviert die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase, wodurch Cholesterin teilweise mit Lecithin verestert wird. Die Cholesterinester gelangen in das Innere der HDL und werden gespeichert. Die HDL transportieren Cholesterin und Cholesterinester für die Gallensäureproduktion zur Leber oder zu Steroidhormon-produzierenden Geweben. Außerdem wird Cholesterin in Zellmembranen eingebaut und sorgt für deren Fluidität und mechanische Stabilität (Silbernagel und Despopoulos 2003).

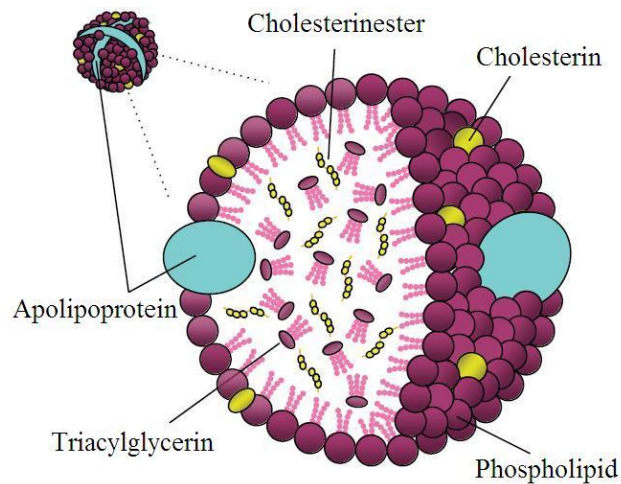


Abbildung 2: Aufbau eines Lipoproteins

Die Außenschicht eines mizellenähnlichen LP's besteht aus amphiphilen Phospholipiden und Cholesterinen, sowie aus Apolipoproteinen. Der lipophile Kern enthält Triacylglycerine und Cholesterinester. Diese Abbildung ist eine Modifikation der Box 1 von Leduc et al. 2011.

2.5 Humanes Apolipoprotein E

ApoE ist ein wichtiges Apo der Chylomikron/-Remnants, der VLDL, der IDL und der HDL (Horn 2009). Es vermittelt die Bindung der LP an die LDL-Rezeptor-Familie, und sorgt dadurch für die endozytische Aufnahme der LP in Leberzellen und der Peripherie. ApoE verfügt außerdem über eine Schlüsselrolle in dem Lipidtransport im Zentralnervensystem (ZNS), und ist an der Neuronenregenerierung nach einer Verletzung beteiligt (Hatters et al. 2006; Mahley et al. 2009).

ApoE wird in verschiedenen Organen exprimiert, beispielsweise in der Leber, dem Gehirn und in den Nieren (Mahley 1988). Humanes ApoE besteht aus einer Polypeptidkette mit 299 AS und besitzt ein Molekulargewicht von 34 kDa. Das Plasmaprotein zeigt einen Polymorphismus und weist drei häufige Isoformen (ApoE2, E3 und E4) auf, die auf einem Gen kodieren (Mahley et al. 2009). Das ApoE-Gen enthält vier Exons und drei Introns und kodiert auf Chromosom 19 (Taylor et al. 1987). Die Allele ϵ_2 , ϵ_3 und ϵ_4 unterscheiden sich in ihrer Häufigkeit, wobei ϵ_3 am häufigsten und ϵ_2 am seltensten vorkommt. Die ApoE-Isoformen besitzen verschiedene AS an den Positionen 112 und 158. ApoE3 enthält Cys-112 und Arg-158, wohingegen ApoE4 an beiden Stellen Arginin besitzt und ApoE2 Cysteine enthält (Mahley et al. 2009). Dieser Polymorphismus hat einen großen Einfluss auf

die Struktur und die Funktion des Apo's. Die drei Isoformen sind daher an der Pathogenese von verschiedenen Krankheiten beteiligt. ApoE2 wird beispielsweise mit Typ-III-Hyperlipoproteinämie in Verbindung gebracht. Die Typ-III-Hyperlipoproteinämie zeichnet sich durch erhöhte Plasmakonzentrationen von Cholesterinen und Triacylglycerinen aus. ApoE2 und 4 fördern Arteriosklerose und damit kardiovaskuläre Erkrankungen. ApoE4 stellt außerdem ein Risikofaktor für eine Alzheimer-Erkrankung dar (Hatters et al. 2006; Mahley et al. 2009).

2.6 Murines Apolipoprotein E und Folgen des Gen-knock-outs

Das murine ApoE besteht aus 294 AS und besitzt ein Molekulargewicht von 34 kDa. Das ApoE-Gen enthält vier Exons und drei Introns, und kodiert auf Chromosom 1 (Fung et al. 1986). Das murine wie das humane Plasmaprotein weisen mehrere Isoformen auf (Hussain et al. 1988). Während beim Menschen mitunter unterschiedliche Allele für die Isopeptide verantwortlich sind, basieren die murinen Isoformen auf posttranslationalen Modifikationen (Reardon et al. 1986).

Die für diese Arbeit verwendete ApoE-ko-Ratte verfügt über eine künstliche Mutation in Exon 3 des ApoE-Gens, wodurch die Proteinbiosynthese unterbunden wird. Die LP binden nicht mehr ApoE-vermittelt an die Leberrezeptoren, was die Metabolisierung der Lipoproteine inhibiert. Der Cholesterin- als auch Triacylglycerinmetabolismus des Tieres ist gestört mit direkten Folgeerscheinungen im Hinblick auf arteriosklerotische Plaqueformationen, Nervenregenerationsstörungen und eine Prädisposition der Alzheimer-Erkrankung (Stevenson et al. 1995; Choi et al. 2004; Raber et al. 1998). Die ApoE-ko-Ratte dient daher als Modellorganismus für Arteriosklerose, Alzheimer und Nervenregeneration nach einer Schädigung.

2.7 Die Alzheimer-Erkrankung

Alzheimer ist eine neurodegenerative nicht heilbare Erkrankung, welche in drei klinische Kategorien unterteilt werden kann: Die Betroffenen der früh ausbrechenden familiären Form erkranken oftmals vor ihrem 50. Lebensjahr. Dagegen erkranken die Patienten der weitaus häufigeren Spätform ab einem Alter von 65 Jahren. Die späte Form der Alzheimer-Erkrankung lässt sich weiter in die sporadische und die familiäre Variante differenzieren (Weisgraber und Mahley 1996). Die Alzheimer-Krankheit ist mit 60 - 80 % die am häufigsten vorkommende Demenz, und zeichnet sich durch eine Verschlechterung der kognitiven Leistungsfähigkeit sowie durch eventuelle Verhaltensauffälligkeiten und psychische Veränderungen der Betroffenen aus. Eine vorläufige Diagnose der Erkrankung basiert auf den klinischen Charakteristika und kann ausschließlich *post mortem* histopathologisch bestätigt werden. Die zellulären Veränderungen im Gehirn treten hauptsächlich im *Neocortex*, in limbischen Arealen, in Kernbereichen des Hirnstamms, aber auch im *Striatum* auf. Sie sind durch Plaques, intrazelluläre Neurofibrillenbündel und durch eine verminderte Neuronenanzahl gekennzeichnet (siehe Abb. 3) (Maier et al. 2011; Purves et al. 2004; Gearing et al. 1993). Außerdem werden entzündlichen Prozessen eine weitere Bedeutung in der Alzheimer-Pathogenese beigemessen (Harry et al. 2000).

Die extrazellulären Plaques enthalten primär Ablagerungen des β -Amyloid-Peptids ($A\beta$ -Peptid). γ - und β -Sekretasen zerschneiden das Amyloidvorläuferprotein (engl. amyloid precursor protein, APP) zu Peptidketten aus überwiegend 40 oder 42 AS, wobei das $A\beta$ -42-Peptid eine höhere Tendenz zur Aggregation aufweist als $A\beta$ -40. Die unlöslichen Amyloid-Plaques führen über noch unbekannte Mechanismen zum Verlust von Synapsen und zum Absterben der Nervenzellen. Zusammen mit den $A\beta$ -Ablagerungen treten histopathologische Neurofibrillenbündel auf. Die intrazellulären Neurofibrillen bestehen im Wesentlichen aus dem hyperphosphorylierten Tau-Protein. Das Tau-Protein bindet im gesunden Menschen an die Mikrotubuli, welche das Zytoskelett der Nervenzellen stabilisieren und den Stofftransport vom Perikaryon zu den Axonen und Synapsen gewährleisten. Die Tau-Proteine sind bei der Alzheimer-Pathogenese hyperphosphoryliert und aggregieren. Die Proteine binden nicht mehr an die Mikrotubuli und die Nervenzellen werden nicht mit den benötigten Substanzen versorgt, wodurch die Synapsen und Neurone absterben. Durch die Abnahme der Hirnmasse kommt es außerdem zum Mangel bzw. zu einem unkontrollierten Freisetzen von Neurotransmittern, wie z.B. Acetylcholin und Glutamat. Mit diesen

pathologischen Erscheinungen können die eingeschränkten geistigen Fähigkeiten der Patienten erklärt werden (Maier et al. 2011).

Die Alzheimer-Krankheit wird bei ca. 1 % aller Betroffenen autosomal-dominant vererbt und mit der früh ausbrechenden Alzheimer-Erkrankung assoziiert. Die kausalen Genvarianten des Präsilin-1- und -2-Gens und des APP-Gens kodieren auf den Chromosomen 1, 14 und 21, und sind direkt in die Entstehung des A β -Peptids involviert. Bereits die Mutation eines dieser Gene ruft eine Alzheimer-Erkrankung hervor (Maier et al. 2011; Purves et al. 2004; Duyckaerts et al. 2008). Die spät ausbrechende Alzheimer-Krankheit tritt in 99 % der Fälle auf, wobei die sporadische Form am häufigsten ist. Sowohl die sporadische als auch die familiäre Spätform wird mit dem ϵ 4-Allel des ApoE-Gens in Verbindung gebracht. Die erste Überlegung, dass ApoE an der Krankheitsentstehung beteiligt sein könnte, kam, als das Protein immunhistochemisch in den A β -Plaques und den Neurofibrillenbündeln nachgewiesen wurde (Weisgraber und Mahley 1996). ApoE4 erhöht die Wahrscheinlichkeit früher an Alzheimer zu erkranken (Maier et al. 2011). 60 - 80 % der Betroffenen tragen mindestens ein ϵ 4-Allel (Mahley et al. 2009). Das ϵ 4-Allel stellt keine kausale Genvariante, sondern eine Risikogenvariante dar, da nicht jeder Träger des ϵ 4-Allels eine Alzheimer-Pathogenese zeigt. Nur im Zusammenhang mit noch unbekanntem Faktoren fördert das ApoE4-Protein das Auftreten der Erkrankung (Maier et al. 2011). Es wird jedoch vermutet, dass ApoE4 für ein vermindertes Neuronenwachstum verantwortlich ist, und dass das Protein die Neuronenregenerierung nicht so effektiv unterstützt wie ApoE3 und 2 (Mahley und Rall 2000).

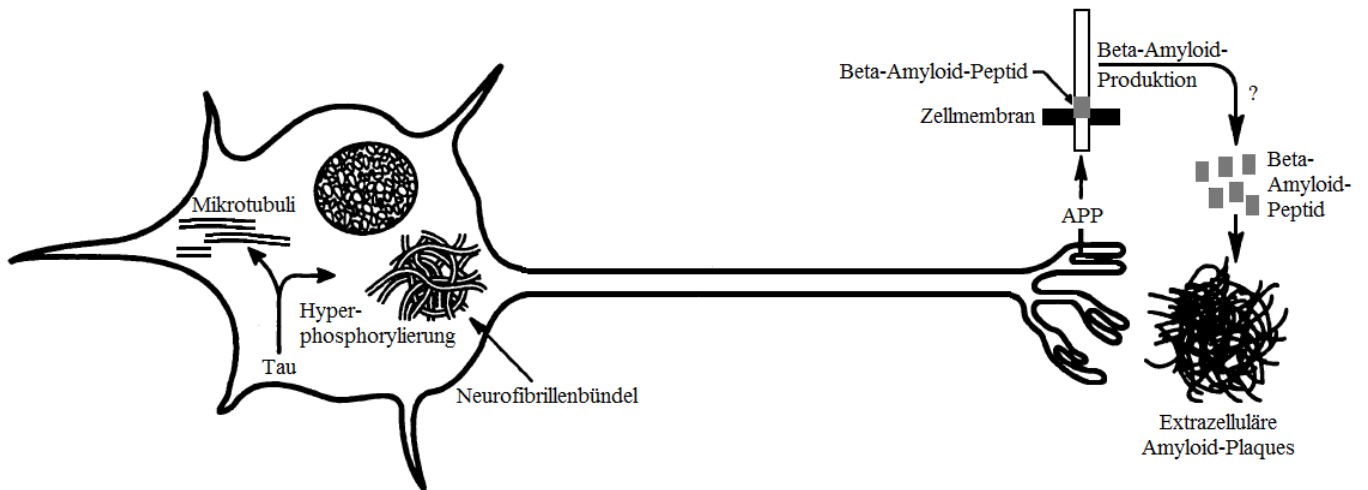


Abbildung 3: Diagramm eines Neurons von einem Alzheimer-Patienten

Die Alzheimer-Erkrankung ist durch A β -Plaques (rechts) und Neurofibrillenbündel (links) im Gehirn der Betroffenen gekennzeichnet. Die extrazellulären A β -Ablagerungen enthalten aggregierte A β -Peptide, die über bisher unbekannte Mechanismen aus transmembranen APP gebildet werden. Die intrazellulären Neurofibrillenbündel entstehen durch die Hyperphosphorylierung von Tau-Proteinen, die sich zusammenlagern und nicht mehr an die Mikrotubuli binden können. In den A β -Plaques sowie den Neurofibrillenbündeln lässt sich ApoE nachweisen. Diese Abbildung ist eine Modifikation der Abbildung 1 von Weisgraber und Mahley 1996.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Versuchstiere

Die ApoE-ko- und die Wildtyp-Ratte (wt) waren weibliche SD-Ratten, die bei Harlan Laboratories (Greenfield, USA) gezüchtet wurden. Die Tiere waren bei Lieferung 6 Wochen alt und besaßen ein Gewicht von 170 g und 157 g. Sie wurden jeweils in einem Macrolonkasten der Größe 4 untergebracht. In dem Tierraum herrschte ein Hell-Dunkel-Zyklus von je 12 Stunden bei 21 - 22 °C. Die Ratten hatten freien Zugang zu Standardfutter und Trinkwasser.

Für die Generierung der homozygoten ApoE-ko-Ratte wurde ein ZFN-kodierendes Plasmid in *E.coli* transformiert. Die Transkription der ZFN-mRNA erfolgte *in vivo* mittels T7-RNA-Polymerase. Die amplifizierte mRNA wurde anschließend in das Vorkernstadium eines einzelligen Embryos mikroinjiziert. Die ZFN-Paare wurden transient exprimiert und haben gezielt an die in Abbildung 4 dargestellte DNA-Sequenz in Exon 3 des ApoE-Genlocus gebunden. Der von den ZFN induzierte Doppelstrangbruch wurde durch die NHEJ geschlossen, und führte zur Deletion des entsprechenden ApoE-Genabschnitts. Diese Mutation bedingt den Verlust der ApoE-Transkription, und die Biosynthese des Peptids wird unterbunden. Das ko-Tier wurde mittels PCR und Western Blot von SAGETM Labs hinsichtlich der Mutation des ApoE-Gens analysiert. Der ApoE-ko-Ratte und dem Kontrolltier wurden zwecks Genotypisierung nach der Geburt ein Teil der Schwanzspitze kuptiert und die daraus gewonnene DNA sequenziert. Die Sequenzen beider Tiere sind in Abbildung 5 aufgeführt. Heterozygote ApoE-ko-Ratten wurden gekreuzt um homozygote Tiere zu erhalten.

5'-CAGGCCCTGAACCGCTTCTGGGATTACCTGCGCTGGG-3'
 3'-GTCCGGGACTTGGCGAAGACCCTAATGGACGCGACCC-5'

Abbildung 4: Bindungsstellen des verwendeten Zinkfinger-nuklease-Paares

Die ZFN binden an die in der Abbildung gelb dargestellte doppelsträngige DNA in Exon 3 des ApoE-Genlocus. Dazwischen liegt eine 6 bp-Sequenz, welche die räumliche Zusammenlagerung der FokI-Dimere erlaubt. Die dimerisierte Restriktionsendonuklease erzeugt einen Doppelstrangbruch in der DNA.

1301 CAAGAGCACT GTAGGTCCTG ACCCAGCCTT AA~~ACTT~~ACTA CTCTACACAG ~~GATGCCTGGC CGAGGGAGAG CTGGAGGTGA CAGATCAGCT CCCAGGGCAA~~
 GTTCTCGTGA CATCCAGGAC TGGGTCGGAA TTTGAATGAT GAGATGTGTC ~~ETACGGACCG GCTCCCTCTC GACCTCCACT GTCTAGTCGA GGTCCCGTT~~

Cys Leu Ala Glu Gly Glu Leu Glu Val Thr Asp Gln Leu Pro Gly Gln

1401 ~~AGCGACCAAC CCTGGGAGCA GGCCCTGAAC CGC~~~~TTCTGGG ATTACCTGGG~~ ~~CTGGGTGCAG ACGCTTTCTE ACCAGGTCCA GGAAGAGCTG CAGAGCTCCC~~
~~TGGCTGGTTG GGACCCCTGT CCGGGACTTG GCG~~~~AAGACCC TAATGGACCG~~ ~~GACCCACGTC TGGAAAGAG TGGTCCAGGT CCTTCTCGAC GTCTCGAGGG~~

Ser Asp Gln Pro Trp Glu Gln Ala Leu Asn Arg Phe Trp Asp Tyr Leu Arg Trp Val Gln Thr Leu Ser Asp Gln Val Gln Glu Glu Leu Gln Ser Ser Gln

1501 ~~AA~~~~GT~~~~CAC~~~~ACA~~ ~~GGA~~~~ACT~~~~GAC~~~~AG~~ TGAGTGCTCA GCGCTTCACC CTCCGCACCT GCTGAGTATC CAGATCCAGG GGTTCCTCCT ATCTGGGCAC CTACCTACTT
 TTCAGTGTGT CCTTGACTGC ACTC&CGAGT CGCGAAGTGG GAGGCGTGGG CGACTCATAG GTCTAGGTCC CCA&GGAGGA TAG&CCCGTG GATGGATGAA

Gln Val Thr Gln Glu Leu

Abbildung 5: DNA-Sequenz des ApoE-ko- und des wt-Tieres nach SAGE™ Labs Angaben

Exon 3 des ApoE-Gens ist grün hinterlegt. Die ZFN-Bindungsstellen sind gelb markiert. Die blau hinterlegten Basenpaare zeigen die Nukleotide, die bei der Deletion im ApoE-ko-Tier entfallen und für den Verlust der Proteinbiosynthese verantwortlich sind.

3.1.2 Verwendete Kits

Für die Genotypisierung der Ratten und für die histologische Untersuchung der Gehirnschnitte wurden die folgenden Kits verwendet.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Kits

Bezeichnung	Hersteller
ABC Kit Rabbit IgG	Vector Laboratories
ABC Kit Standard	Vector Laboratories
DAB Substrate Kit for Peroxidase	Vector Laboratories
Färbekit Kongorot nach Highman	Morphisto
GenElute™-Blood Genomic DNA Kit	Sigma-Aldrich
QIAprep® Spin Miniprep Kit for Purification of Plasmid DNA	Qiagen
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing	Invitrogen

3.1.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer kamen in der PCR zum Einsatz und sind in Tabelle 2 dargestellt. Die unten aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert und mittels HPLC gereinigt. Das gelieferte Primer-Lyophilisat wurde mit hochreinem PCR-H₂O auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt.

Das Design des Oligonukleotidpaares Nr. 3 und 4 wurde aus dem von SAGE™ Labs zur Verfügung gestellten Genotypisierungs-Protokoll übernommen. Primer Nr. 1 und 2 wurden ebenfalls nach dem vorliegenden Protokoll mit marginalen Veränderungen designt. Die Oligonukleotide wurden durch die Modifikationen um 1 bzw. 2 Nukleotide verlängert und die Schmelztemperaturen erhöht. Die Schmelztemperatur (engl. melting temperature, T_M) eines Primers resultiert aus seiner Länge und seiner Nukleotid-Zusammensetzung, und lässt sich mit Gleichung 1 berechnen. Die Nukleotid-Zusammensetzung ist entscheidend, da Adenin-Thymin-Basenpaarungen über zwei, und Adenin-Guanin-Basenpaarungen über drei Wasserstoffbrückenbindungen verfügen. Primer mit hohem Guanin- und Cytosin-Anteil hybridisieren dadurch mit einer höheren Bindungsaffinität an die DNA und benötigen eine höhere Schmelztemperatur, um die Basenpaare von der DNA zu trennen. Entscheidend ist, dass die Spezifität der Primer-Anlagerung an die DNA mit dem Guanin- und Cytosin-Anteil erhöht wird. Die Schmelztemperatur des Primer-Paares sollte dabei möglichst identisch sein. Die Oligonukleotide Nr. 5 und 6 wurden ebenfalls so designt, dass sie einen hohen Guanin- und Cytosin-Anteil aufweisen und während der PCR spezifisch an die DNA binden.

$$T_M = 2 \text{ °C} \times (A + T) + 4 \text{ °C} \times (G + C) \quad (\text{Gl. 1})$$

mit

T_M Schmelztemperatur des Primers. Ab dieser Temperatur lösen sich die Oligonukleotide von der Template-DNA.

A Adenin-Gehalt des Primers

T Thymin-Gehalt des Primers

G Guanin-Gehalt des Primers

C Cytosin-Gehalt des Primers

3.1.4 DNA-Größenmarker

In dieser Arbeit kamen ein 1 kb und ein 100 bp DNA-Größenstandard der Firma Invitrogen zum Einsatz.

3.1.5 Vektor

Der lineare Vektor pCR[®]4-TOPO[®] (Fa. Invitrogen) besitzt Desoxythymidin-Überhänge (dT) und wird für die Klonierung von PCR-Produkten mit Desoxyadenosin-Enden (dA) in *E.coli* verwendet.

Der Vektor enthält einen lac-Promotor, einen Polylinker z.B. mit *EcoRI*-Schnittstellen, sowie u.a. eine Ampicillin-Resistenz als Selektionsmarker. Eine Vektorkarte ist in Abbildung 17 im Anhang dargestellt.

3.1.6 Enzyme

Es kamen eine Proteinase zur DNase-Inaktivierung und eine RNase zwecks RNA-Zersetzung zum Einsatz. Die Polymerasen dienten der DNA-Amplifikation oder -Modifikation. Außerdem wurde eine Restriktionsendonuklease zur DNA-Spaltung verwendet.

Tabelle 3: Übersicht über die Enzyme für die Genotypisierung

Bezeichnung	Hersteller
<i>EcoRI</i>	Invitrogen
Phusion-Polymerase	New England Biolabs
Proteinase K	Sigma-Aldrich
RNase	Sigma-Aldrich
Taq-Polymerase	5prime

3.1.7 Bakterienstämme und Medien

Die folgende Tabelle (Tab. 4) stellt die in dieser Arbeit verwendeten *E.coli*-Stämme dar.

Tabelle 4: Übersicht über die Bakterienstämme für die Genotypisierung

Bezeichnung	Hersteller
Top10 Chemically Competent Cells	Invitrogen
XL10-Gold Ultracompetent Cells	Agilent Technologies

Die Zellen wurden nach der Transformation mit S.O.C.-Medium von Invitrogen versetzt. Die Bakterien wurden auf Agar-Agar-Platten mit Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml ausplattiert und anschließend in GIBCO LB Broth 1x Medium (Fa. Invitrogen) mit 50 µg/ml Ampicillin überführt.

3.1.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Genotypisierung

Die folgenden Tabellen (Tab. 5 und Tab. 6) fassen die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Genotypisierung zusammen.

Tabelle 5: Übersicht über die für die Genotypisierung verwendeten Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Geldokumentationseinheit	UVsolo TS Imaging Systems	Biometra
Gelkammer	N596.1	Carl Roth
Heizschrank	Minitron	INFORS-HT
	Typ B 5042	Beckman
Magnetrührer	IKAMAG RET	Janke & Kunkel

Netzteil	2031 Macrodrive 1 Power Supply	LKB Bromma
PCR-Gerät	GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
Photometer	Du 530 Life Sciences UV/Vis Spectrophotometer	Beckman
Thermocycler	comfort	Eppendorf
Vortexschüttler	444-1372	VWR International
	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	Type 1002	Gesellschaft für Labortechnik
Zentrifugen	Biofuge Pico	Heraeus
	Megafuge 1.0R	Heraeus
	Multifuge 3 S-R	Heraeus

Tabelle 6: Übersicht über die für die Genotypisierung verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Kanüle	10001467	PharmaServ
Säulen	GenElute Miniprep Binding Column	Sigma-Aldrich
	QIAprep Spin Columns	Qiagen
	QIAquick Spin Columns	Qiagen
Serum-Röhrchen	Z/1.1-Tubes	Sarstedt

3.1.9 Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Gehirnpräparation und die Histologie

Die folgenden Tabellen (Tab. 7 und Tab. 8) stellen die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Gehirnpräparation und die Histologie dar.

Tabelle 7: Übersicht über die für die Gehirnpräparation und Histologie verwendeten Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Aqua dest. Anlage	Millipore Advantage A10	Millipore
Gefriermikrotrom	1206	Reichert-Jung
Gefrierschrank	Comfort	Liebherr
Kühlgerät des Gefriermikrotroms	Frigomobil	Reichert-Jung
Mikroskop	Imager Z1-System	Zeiss
Pumpe	Harvard Apparatus 22	FMI
Schüttler	Titramax 101	Heidolph
Waage	28014	Sartorius

Tabelle 8: Übersicht über die für die Gehirnpräparation und Histologie verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
1 ml Einmalspritzen	370-650	Heiland
50 ml Einmalspritze (Max 60 ml)	0905022	Terumo
12-Wellplatten	665102	Greiner bio-one
Anatomische Pinzette	BD 25	Aesculap

Chirurgische Pinzette	BD 537	Aesculap
Deckgläser	48-5540-00	Medite Medizintechnik
Kapillare	612-1701	VWR
Objektträger	Superfrost Plus	Thermo Scientific
Schere	BC 60	Aesculap
Siebe	Netwell™ 12 Well Carrier Kit	Corning Life Sciences

3.1.10 Chemikalien, Substanzen und Puffer

Die folgenden Tabellen (Tab. 9 und Tab. 10) fassen die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Substanzen und Puffer zusammen. Alle in diesem Projekt verwendeten Chemikalien wurden mit analysereiner Qualität (*pro analysis, p.a.*) bezogen.

Tabelle 9: Übersicht über die für die Genotypisierung verwendeten Chemikalien, Substanzen und Puffer neben den in den Kits vorhandenen Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
50x TAE-Puffer	Carl Roth
Agar-Agar	Merck
Apicillin	Invitrogen
Bromphenol Blau	Sigma
Ethidiumbromid	Carl Roth
Saccharose	Carl Roth
Water PCR Reagent	Sigma
Xylencyanol	Sigma

Tabelle 10: Übersicht über die für die Gehirnpräparation und Histologie verwendeten Chemikalien, Substanzen und Puffer neben den in den Kits vorhandenen Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
1-Propanol	Merck
10x TBST-Puffer	Dako
20x PBS-Puffer	Mallinckrodt Baker
Anti-Maus-Sekundärantikörper	Dianova
Eosin gelblich	Merck
Esel-Normalserum	Dianova
Essigsäure 99,8%	Carl Roth
Ethanol absolut	Merck
Formaldehyd (38%)	Mallinckrodt Baker
Isotone Kochsalzlösung	Braun
Ketavet [®]	Pharmacia & Upjohn
Methanol	VWR
Mikrozid Liquid	Schülke & Mayr
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Rompun [®]	Bayer Vital
Saccharose	Sigma Aldrich
Wasserstoffperoxid	VWR
Xtra-Kitt (Eindeckmedium)	Mallinckrodt Baker
X-TRA-Solv (Xylol-Ersatzstoff)	Medite

3.1.11 Ansätze für die Genotypisierung

Stopmix

25 mg Bromphenol Blau, 25 mg Xylencyanol und 2 g Saccharose in A. dest. geben. 2 ml 0,5 M EDTA mit pH 8,0 werden hinzugefügt. Anschließend wird mit A. dest. auf 10 ml aufgefüllt.

Ethidiumbromidstammlösung

Ethidiumbromid wird in ein Wasserbad gegeben, sodass eine Konzentration von 50 ng/ml vorliegt.

3.1.12 Ansätze für die Histologie

Peroxidaseblock

100 mL 1,5 % H₂O₂ mit 400 mL Methanol mischen.

DAB-Neutralisation

3% Kaliumpermanganatlösung (0.2 molar) wird mit 2 % Natriumcarbonatlösung in A. dest. gelöst.

Färbung mit Hämatoxylin und Eosin:

- Eosin- Stammlösung: 2 g Eosin gelblich in 100 mL Ethanol absolut lösen und mit 100 mL Ethanol 50 % auffüllen.
- Gebrauchslösung: 90 mL Stammlösung mit 150 mL Ethanol 50 % mischen und 900 µl Essigsäure dazugeben 99,8 %.

3.2 Methoden

3.2.1 Genotypisierung

Der ApoE-ko- und wt-Ratte wurde Blut entnommen, um daraus DNA zu isolieren. Nach der Amplifikation eines ApoE-Genabschnitts mittels PCR erfolgte die Sequenzierung der DNA. Alle verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 9 aufgeführt, ausgenommen sind Lösungen aus gebrauchsfertigen Kits.

3.2.1.1 Serumgewinnung durch Punktion des retrobulbären Venenplexus

Die Blutabnahme erfolgte unter Berücksichtigung der Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde (Gesellschaft für Versuchstierkunde 2009). In einer Kohlenstoffdioxid-Vollnarkose wurde durch den Nackengriff die Halsvene der ko- und der wt-Ratte gestaut. Die Punktion des Venenplexus im inneren Augenwinkel der Tiere erfolgte mit einer Kapillare unter leichtem Druck und Drehbewegungen. Auf diese Weise wurden jeweils ca. 200 µl Blut gewonnen und in Serum-Röhrchen (Fa. Sarstedt) überführt. Die Proben inkubierten 40 Minuten in den Röhrchen und zentrifugierten anschließend bei 4000 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die Erythrozyten und Blutgerinnungsfaktoren wurden in einem Trenngel auf dem Boden des Röhrchens zurückgehalten. Das klare Serum konnte in Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C tiefgefroren werden.

3.2.1.2 DNA-Reinigung

Die DNA-Reinigung aus dem Blut beider Ratten erfolgte unter Verwendung des GenEluteTM-Blood Genomic DNA Kit (Fa. Sigma-Aldrich). Die Leukozyten wurden aufgeschlossen, und die in Hochsalzpuffer aufgenommene genomische DNA adsorbierte an eine Silikatmembran, während Kontaminanten nicht gebunden haben und entfernt wurden. Alle Schritte wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt, wobei zu den Blutproben Proteinase K und RNase gegeben wurde. Die Elution erfolgte mit 100 µl hochreinem PCR-H₂O. Die gereinigte DNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

3.2.1.3 Touchdown Polymerase-Kettenreaktion

Die touchdown Polymerase-Kettenreaktion (TD PCR) stellt die spezifischste Methode zur Amplifikation von Template-DNA dar. Die TD PCR beschreibt zwei sequenzielle Prozesse. Im ersten Amplifikations-Prozess liegt die Starttemperatur oberhalb der optimalen Hybridisierungs-Temperatur der beiden Primer. Die Temperatur wird mit jedem durchlaufenen Zyklus gesenkt, bis die optimale Hybridisierungs-Temperatur erreicht wird. Die Oligonukleotide binden dadurch hochspezifisch an die DNA, weil bei der gegebenen Temperatur eine nicht der Zielsequenz entsprechende Hybridisierung extrem unwahrscheinlich ist. Die optimale Temperatur zur Anlagerung der Primer an die DNA (engl. annealing temperature, T_A) lässt sich mit Gleichung 2 berechnen.

Der zweite Amplifikations-Prozess entspricht einer Standard PCR. Diese Standard PCR ist wie der erste Amplifikations-Prozess der TD PCR aufgebaut bei konstanter Hybridisierungs-Temperatur. In dem zweiten sequentiellen Prozess der TD PCR dienen die spezifischen DNA-Amplifikate als Templates für die weiteren Vervielfältigungen.

$$T_A = T_M - 5 \text{ °C} \quad (\text{Gl. 2})$$

mit

T_A Temperatur zur Anlagerung des Primers an die DNA

Schmelztemperatur des Primers. Ab dieser Temperatur lösen sich die

T_M Oligonukleotide von der Template-DNA. Mit Gleichung 1 in Kapitel 3.1.3 kann die Schmelztemperatur errechnet werden.

Zur Vervielfältigung der DNA wurden 50 µl Ansätze hergestellt. Die Amplifikation des genetischen Materials erfolgte durch die Phusion-Polymerase (Fa. New England Biolabs) mit den in Tabelle 2 aufgeführten Primern Nr. 1 und 2. Das folgende Schema (Tab. 11 und Tab. 12) beschreibt die im Thermocycler (Fa. Eppendorf) durchgeführten Amplifikationsreaktionen.

Tabelle 11: Reaktionsansatz für die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels TD PCR

Komponente	Volumen
hochreines PCR-H ₂ O	33 µl
5x Phusion-GC-Puffer	10 µl
dNTPs	1 µl
forward Primer	1 µl
reverse Primer	1 µl
Template-DNA	3 µl
Phusion-DNA-Polymerase	1 µl

Unter Berücksichtigung der Herstellerangaben wurde folgendes PCR-Programm verwendet.

Tabelle 12: Programmparameter der TD PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	96 °C	2 min	1
Denaturierung	96 °C	20 s	20
Anlagerung des ersten PCR-Prozesses	66 bis 60 °C	20 s	
Extension	72 °C	20 s	
Finale Extension des ersten PCR-Prozesses	72 °C	7 min	1
Denaturierung	96 °C	20 s	15
Anlagerung des zweiten PCR-Prozesses	59 °C	20 s	
Extension	72 °C	20 s	
Finale Extension der des zweiten PCR-Prozesses	72 °C	7 min	1

3.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion nach Vorgaben des SAGE™ Labs Protokolls

Es wurde eine Standard PCR durchgeführt, die im Folgenden als „Sage™ Labs PCR“ bezeichnet wird, um eine klare Differenzierung zu der in Kapitel 3.2.1.5 beschriebenen „Standard PCR“ zu ermöglichen. Das Unternehmen Sage™ Labs führte die Genotypisierung der ApoE-ko- und wt- Ratte vorab durch, und stellte die Unterlagen für diese Forschungsarbeit zur Verfügung (siehe Anhang). Die im Folgenden beschriebene Sage™ Labs PCR orientiert sich an diesen Vorgaben, das Primerdesign und das PCR-Programm wurden übernommen.

Zur Vervielfältigung der DNA wurden 50 µl Ansätze hergestellt. Die Amplifikation des genetischen Materials erfolgte durch die Phusion-Polymerase (Fa. New England Biolabs) und mit den in Tabelle 2 dargestellten Primern Nr. 3 und 4. Die Amplifikationsreaktionen wurden im Thermocycler (Fa. Eppendorf) nach folgendem Schema (Tab. 13 und Tab. 14) durchgeführt.

Tabelle 13: Reaktionsansatz für die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Standard PCR nach Vorgabe des SAGE™ Labs Protokoll

Komponente	Volumen
hochreines PCR-H ₂ O	25 µl
5x Phusion-GC-Puffer	10 µl
dNTPs	1 µl
forward Primer	5 µl
reverse Primer	5 µl
Template-DNA	3 µl
Phusion-DNA-Polymerase	1 µl

Unter Berücksichtigung der Herstellerangaben wurde folgendes PCR-Programm verwendet.

Tabelle 14: Programmparameter der Standard PCR nach Vorgabe des SAGE™ Labs Protokoll

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	96 °C	3 min	1
Denaturierung	96 °C	30 s	35
Anlagerung	60 °C	30 s	
Extension	72 °C	40 s	
Finale Extension	72 °C	5 min	1

3.2.1.5 Standard Polymerase-Kettenreaktion

Zur Vervielfältigung der DNA wurden gemäß Tabelle 11 50 µl Ansätze hergestellt. Die Amplifikation des genetischen Materials erfolgte durch die Phusion-Polymerase (Fa. New England Biolabs) mit den in Tabelle 2 gezeigten Primern Nr. 5 und 6. Das folgende Schema (Tab. 15) beschreibt die im Thermocycler (Fa. Eppendorf) durchgeführten Amplifikationsreaktionen.

Tabelle 15: Programmparameter der Standard PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	96 °C	2 min	1
Denaturierung	96 °C	20 s	30
Anlagerung	63 °C	20 s	
Extension	72 °C	20 s	
Finale Extension	72 °C	7 min	1

3.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Proben wurden nach dessen Fragment-Größen in 1 %igen bzw. 2 %igen horizontalen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

Die Gelherstellung erfolgte durch das Lösen von 1 % bzw. 2 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer. Die DNA-Proben wurden mit Stopmix versetzt und auf die Gele aufgetragen. Zwei geeignete Größen-Marker (Fa. Invitrogen) kamen zur Längen-Abschätzung der DNA-Fragmente zum Einsatz. Der elektrophoretische Lauf erfolgte bei einer konstanten Spannung von 90 V - 150 V.

3.2.1.7 DNA-Extraktion aus einem Agarosegel

Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus einem Agarosegel ausgeschnitten. Danach erfolgte die DNA-Extraktion unter Verwendung des QIAquick[®] Gel Extraction Kits (Fa. Qiagen) gemäß Herstellerprotokoll. Die in Hochsalzpuffer aufgenommene DNA adsorbierte an Silikatmembranen. Die DNA wurde mit 30 µl hochreinem PCR-H₂O eluiert und anschließend bei -20 °C eingefroren.

3.2.1.8 Integration von DNA in einen Vektor

Die Integration der ko- und wt-DNA-Fragmente in einen Vektor erfolgte unter Verwendung des TOPO TA Cloning[®] Kits for Sequencing (Fa. Invitrogen). Eine Taq-Polymerase (Fa. 5prime) synthetisierte mit Template unabhängiger intrinsischer Transferaseaktivität je eine dA-Base an die 3'-Enden der DNA-Fragmente. Anders als in dem Protokoll des Herstellers beschrieben, wurde nicht für 8 - 10 Minuten, sondern für 8 - 30 Minuten bei 72 °C inkubiert.

Der lineare pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor verfügt über 3'-dT-Überhänge, an die eine Topoisomerase kovalent gebunden ist. Die Bindung wurde unter Zugabe der DNA-Fragmente mit dA-Überhängen gespalten, und das Enzym dissoziierte von der DNA ab. Die „aktivierte“ Topoisomerase I besaß Ligaseaktivität und ließ eine kovalente Phosphodiesterbindung

zwischen DNA und Vektor entstehen. Die DNA-Fragmente inkubierten 5 - 30 Minuten mit den Vektoren.

3.2.1.9 Transformation

50 µl chemisch kompetente *E.coli*-Zellen (Top10 Chemically Competent Cells, Fa. Invitrogen oder XL10-Gold Ultracompetent Cells, Fa. Agilent Technologies) wurden auf Eis aufgetaut, mit je 5 µl Plasmid-DNA versetzt und für 15 - 35 Minuten auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der Plasmide erfolgte durch einen Hitzeschock für 30 - 35 Sekunden bei 42 °C. Es folgte eine zweiminütige Inkubation auf Eis. Die transformierten Zellen exprimierten das auf dem Plasmid befindliche Ampicillin-Resistenzgen. Die Bakterien wurden nicht sofort nach der Transformation auf dem Selektionsmedium ausplattiert, da zunächst nicht ausreichend Enzym gegen das Antibiotikum vorhanden war. Stattdessen wurden 250 µl S.O.C.-Medium dazugegeben und die Zellen für 1 Stunde bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte das Ausplattieren der *E.coli*-Zellen auf Agar-Agar-Platten mit einer Ampicillin-Konzentration von 100 µg/ml. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank bebrütet. Am nächsten Tag konnten einzelne Kolonien, die jeweils von einem einzigen Klon abstammten, selektiert werden. Die Bakterien wurden in 5 ml LB-Medium (Fa. Invitrogen) mit 50 µg/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.1.10 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Kulturen

Die Isolierung der Plasmid-DNA im präparativen Maßstab erfolgte aus 5 ml Kulturen mit Hilfe des QIAprep[®] Miniprep Kit (Fa. Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers. Die in Hochsalzpuffer aufgenommene DNA adsorbierte an eine Silikatmembran. Die Plasmid-DNA wurde mit 75 µl hochreinem PCR-H₂O eluiert und bei -20 °C gelagert.

3.2.1.11 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau der Plasmid-DNA erfolgte unter Berücksichtigung der Herstellerangaben der verwendeten Restriktionsendonukleasen (Fa. Invitrogen). In dem verwendeten 10x REact[®] 3 Puffer (Fa. Invitrogen) sollte die Endonukleaseaktivität von *EcoRI* 100 % betragen. Die Ansätze wurden für 60 - 75 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die verdaute DNA in einem horizontalen Gelsystem in einem 1 %igen Agarosegel wie in Kapitel 3.2.1.6 beschrieben gelelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

3.2.1.12 DNA-Reinheitsanalyse und Konzentrationsbestimmung

Die Nukleinsäurekonzentrationen wurden unter Verwendung eines Spektrophotometers (Fa. Beckman) bestimmt. Die Absorption der DNA-Lösung wurde bei 260 nm gemessen, da doppelsträngige DNA ein Absorptionsmaximum bei 260 nm aufweist. Eine Absorption bei 260 nm (A_{260}) von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Lottspeich und Engels 2006). Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt dagegen bei 280 nm (A_{280}). Der Quotient aus A_{260}/A_{280} gibt den Reinheitsgrad der DNA-Lösung an. Eine reine DNA-Lösung liegt vor, wenn der Quotient einen Wert von 1,8 annimmt. Ein Quotient von $< 1,8$ deutet auf eine Kontamination durch Proteine hin (Lottspeich und Engels 2006).

3.2.1.13 DNA-Sequenzierung

Für die Ermittlung der Nukleinsäuresequenz wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Die DNA-Proben wurden mit hochreinem PCR-H₂O verdünnt, sodass eine Konzentration von je 100 ng/µl vorlag. Die Sequenzierung erfolgte von dem Unternehmen Eurofins MWG GmbH mit der Didesoxymethode nach Sanger. Das Programm Lasergene 8 SeqMan von DNASTAR kam zur Auswertung der ermittelten DNA-Sequenzen zum Einsatz.

3.2.2 Histologische Untersuchungen

Die neurodegenerative Alzheimer-Krankheit zeichnet sich durch A β -Plaques, intrazelluläre Neurofibrillenbündel und durch eine verminderte Neuronenzahl aus. Es wurden Gehirnschnitte angefertigt und gefärbt, welche Regionen des *Hippocampus*, des *Cortex* und des *Striatums* zeigen, da hier die aussagekräftigsten Veränderungen erwartet wurden (Jin et al. 2011; Gearing et al. 1993). Die hier angewendeten Färbungen sind von den Mitarbeitern der CSL Behring GmbH für Präparationen mit Gefrierschnitten aus Rattengehirnen etabliert worden, und werden in den folgenden Kapiteln genauer beschrieben.

3.2.2.1 Gehirnpräparation

Die Mutation des ApoE-Gens verursacht in ApoE-ko-Tieren die neurodegenerative Alzheimer-Krankheit. Die Überprüfung erfolgte durch den histopathologischen Vergleich der Gehirne der ApoE-ko- und wt-Ratte. Beide Tiere wurden durch Gabe von 0,1 ml/100gKörpergewicht eines Ketamin-Xylazin-Narkosemittels (Ketavet[®], Rompun[®]) narkotisiert. Die im Folgenden beschriebenen Schritte führten zur Terminierung der Tiere. Die Ratten wurden auf dem Rücken fixiert, und nach Öffnen des Brustkorbs und des Bauchfells konnte das Zwerchfell durchtrennt, und das Herz freigelegt werden. Nach Abtrennen des rechten Herzohrs konnten in den linken Ventrikel eine Kanüle gelegt und 150 ml PBS appliziert werden. Die Lösung gelangte von dort aus in den Blutkreislauf der Tiere und spülte das Blut aus dem Gefäßsystem. Anschließend wurden 30 ml 4 %ige Formalinlösung in das Gefäßsystem infundiert. Die Formalinlösung wirkte eine kurze Zeit ein und fixierte das Gewebe. Danach wurde das Fell am Kopf der Tiere entfernt und die Schädeldecke vom Rückenmarkskanal entlang der *Fontanellen* vorsichtig geöffnet. Die Durchtrennung der Hirnhaut *Dura mater* und der sichtbaren Nerven zu den Ohren und Augen erfolgte mit einer Schere. Die Gehirne der Ratten wurden entnommen und in 4 %iger Formalinlösung für 17,5 Stunden postfixiert. Nachdem die Gehirne für mindestens 22 Stunden in 30 %iger Saccharoselösung lagerten, konnten daraus mit Hilfe eines Gefriermikrotoms 40 μ m dicke Schnitte angefertigt werden. Die Gewebeschnitte wurden in PBS aufgefangen und für histochemische und immunhistochemische Untersuchungen weiterverwendet.

3.2.2.2 Histochemische Untersuchungen

Die Gehirnschnitte der ApoE-ko- und wt-Ratte wurden für die histochemische Untersuchung auf Objektträger aufgezogen, an der Luft getrocknet und mit dem Eindeckmedium „Xtra-Kitt“ (Fa. Mallinckrodt Baker) konserviert. Alle verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 10 aufgeführt, ausgenommen sind Lösungen aus gebrauchsfertigen Kits.

3.2.2.3 Färbung mit Hämatoxylin und Eosin

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine klassische Übersichtsfärbung für histologische Gewebeschnitte, bei welcher die verschiedenen Strukturen nach zwei Einzelfärbungen sichtbar gemacht werden. Nuklei werden blauviolett und die verbleibenden Strukturen in verschiedenen Rotabstufungen dargestellt.

Hämatoxylin ist ein Naturfarbstoff des Blauholzes, welcher nach Waldeyer und Böhmer in die histologische Färbetechnik eingeführt wurde (Romeis und Böck 1989). Die für die Färbung verantwortliche Komponente ist nicht das farblose Hämatoxylin, sondern sein rotbraunes Oxidationsprodukt Hämatein. Dieser positiv geladene Farbstoff färbt als „Meyers saures Hämalaun“ basophile Strukturen wie die Nuklei blauviolett. Eosin ist dagegen ein synthetischer Farbstoff, der zur Plasma- und Gegenfärbung gebraucht wird. Eosin Y wird auch als „Eosin gelblich“ bezeichnet und entspricht chemisch dem Tetrabromfluorescein-Natrium. Das saure Eosin färbt acidophile Strukturen, wie zytoplasmatische Proteine, rot (Romeis und Böck 1989).

Die auf den Objektträgern getrockneten Gewebeschnitte wurden zunächst für 5 Minuten mit Meyers saurem Hämalaun gefärbt und anschließend mit A. dest. abgespült. Die Nuklei erschienen rotbraun. Darauf folgte eine zehnmünütige Wässerung unter fließendem Leitungswasser, welche der Erhöhung des pH-Wertes und der Fixierung des Hämalauns diente, und die Nuklei charakteristisch blauviolett färbte. Die Schnitte inkubierten in der Eosin-Gebrauchslösung, wurden nach einer Minute mit A. dest. gespült und zur Entwässerung in eine aufsteigende Alkoholreihe gegeben. Dazu rehydrierten die Gehirnschnitte zunächst für 3 Minuten in A. dest. und inkubierten anschließend zu je 3 Minuten in 60 %igen, in 90 %igen, in absolutem Ethanol und in „Xtra-Solv“. Die Schnitte wurden mit „Xtra-Kitt“ eingedeckt und an der Luft getrocknet.

3.2.2.4 Färbung mit Kongorot und Hämatoxylin

Kongorot ist ein synthetischer rotbrauner Azofarbstoff, der in der Histochemie insbesondere zum Amyloidose-Nachweis verwendet wird. Die Spezifität für Amyloid resultiert aus der Affinität des Farbstoffs zu fibrillären Proteinen mit β -Faltblatt-Konformation (Frid et al. 2007). Kongorot färbt A β -Plaques im Gehirn im Falle einer Alzheimer-Erkrankung orange bis rot, die übrigen Strukturen bleiben farblos. In diesem Versuch wurde eine Kongorotfärbung mit der 0,5 %igen alkoholischen Kongorot-Färbelösung nach Highman, und eine strukturgebendere Kongorot-Hämatoxylin-Färbung für eine bessere Übersicht durchgeführt. Die Nuklei der Zellen erscheinen blauviolett und die Amyloid-Plaques orangerot.

Zunächst wurden alle Schnitte für 4 Minuten in A. dest. gewässert und anschließend in Kongorot 0,5 %ig in 50 %igen Alkohol inkubiert. Nach 10 Minuten wurden die Objektträger zur Differenzierung in alkalischen Alkohol mit KOH gegeben, und danach zur Fixierung 5 Minuten mit Leitungswasser gewaschen. Die mit Hämatoxylin behandelten Gehirnschnitte wurden, wie in Kapitel 3.2.2.3 beschrieben, weiter gefärbt. Anschließend wurden alle Schnitte 4 Minuten lang in 96 %igen Alkohol, 2 Minuten in 1-Prpöanol und 10 Minuten in „Xtra-Solv“ entwässert und mit „Xtra-Kitt“ eingedeckt und dadurch konserviert.

3.2.2.5 Immunhistochemische Untersuchungen

Die Immunhistochemie ist eine immunologische Methode zum Nachweis von Proteinen und Zellstrukturen in einem Gewebe. In der Immunhistochemie werden gewebespezifische Antikörper eingesetzt, die durch Immunisierung von Säugetieren hergestellt werden. Nach der Injektion spendere fremder Proteine in das Blut einer Donorspezies bildet das Immunsystem des Tieres Immunglobuline gegen das fremde Antigen. Die Immunglobulin-Konzentration im Blutplasma des Tieres steigt und polyklonale Antikörper der IgG-Klasse können aufgereinigt werden. Polyklonale Antikörper sind immunchemisch verschieden und binden mit deren Fab-Teil an unterschiedliche Epitope eines Antigens.

Monoklonale Antikörper sind dagegen immunchemisch identisch und spezifischer als polyklonale Antikörper. Monoklonale Antikörper richten sich gegen dasselbe Epitop, da sie von einem einzigen B-Lymphozyten gewonnen werden. Die B-Zellen werden isoliert und mit

immortalisierten Tumorzellen fusioniert. Die Antikörper-Gewinnung erfolgt durch Vermehrung der hybridisierten Zellen in Fermentern.

In der Immunhistochemie wird die direkte und die indirekte Nachweismethode unterschieden. Die direkte Methode verwendet einen markierten Primärantikörper, der an ein Antigen bindet und dieses nachweist. Diese Methode ist sehr kostenaufwändig und unspezifischer als die indirekte Nachweismethode. Die indirekte Nachweismethode wird häufiger angewendet und nutzt einen unkonjugierten Primär- und einen konjugierten Sekundärantikörper, der gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet ist. Die indirekte Nachweismethode ist mit den in Tabelle 16 aufgeführten Antikörpern für den Nachweis gewebespezifischer Strukturen in Rattengehirnen von den Mitarbeitern der CSL Behring GmbH etabliert worden. Der Primärantikörper aus einem Spendertier (Kaninchen oder Maus) bindet spezifisch an das Ratten-Antigen. Ein mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper wird dazugegeben. Eine Fremdbindung des sekundären Antikörpers an Epitope des Rattengewebes wurde bei der Etablierung der Methode ausgeschlossen. Kreuzreaktivität wird durch Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit Seren verhindert. Anschließend wird mindestens 30 Minuten vor Zugabe ein Avidin-Biotin-Komplex (AB-Komplex) angesetzt. Avidin komplexiert dabei mit HRP-konjugiertem (engl. horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase) Biotin. Der makromolekulare Komplex weist eine Biotinbindungsstelle und mehrere HRP-konjugierte Biotinreste auf. Danach inkubieren die Gewebsschnitte in einer 3-3'-Diaminobenzidin-Lösung (DAB) zur Detektion der Biotin-konjugierten Sekundärantikörper. Durch Zugabe von H₂O₂ und intrinsischer biokatalytischer Aktivität der HRP findet ein Farbumschlag des DAB's statt. Diese Reaktionskaskade weist das Antigen nach, und die mit HRP-konjugierten Biotinreste des AB-Komplexes sind für die Amplifizierung des Signals verantwortlich.

Tabelle 16: Für die immunhistochemischen Untersuchungen verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Hersteller	Artikelnummer	Donorspezies
NeuN	Millipore	MAB377	Maus
Iba1	Wako	019-19741	Kaninchen
MPO	Abcam	ab9535	Kaninchen
GFAP	Dako	Z0334	Kaninchen

Der Anti-NeuN-Primärantikörper aus der Donorspezies Maus wurde mit Ziegen-Normalserum geblockt und mit einem Sekundärantikörper aus der Ziege inkubiert. Der primäre Antikörper aus dem Kaninchen wurde dagegen mit Esel-Normalserum, und mit einem sekundären Antikörper aus der Donorspezies Esel inkubiert.

Neuronales Nuklei-assoziiertes Protein (NeuN)

Das neuronale Nuklei-assoziierte Protein kann an die DNA der meisten Neurone des ZNS und PNS gebunden sein (Kim et al. 2009). NeuN wird im Nukleus, dem Perikaryon und Zellausläufern nachgewiesen. Folglich kann das Neuronen-spezifische Protein zur immunhistochemischen Detektion von neuronalen Zellkernen verwendet werden, zusätzlich wird das Zytoplasma angefärbt.

Bei einer Alzheimer-Erkrankung ist zu erwarten, dass aufgrund der Neuronendegeneration die Dichte der angefärbten Zellen reduziert ist (Tesseur et al. 2006).

Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1 (Iba1)

Iba1 ist ein Calcium-Bindeprotein, welches spezifisch in Makrophagen und Mikroglia exprimiert wird. Das Protein wird als Mikroglia-Marker verwendet. Iba1 gehört zur EF Hand-Familie, die eine spezielle AS-Konformation aufweist, welche die Bindung von zweifach geladenen Calcium-Ionen ermöglicht (Ito et al. 1998).

Mikroglia sind Immunzellen des ZNS und teilen viele Eigenschaften mit Makrophagen. Sie sind Fresszellen und sekretieren nach Aktivierung Zytokine mit inflammatorischer Wirkung. Aktivierten Mikrogliazellen wird eine Beteiligung in der Alzheimer-Pathogenese beigemessen. Als Reaktion auf neurologische Erkrankungen und Neuronendegeneration werden Gliazellen vermehrt gebildet (Luo et al. 2010).

Myeloperoxidase (MPO)

Die Myeloperoxidase ist ein Glykoprotein, welches stark von neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert wird. Die MPO ist ein wichtiges Enzym in der Immunabwehr und trägt

zur phagozytären Lyse von Fremdpartikeln bei (Lanza 1998). Nach der inflammatorischen Aktivierung der Zellen wird MPO in das Lysosom und in den Extrazellularraum abgegeben. Dort katalysiert das Enzym die Hypochlorit-Synthese. Hypochlorit oxidiert Fremdpartikel wirksam und markiert diese, sodass Phagozyten die Partikel aufnehmen können. Vermutlich ist die MPO für Gewebeschädigungen während einer Entzündung mitverantwortlich. Die MPO scheint ein Faktor in der Pathogenese vieler Krankheiten wie z.B. Alzheimer, Arteriosklerose, Multiple Sklerose und Lungenkrebs zu sein (Hoy et al. 2002). Die Expression des Proteins ist dabei erhöht. In Alzheimer-Patienten kann MPO in A β -Plaques und im Umfeld von aktivierten Mikrogliazellen nachgewiesen werden (Reynolds et al. 1999).

Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)

Das fibrilläre saure Gliaprotein (Glial Fibrillary Acidic Protein) gehört zur Typ III Intermediärfilament-Proteinfamilie und ist im Zytoskelett von Astrozyten lokalisiert. GFAP ist daher ein klassischer Marker für den Nachweis von Astrozyten im ZNS. Die Astrozyten kommunizieren mit den Zellfortsätzen mit Neuronen und versorgen diese u.a. mit Nährstoffen. GFAP wird als wichtig für die Plastizität, Stabilität und Mobilität von Astrozyten erachtet. Durch Neuronendegeneration in Folge einer Alzheimer-Erkrankung wird die GFAP-Expression gesteigert (Middeldorp und Hol 2011). Die Zellen proliferieren und bilden Narben, indem sie die geschädigten Nervenzellen phagozytieren und durch nicht-neuronales Gewebe ersetzen. Die meisten reaktiven Astrozyten sind daher mit A β -Plaques assoziiert (Kato et al. 1998).

3.2.2.6 Free Floating

Die Gehirnschnitte wurden dreimal für je 3 Minuten in 1x TBST gewaschen. Danach folgte die Blockade der endogenen Peroxidase mit 0,25 % H₂O₂ für 30 Minuten und ein erneutes Waschen mit 1x TBST. Es folgte ein Block mit Normalserum aus der Donorspezies des Sekundärantikörpers für 25 Minuten, um unspezifische Antikörperbindung und Hintergrundfärbung zu verhindern. Die Schnitte, die mit dem Primärantikörper aus der

Donorspezies Kaninchen inkubiert werden sollten, wurden mit Ziegen-Normalserum geblockt. Das Serum stammte aus dem ABC Vector Kit (Fa. Vector Laboratories). Der Block der übrigen Schnitte erfolgte mit Esel-Normalserum von der Firma Dianova. Ohne anschließendes Waschen inkubierten die Gewebeschnitte mit dem Primärantikörper für 17,5 Stunden bei 4 °C. Nach drei Wachsschritten mit 1x TBST konnten die Schnitte am nächsten Tag mit biotinylierten Sekundärantikörpern für 40 Minuten inkubiert werden. Der gegen Kaninchen gerichtete Sekundärantikörper des Vector-Kits aus der Donorspezies Ziege wurde 1:200 verdünnt, und zur Antikörperstabilisierung mit Ziegen-Normalserum versetzt. Die gegen Maus gerichteten Sekundärantikörper des Vector-Kits kreuzreagieren mit Rattengewebe. Daher wurde der Primärantikörper mit einem sekundären Antikörper der Firma Dianova detektiert. Er stammt aus der Donorspezies Esel und wurde mit einer 1:200 Verdünnung verwendet. Der Antikörper wurde wie der Serumblock mit Esel-Normalserum angesetzt. Die Schnitte wurden dreimal mit 1x TBST gewaschen und von der überschüssigen Lösung gesäubert. Anschließend wurde 30 Minuten vor Zugabe der AB-Komplex (Fa. Vector) angesetzt. Nach 40 Minuten Inkubation wurden die Schnitte mit 1x TBST gewaschen. Zur Sichtbarmachung der konjugierten Sekundärantikörper inkubierten die Gehirnschnitte für 10 Minuten in einer DAB-Lösung (Fa. Vector Laboratories). Durch Waschen mit 1x TBST stoppte die chromogene Reaktion, und die Schnitte konnten in A. dest. auf Objektträger aufgezogen und an der Luft getrocknet werden. Zuletzt erfolgte das Entwässern der Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe. Dazu wurden die Schnitte wie in Kapitel 3.2.2.3 beschrieben in eine Alkoholreihe gegeben und anschließend mit „Xtra-Kitt“ konserviert.

Für die ApoE-ko- und die wt-Ratte wurde jeweils eine Negativkontrolle mitgeführt. Anstelle des primären Antikörpers inkubierten die Negativkontrollen mit der gleichen Menge 1x TBST. Die ko-Kontrolle wurde mit Ziegen- und die wt-Kontrolle mit Eselserum geblockt. Die Schnitte inkubierten mit den entsprechenden Sekundärantikörpern. Ein an Alzheimer erkranktes Rattengehirn, das als Positivkontrolle Signale auf die in Tabelle 16 genannten Primärantikörper zeigen würde, stand im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die ApoE-ko- und die wt-Ratte genotypisch untersucht. Die Amplifikation eines ApoE-Genabschnitts erfolgte mit verschiedenen PCR's, um für die anschließende Sequenzierung das spezifischste PCR-Produkt auszuwählen. Die ApoE-ko-Ratte wurde außerdem als Tiermodell zur histologischen Untersuchung einer neuronalen Alzheimer-Erkrankungen genutzt. Aufgrund der Mutation des ApoE-Gens exprimiert das Tier kein ApoE-Protein und der Lipidmetabolismus ist gestört, mit direkter Folgeerscheinung im Hinblick auf eine Prädisposition der Alzheimer-Erkrankung. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Genotypisierung und die Resultate der histologischen Untersuchung dargestellt.

4.1 Genotypisierung

Die DNA der ApoE-ko- und der wt-Ratte wurde aus dem Blut der Tiere isoliert. Die DNA-Sequenzen des Exon 3 im ApoE-Genlocus unterscheiden sich in beiden Tieren, da aufgrund der künstlichen Mutation in der ko-Ratte Basenpaare deletiert wurden. Die Amplifikation des entsprechenden ApoE-Genabschnitts erfolgte mittels PCR. Es wurde eine TD PCR und eine PCR nach Vorgabe des SAGETM Labs Protokolls durchgeführt. Zur Optimierung der Qualität und Spezifität wurde die PCR nach dem SageTM Labs Protokoll modifiziert und als „Standard PCR“ bezeichnet.

4.1.1 DNA-Amplifikation mittels TD PCR

Die TD PCR stellt die spezifischste Methode zur Amplifikation von Template-DNA dar. Die TD PCR beschreibt zwei sequentielle Prozesse. Im ersten Prozess lag die Starttemperatur anfänglich 7 °C oberhalb der optimalen Hybridisierungs-Temperatur der Primer. Die Temperatur wurde mit jedem Zyklus um 0,3 °C gesenkt, bis die optimale Hybridisierungs-Temperatur von 59 °C erreicht wurde. Die Oligonukleotide haben dadurch hochspezifisch an die DNA gebunden, weil bei der gegebenen Temperatur eine nicht der

Zielsequenz entsprechende Hybridisierung extrem unwahrscheinlich war. Die generierten DNA-Abschnitte dienten im folgenden Amplifikations-Prozess als Templates. Das PCR-Produkt der wt-Ratte war 151 bp groß, das DNA-Fragment der ApoE-ko-Ratte besaß eine Länge von 135 bp. Anschließend wurden je 8 µl DNA mit 5 µl Stopmix versetzt, auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch nach der molekularen Größe aufgetrennt.

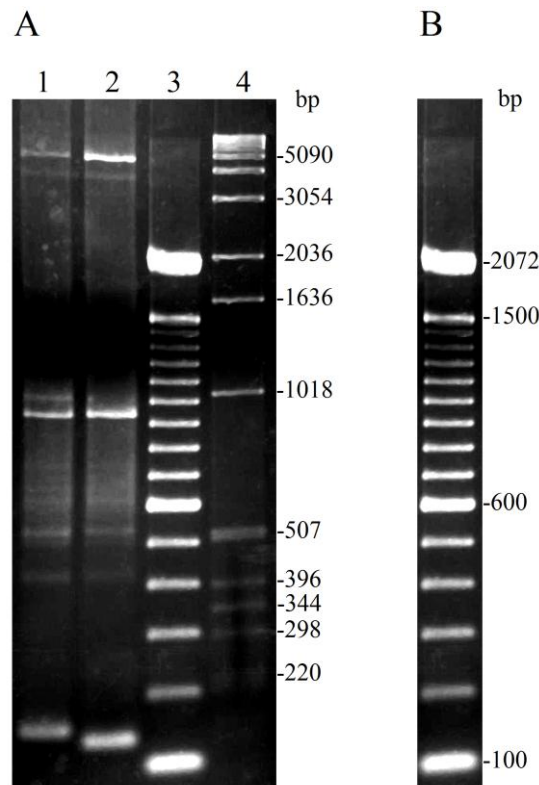


Abbildung 7: Analyse der DNA-Amplifikation der TD PCR mit einem 2 %igen Agarosegel

(A) Spur 1: wt-DNA; Spur 2: ApoE-ko-DNA; Spur 3: 100 bp DNA-Größenstandard (Fa. Invitrogen); Spur 4: 1 kb DNA-Größenstandard (Fa. Invitrogen) mit Zuordnung der DNA-Markerbanden. (B) Zuordnung der DNA-Markerbanden des verwendeten 100 bp Markers.

In Abbildung 7 ist das Agarosegel nach der Elektrophorese dargestellt. Die Amplifikate der Tiere sind unterschiedlich groß und zeigen verschiedene Laufweiten. Die Bande der wt-DNA liegt relativ zum Marker auf einer Höhe von ca. 150 bp, das DNA-Fragment der ApoE-ko-Ratte zeigt eine Größe von ca. 130 bp. Im Gel sind in den Laufspuren der wt- und der ko-Ratte unspezifische Banden zu sehen. Die PCR hat zu unspezifischen Primer-Anlagerungen an die DNA geführt, und hat dadurch Banden generiert, die nicht dem Abschnitt des ApoE-Gens entsprechen. Die Ergebnisse der TD PCR wurden mit den

Resultaten der PCR nach Vorgabe des SageTM Labs Protokolls und denen der Standard PCR verglichen.

4.1.2 DNA-Amplifikation mittels PCR nach Vorgabe des SageTM Labs Protokolls

Es wurde eine Standard PCR durchgeführt, die sich an den Vorgaben des SAGETM Labs Protokolls orientierte, das Primerdesign und das PCR-Programm wurden übernommen. Die Größen der DNA-Abschnitte waren mit denen der TD PCR vergleichbar, da die eingesetzten Primer nur 1 bzw. 2 Nukleotide kürzer waren als die analogen Primer der TD PCR. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden auf einem 2 %igen Agarosegel elektrophoretisch nach dem Molekulargewicht aufgetrennt und analysiert.

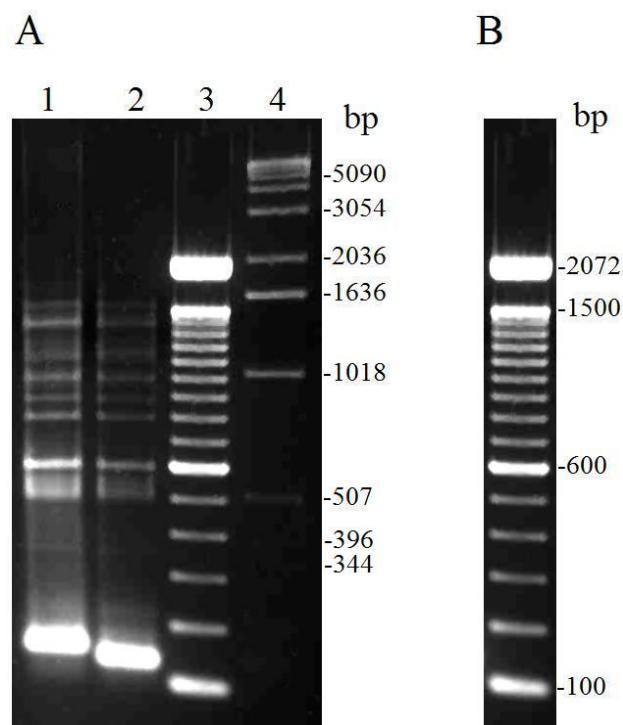


Abbildung 8: Analyse der DNA-Amplifikation mittels PCR nach Vorgabe des SageTM Labs Protokolls mit einem 2 %igen Agarosegel

(A) Spur 1: wt-DNA; Spur 2: ApoE-ko-DNA; Spur 3: 100 bp DNA-Größenstandard (Fa. Invitrogen); Spur 4: 1 kb DNA-Größenstandard (Fa. Invitrogen) mit Zuordnung der DNA-Markerbanden. (B) Zuordnung der DNA-Markerbanden des verwendeten 100 bp Markers.

Die DNA-Banden des wt- und des ApoE-ko-Tieres sind unterschiedlich groß und zeigen in Abbildung 8 verschiedene Laufweiten auf einer Höhe von ca. 150 bp und ca. 130 bp relativ zum Marker. In der Abbildung erkennt man, wie bereits im Gel der TD PCR, unspezifische Banden in der Spur der wt- und der ApoE-ko-DNA. Sie sind durch unspezifische Primer-Hybridisierung an die DNA zustande gekommen. Im Vergleich zur TD PCR ist in der PCR nach Vorgaben des SageTM Labs Protokolls eine größere Anzahl unspezifischer Banden vorhanden. Zur Optimierung der Qualität und Spezifität wurde die PCR nach dem SageTM Labs Protokoll im Folgenden modifiziert.

4.1.3 DNA-Amplifikation mittels Standard PCR

Das in der Standard PCR verwendete Primer-Paar wurde so designt, dass es an einem anderen Locus innerhalb des ApoE-Gens hybridisierte, als die zuvor verwendeten Primer (siehe Abb. 6). Die Standard PCR lieferte daher deutlich kleinere Amplifikate. Die DNA-Fragmente der wt-Ratte waren 71 bp groß, die Banden des ApoE-ko-Tieres besaßen eine Länge von 55 bp. Für die Gelelektrophorese wurden erneut 8 µl DNA mit 5 µl Stopmix versetzt und auf ein 2 %iges Agarosegel gegeben. Zum Zeitpunkt der gelelektrophoretischen DNA-Trennung stand kein geeigneter DNA-Größenstandard mit Banden kleiner als 100 bp zur Verfügung. Mit dem verwendeten 100 bp und dem 1 kb DNA-Marker von Invitrogen war es dennoch möglich die Größe der Amplifikate abzuschätzen.

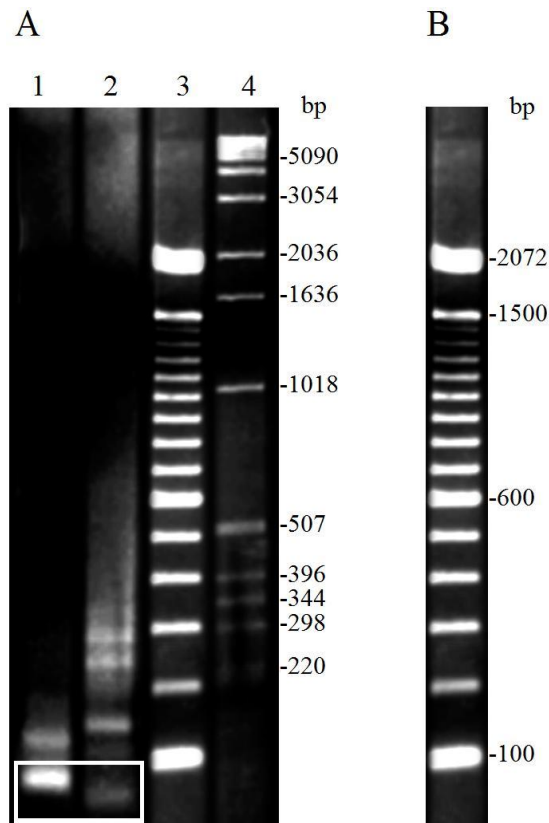


Abbildung 9: Analyse der DNA-Amplifikation der Standard PCR mit einem 2 %igen Agarosegel

(A) Spur 1: wt-DNA; Spur 2: ApoE-ko-DNA; Spur 3: 100 bp DNA-Größenstandard (Fa. Invitrogen); Spur 4: 1 kb DNA-Größenstandard (Fa. Invitrogen) mit Zuordnung der DNA-Markerbanden. (B) Zuordnung der DNA-Markerbanden des verwendeten 100 bp Markers. Die weiße Markierung umrandet die generierten PCR-Produkte entsprechend der erwarteten Größen.

In Abbildung 9 ist zu sehen, dass die DNA-Banden der wt- und der ApoE-ko-Ratte unterschiedliche Laufweiten besitzen und unterhalb der 100 bp Bande des 100 bp Markers liegen. Das Gel zeigt in den Laufspuren der wt- und der ApoE-ko-Ratte unspezifische Amplifikate, deren Ursache unspezifische Primer-Hybridisierung ist. Der Vergleich zur TD PCR und zur PCR nach SageTM Labs Protokoll zeigt weniger unspezifisch generierte DNA-Fragmente. Die Optimierung der PCR nach SageTM Labs Protokoll führte zu einer höheren Spezifität.

Die DNA-Banden der Standard PCR sind deutlich schwächer als die der TD PCR und die der PCR nach SageTM Labs Vorgaben. Die DNA-Proben der TD PCR und der Standard PCR wurden auf demselben Gel elektrophoretisch getrennt und für denselben Zeitraum mit Ethidiumbromid gefärbt. Die DNA-Auftragsmengen beider PCR's waren identisch, sodass die Ursache für die schwächere Banden-Intensität eine geringere Produkt-Ausbeute der

Standard PCR ist. Das Programm der Standard PCR enthielt 30 Amplifikations-Zyklen, und damit 5 Zyklen weniger als die TD PCR. Eine wiederholte Versuchsdurchführung mit 35 Zyklen würde zu einem optimierten Ergebnis führen. Die Standard PCR wurde jedoch nicht mit einem optimierten PCR-Programm wiederholt, weil die TD PCR bereits ausreichend spezifische DNA-Fragmente des wt- und des ApoE-ko-Tieres amplifiziert hatte. Die DNA der TD PCR wurde für weitere Klonierungsschritte extrahiert. Die dem ApoE-Genabschnitt entsprechenden DNA-Banden wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten, und adsorbierten in einem Hochsalzpuffer an eine Silikatmembran. Die Elution erfolgte mit hochreinem PCR-H₂O (siehe Kapitel 3.2.1.7).

4.1.4 Klonierung in den Expressionsvektor pCR[®]4-TOPO[®]

Die aufgereinigte DNA wurde zwecks Genotypisierung in einen Expressionsvektor integriert. Die Integration der DNA in einen Vektor bietet den Vorteil, dass zur Sequenzierung weniger Ausgangsmaterial benötigt wird. Bakterienzellen nehmen das Plasmid durch Transformation auf und replizieren dieses mit dem zu sequenzierenden *gene of interest* (GOI). Noch vor der eigentlichen Sequenzierung kann durch einen enzymatischen Verdau und durch Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt werden, ob das GOI in den Vektor kloniert wurde. Die DNA wird außerdem durch die Integration in den Vektor verlängert. Die Qualität der anschließenden Sequenzierung wird durch dieses Vorgehen verbessert.

An die DNA der wt- und der ApoE-ko-Ratte wurde, wie in Kapitel 3.2.1.8 beschrieben, dA an die 3'-Enden synthetisiert. Die so modifizierte DNA wurde mit dem pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor mit 3'-dT-Überhängen gemischt. DNA und Vektor lagerten sich zusammen und die Fremd-DNA wurde in dieses Vektorsystem integriert. Die Topoisomerase I knüpfte eine kovalente Phosphodiesterbindung zwischen DNA und Vektor. Die so generierten Plasmide mit inserierter DNA-Sequenz wurden zu Top10 Chemically Competent Cells (Fa. Invitrogen) gegeben und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Transformation der Plasmid-DNA wurde durch einen Hitzeschock für 30 - 35 Sekunden bei 42 °C induziert, danach erfolgte die Zugabe von S.O.C.-Medium. Zur Selektion des Plasmids wurden die transformierten Bakterien auf ampicillinhaltigen Agar-Agar-Platten ausplattiert und bebrütet.

Die Transformation wurde mit marginalen Modifikationen mehrfach durchgeführt, da zunächst kein Zellwachstum zu verzeichnen war. Bei der Wiederholung des Versuchs inkubierten die Zellen vor der Transformation mindestens 30 Minuten auf Eis. Diese Versuchsoptimierung war ebenfalls nicht erfolgreich. Schließlich wurden XL10-Gold Ultracompetent Cells (Fa. Agilent Technologies) anstelle der Top10 Chemically Competent Cells verwendet, da diese über ein effektiveres Transformationssystem verfügen. Die Transformationseffektivität liegt laut Herstellerangaben bei mindestens 5×10^9 cfu/ μg DNA, und war damit 5 mal höher als bei den zuvor eingesetzten Zellen. Mit den XL10-Gold Ultracompetent Cells wurde eine Replikation mit einer Vielzahl von Plasmid-Kopien sichergestellt. Nach der Transformation mit diesem Klonierungsstamm wuchsen die Bakterien auf den antibiotikahaltigen Nährböden zu Kolonien heran. Einzelne Kolonien wurden selektiert und zur Plasmid-Replikation in ampicillinhaltigen Flüssigkulturen vermehrt. Anschließend wurde eine Minipräparation zur Isolierung der Plasmid-DNA durchgeführt. Der pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor besitzt in der multiplen Klonierungsstelle *EcoRI*-Schnittstellen, welche die insertierte Fremd-DNA umgeben. Die isolierten Plasmide wurden daher einer Restriktion mit *EcoRI* unterzogen. Die wt-DNA war 169 bp lang, und für die ApoE-ko-DNA wurde eine Bande mit einer Größe von 153 bp aus dem ca. 3,96 kb großen Vektor entfernt. Die verdaute Plasmid-DNA wurde in 1 %igen Agarosegelen elektrophoretisch nach der molekularen Größe aufgetrennt. Ein geeigneter Marker mit Banden im Bereich von 100 bp - 200 bp war für die Größenbestimmung der Insert-DNA nicht vorhanden. Mit dem 1 kb DNA-Marker (Fa. Invitrogen) war es dennoch möglich die Größe der Amplifikate einzuschätzen.

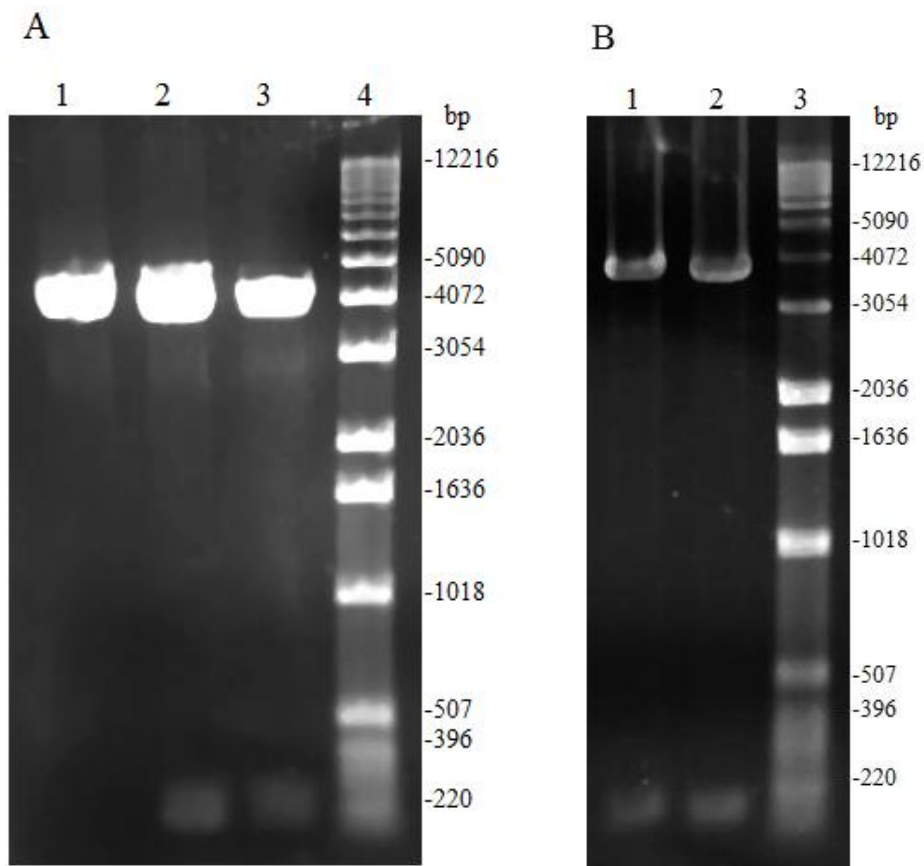


Abbildung 10: Restriktionsverdau des pCR[®]4-TOPO[®]-Vektors mit vermeintlich integrierter DNA-Sequenz auf einem 1 %igem Agarosegel

(A) Spur 1 - 3: Mit *EcoRI* geschnittene Plasmid-DNA mit vermeintlichem DNA-Insert der wt-Ratte. Die Plasmide wurden aus drei verschiedenen Bakterienkolonien isoliert; Spur 4: 1 kb DNA-Größenstandard (Fa. Invitrogen) mit Zuordnung der DNA-Banden. (B) Spur 1 - 2: Mit *EcoRI* geschnittene Plasmid-DNA mit vermeintlichem DNA-Insert der ApoE-ko-Ratte. Die Plasmide wurden aus zwei verschiedenen Bakterienkolonien isoliert; Spur 3: 1 kb DNA-Größenstandard (Fa. Invitrogen) mit Zuordnung der DNA-Banden.

Die Gele in Abbildung 10 A und B zeigen in den Laufspuren der Plasmid-DNA jeweils auf einer Höhe von ca. 4 kb relativ zum Marker eine Bande für das linearisierte Plasmid. Die DNA-Fragmente sind stark gefärbt, weil sich das Ethidiumbromid in einer größeren Anzahl zwischen die Basenpaare der langen Plasmide lagern konnte. In Spur 2 und 3 in Abbildung 10 A ist eine zusätzliche Bande zu sehen. Es handelt sich dabei um Insert-DNA der wt-Ratte. Im Gel ist in Spur 1 keine insertierte wt-DNA zu erkennen, weil die Plasmide keine Fremd-DNA aufgenommen haben. In Abbildung 10 B ist zu sehen, dass sich im Gel in Spur 1 und 2 das linearisierte Plasmid und eine weitere Bande befindet, die auf die ApoE-ko-DNA hindeutet. Die Insert-DNA erscheint jeweils mit einer geringeren Intensität als die Plasmid-DNA, da diese deutlich kürzer ist und sich weniger Ethidiumbromid anlagern

konnte. Der verwendete Marker war für eine Auflösung im Bereich von 100 bp - 200 bp nicht geeignet, weshalb die Größe der DNA-Fragmente nicht näher bestimmt werden konnte. Eine weitere Analyse mit einem niedermolekularen Standard war nicht notwendig, da das erzielte Ergebnis mehr als ausreichend war.

Die DNA der in Bezug auf das GOI positiv getesteten wt- und ApoE-ko-Klone wurde zur Sequenzierung gegeben. Die ermittelten Nukleinsäure-Sequenzen wurden einem Sequenzabgleich unterzogen. Für die wt- und die ApoE-ko-DNA ergab sich eine 100 %ige Übereinstimmung mit den von SageTM Labs vorgegebenen Sequenzen (siehe Abb. 5).

4.2 Histologische Untersuchungen

Die künstliche Mutation des ApoE-Gens verursacht in ApoE-ko-Tieren die neurodegenerative Alzheimer-Erkrankung. Die histopathologische Untersuchung des potentiell an Alzheimer erkrankten ko-Tieres und des Kontrolltieres erfolgte an den entnommenen Gehirnen. Nach der Formalin-Fixierung der Gehirne wurden 40 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Die angefärbten Gewebeschnitte des *Hippocampus*, des *Cortex* und des *Striatums* zeigen die aussagekräftigsten Veränderungen im Falle einer Alzheimer-Pathogenese. Die angewendeten Färbungen sind für Gefrierschnitte aus Rattengehirnen etabliert. Alle immunhistochemischen Negativkontrollen blieben erwartungsgemäß ungefärbt.

4.2.1 Färbung mit Hämatoxylin und Eosin

Die HE-Färbung visualisiert verschiedenen Gewebestrukturen. Nuklei werden blauviolett und die verbleibenden Strukturen in verschiedenen Rotabstufungen dargestellt. Die Färbung der Gehirnschnitte der wt- und der ApoE-ko-Ratte ergibt eine gleichmäßige Übersichtsfärbung, wie in Abbildung 11 zu sehen ist. Der zellreiche *Cornu Ammonis* und *Gyrus Dentatus* ist im *Hippocampus* beider Tiere als blaue Linie sehr detailliert abgebildet. Die longitudinalen Fasern des *Striatums* erscheinen als hellere Bereiche und der faserreiche *Corpus Callosum* ist als abgegrenztes helles Band oberhalb des *Hippocampus* und *Striatums* zu erkennen. Der

direkte Vergleich der wt- und ApoE-ko-Ratte zeigt keine Unterschiede im *Hippocampus* und im *Striatum*, ebenso wie im *Cortex* (ohne Bild). Die ApoE-ko-Ratte weist keine Plaques auf, wie sie bei einer Alzheimer Erkrankung zu erwarten sind.

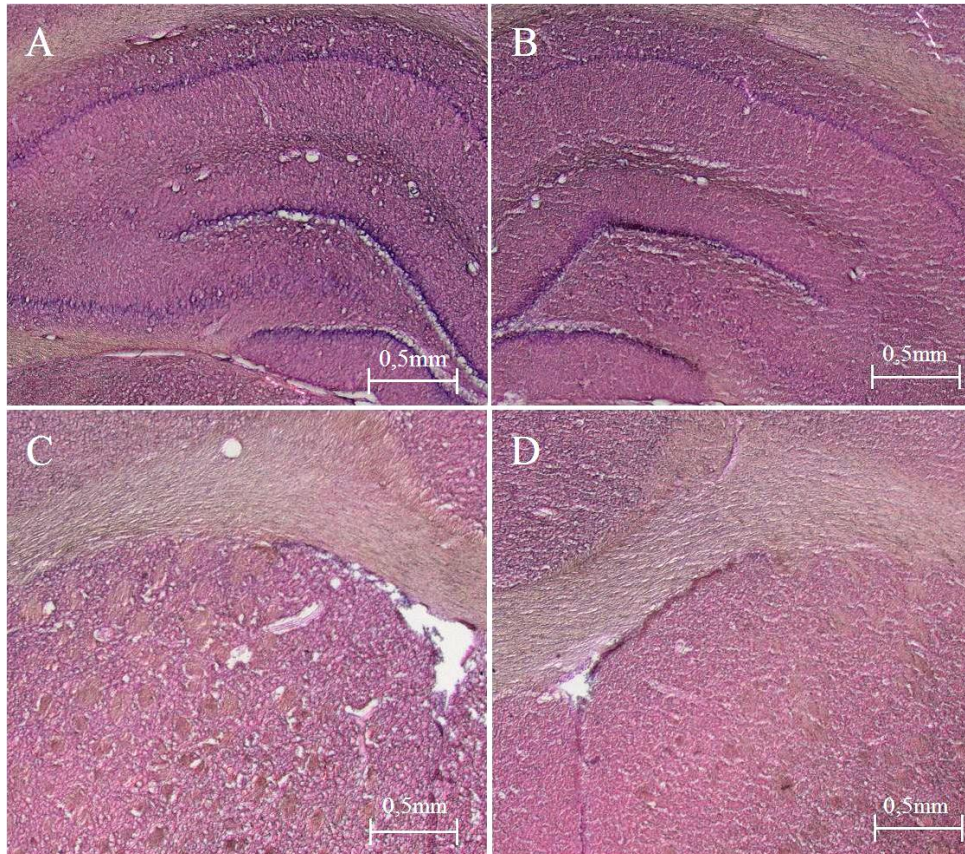


Abbildung 11: HE-Färbung des Hippocampus und des Striatums der wt- und ApoE-ko-Ratte

In Abbildung A ist der Hippocampus der wt-Ratte dargestellt, B zeigt den Hippocampus der ApoE-ko-Ratte. In der gleichen Reihenfolge ist in Abbildung C und D das Striatum beider Tiere zu sehen. Nuklei sind blaviolett, acidophile Strukturen, wie z.B. Plasmaproteine sind rot gefärbt. Zwischen der wt- und der ApoE-ko-Ratte lassen sich keine strukturellen Unterschiede erkennen.

4.2.2 Färbung mit Kongorot und Hämatoxylin

Die Kongorot- oder die strukturgebendere Kongorot-Hämatoxylin-Färbung dient dem Amyloidose-Nachweis. Kongorot färbt A β -Plaques im Gehirn der ApoE-ko-Ratte im Falle einer Alzheimer-Erkrankung orange bis rot. Die Kongorot-Färbung lässt jedoch keine Amyloid-Ablagerungen im Gehirn der ApoE-ko-Ratte erkennen. Die Gewebeschnitte des ko- und des wt-Tieres zeigen lediglich eine Hintergrundfärbung. Abbildung 12 zeigt den

Hippocampus des wt- und des ApoE-ko-Tieres nach einer Kongorot-Hämatoxylin-Färbung im Vergleich. In der ApoE-ko-Ratte sind keine orangeroten pathologischen Plaques nachweisbar.



Abbildung 12: Kongorot-Hämatoxylin-Färbung des *Hippocampus* der wt- und ApoE-ko-Ratte

Im linken Bild ist der *Hippocampus* der wt-Ratte dargestellt, die rechte Abbildung zeigt den *Hippocampus* der ApoE-ko-Ratte. Es sind keine $A\beta$ -Ablagerungen zu sehen.

4.2.3 NeuN

Das neuronale Nuklei-assoziierte Protein bindet an die DNA der meisten Neurone des ZNS und PNS. NeuN wird im Nukleus, dem Perikaryon und Zellausläufern nachgewiesen, zusätzlich wird das Zytoplasma angefärbt. Bei einer Alzheimer-Erkrankung ist aufgrund der Neuronendegeneration die Zelldichte reduziert.

Für diese Färbung wurde für den Primärantikörper eine Verdünnung von 1:1000 gewählt. Die Nervenzellen im wt- und ApoE-ko-Tier sind als runde Zellen im *Hippocampus* und *Striatum* zu sehen, und Zellausläufer lassen sich z.T. erkennen. Im *Hippocampus* (siehe Abb. 13) verdichten sich die positiven Signale in den Neuronen-reichen Regionen. Das *Striatum* (ohne Bild) zeigt eine homogene Verteilung der Zellen. Das Faserband *Corpus Callosum* weist dagegen keine gefärbten Zellen auf. Abbildung 14 zeigt dreiecksförmige Pyramidenzellen, welche die Mehrheit der neuronalen Zellen im *Cortex* ausmachen, und Körnerzellen. In den Bereichen des *Hippocampus*, des *Striatums* und des *Cortex* kann keine

optische Differenz in der Zelldichte der ApoE-ko-Ratte im Vergleich zur wt-Ratte festgestellt werden.

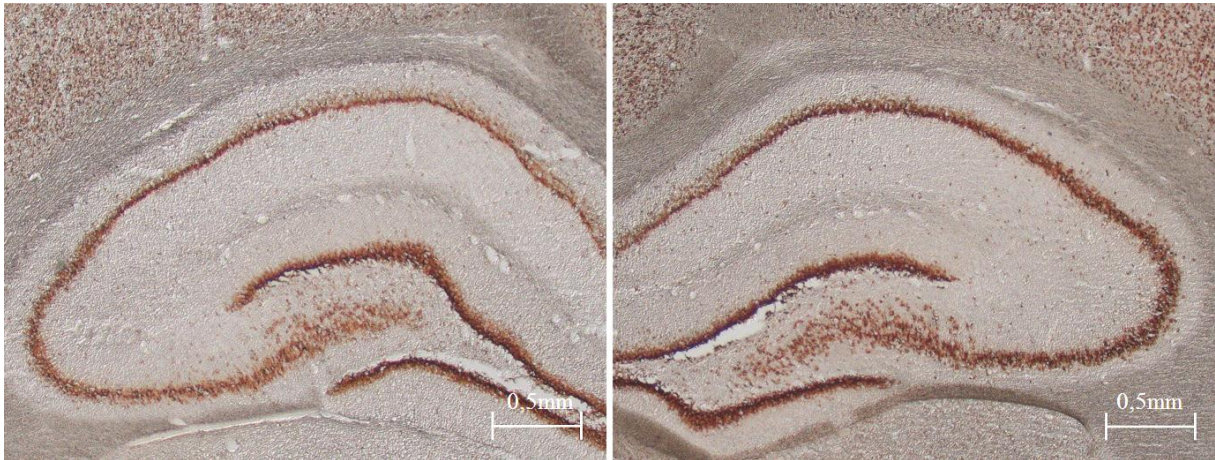


Abbildung 13: NeuN-Färbung des Hippocampus der wt- und ApoE-ko-Ratte

Das linke Bild zeigt den Hippocampus der wt-Ratte, die rechte Abbildung stellt den Hippocampus der ApoE-ko-Ratte dar. Es ist keine signifikante Verminderung der Zelldichte im ApoE-ko-Tier im Vergleich zur wt-Ratte zu beobachten.

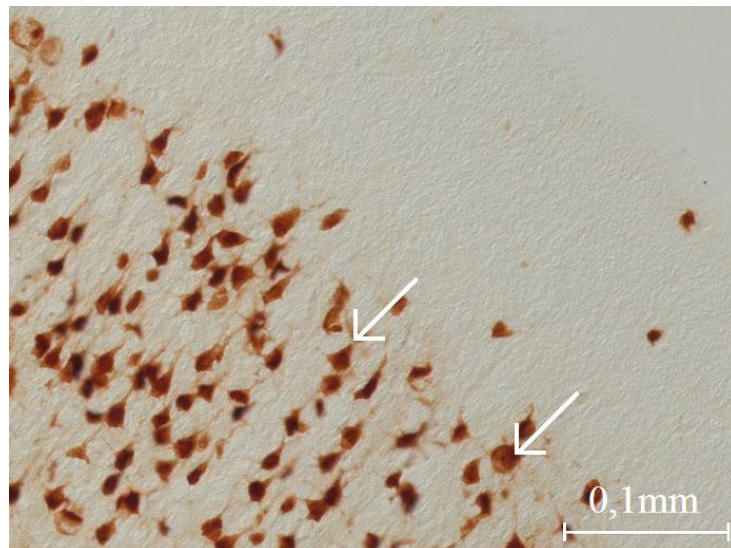


Abbildung 14: NeuN-Färbung des Cortex der wt-Ratte

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des Cortex des wt-Tieres. Der linke Pfeil markiert eine Pyramidenzelle, die vertikal zur Cortexoberfläche gerichtet ist. Die rechte Markierung deutet auf eine Körnerzelle.

4.2.4 Iba1

Iba1 ist ein Protein, welches spezifisch in Makrophagen und Mikroglia exprimiert wird. Als Reaktion auf neurologische Erkrankungen und Neuronendegeneration werden Gliazellen vermehrt gebildet.

Der primäre Antikörper wurde mit einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt. Die Iba1-Färbung weist eine homogene Mikroglia-Verteilung in allen Hirnregionen der ApoE-ko- und der wt-Ratte nach. In den faserreichen Regionen sind wenige Signale vorhanden. Die Nervenzellen im *Hippocampus* sind ungefärbt, die umgebenden Zellen zeigen positive Signale und sind gleichmäßig verteilt. Im *Striatum* nimmt die Dichte der Iba1-positiven Zellen zu, im *Cortex* ist sie relativ gering. Auffallend ist die in Abbildung 15 dargestellte Ansammlung von Iba1-positiven Zellen im *Cortex* des ApoE-ko-Tieres. Die Zellen weisen dickere Fortsätze auf und grenzen sich stärker vom umliegenden Gewebe ab als die übrigen Iba1-positiven Zellen. Die erhöhte Zelldichte deutet auf eine Aktivierung der Mikroglia hin. Die Dichte und die Größe der Zellen nimmt durch Phagozytose zu, während die Zellausläufer reduziert werden. Der *Cortex* der wt-Ratte zeigt eine homogene Zellverteilung.

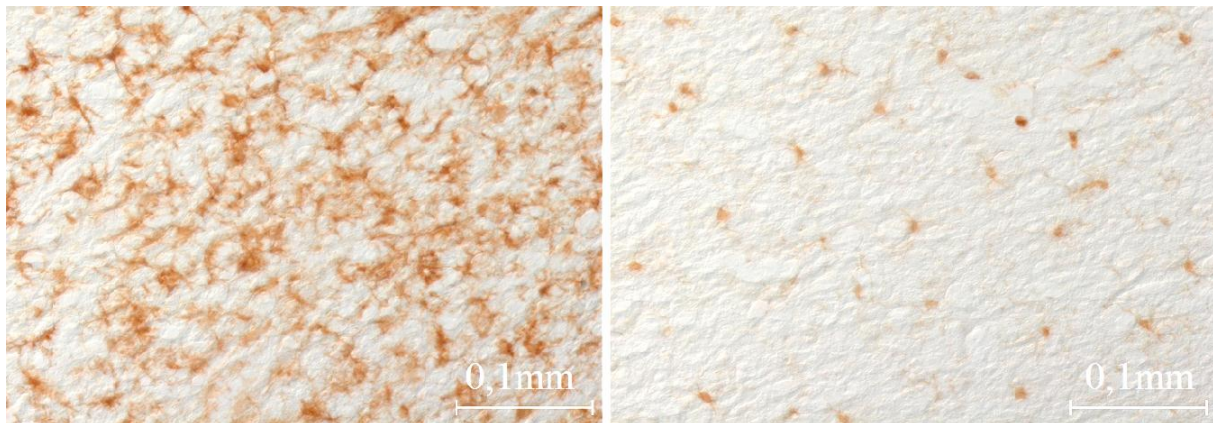


Abbildung 15: Iba1-Färbung des Cortex der ApoE-ko-Ratte

Die Abbildungen zeigen einen Ausschnitt des Cortex der ApoE-ko-Ratte. Die lokale Zellansammlung ist anhand der Braunfärbung im linken Bild gut zu erkennen. Die übrigen Areale des Cortex der ApoE-ko-Ratte und die gesamten kortikalen Bereiche der wt-Ratte zeigen eine Zellverteilung wie im rechten Bild.

4.2.5 MPO

Die MPO ist ein Glykoprotein, welches nach inflammatorischer Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten vermehrt exprimiert wird. Es ist ein wichtiges Enzym in der Immunabwehr und trägt zur phagozytären Lyse von Fremdpartikeln bei. Bei einer Alzheimer-Erkrankung kann MPO in A β -Plaques und im Umfeld von aktivierten Mikrogliazellen nachgewiesen werden.

Der primäre Antikörper wurde mit einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Beim ApoE-ko-Tier ergeben sich wie beim wt-Tier keine positiven Signale, es lassen sich also keine entzündlichen Prozesse nachweisen.

4.2.6 GFAP

Das fibrilläre saure Gliaprotein wird in Astrozyten exprimiert und ist primär in den sternförmigen Verästelungen der Zellen nachweisbar. Mit den Zellfortsätzen kommunizieren die Astrozyten mit den Neuronen und versorgen diese u.a. mit Nährstoffen. Durch Neuronendegeneration in Folge einer Erkrankung wird die GFAP-Expression gesteigert.

In diesem Versuch wurde eine Antikörperverdünnung von 1:20000 gewählt. Die Nuklei der Zellen sind entweder sehr klein oder gar nicht zu sehen. Die positiven Signale sind in sämtlichen Hirnarealen erkennbar, und sind insbesondere in den Neuronen-reichen Regionen verdichtet. Im *Hippocampus* lassen sich die verschiedenen Zellschichten gut erkennen (siehe Abb. 16). In faserreichen Gebieten sind weniger Zellen GFAP-positiv.

Der Vergleich des ApoE-ko-Tieres mit der wt-Ratte lässt keine Unterschiede erkennen, was gegen eine Aktivierung der Astrozyten und gegen eine Alzheimer-Erkrankung im ko-Tier spricht.

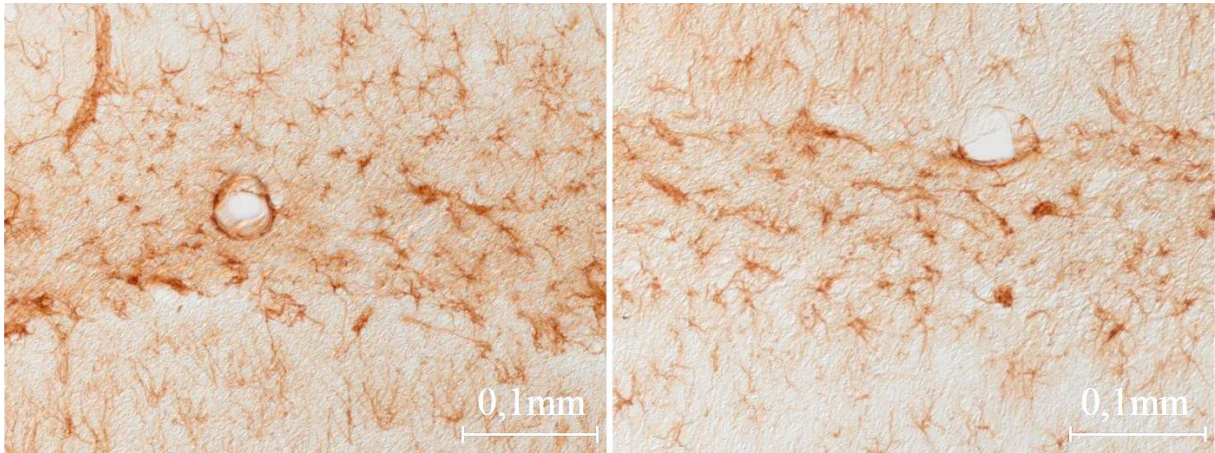


Abbildung 16: GFAP-Färbung des Hippocampus der wt- und ApoE-ko-Ratte

Links ist der Cornu Ammonis der wt-Ratte und rechts der Cornu Ammonis der ApoE-ko-Ratte dargestellt. Die Astrozyten-Verästelungen der zellreichen Region lassen sich gut erkennen. Astrozyten umgeben die Außenseite der kapillaren Endothelien, sodass in beiden Bildern Blutgefäße zu sehen sind.

5 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Bachelorarbeit bestand darin, die Funktionalität der ZFN-ko-Methode nachzuweisen, welche zur Generierung der ApoE-ko-Ratte als pharmakologisches Modell verwendet wurde. Die Genotypisierung als auch die histologische Analyse einer potentiellen neuronalen Alzheimer-Erkrankung standen im Fokus dieser Arbeit.

Die DNA der ko- und der wt-Ratte wurde für die Sequenzanalyse aus den Leukozyten isoliert und ein Abschnitt des ApoE-Gens mittels PCR amplifiziert. Die Genotypisierung der Tiere erfolgte vorab von SAGETM Labs, ein Tochterunternehmen von Sigma-Aldrich. Die Unterlagen über die Genotypisierung sowie die DNA-Sequenzen der Ratten standen während der Forschungsarbeiten zur Verfügung. Anstelle mit der Standard PCR nach dem SAGETM Labs Protokoll zu beginnen, wurde die Versuchsreihe mit der TD PCR gestartet. Die TD PCR stellt die spezifischste Methode zur Amplifikation von Template-DNA dar. Sie beschreibt zwei sequentielle Prozesse. Im ersten Prozess lag die Starttemperatur anfänglich 7 °C oberhalb der optimalen Hybridisierungs-Temperatur der Primer. Die Temperatur wurde mit jedem Zyklus gesenkt, bis die optimale Hybridisierungs-Temperatur erreicht wurde. Die Oligonukleotide haben dadurch hochspezifisch an die DNA gebunden, weil bei der gegebenen Temperatur eine nicht der Zielsequenz entsprechende Hybridisierung extrem unwahrscheinlich war. Die generierten DNA-Abschnitte dienten im folgenden Amplifikations-Prozess als Templates. Das verwendete Primer-Paar wurde den SAGETM Labs Vorgaben nachempfunden und zur Spezifitätssteigerung um 1 bzw. 2 Nukleotide verlängert (siehe Abb. 6).

Das Ergebnis der Gelelektrophorese zeigte DNA-Amplifikate mit wenigen unspezifischen Banden. Die unspezifischen DNA-Fragmente lagen auf gleicher Laufhöhe in den Spuren der wt- und der ApoE-ko-Proben. Diese Tatsache spricht gegen beliebig zerkleinerte genomische DNA als Artefakt in der PCR. Stattdessen entstanden die Banden durch unspezifische Primer-Anlagerungen an die DNA, wobei DNA-Amplifikate generiert wurden, die nicht dem Abschnitt des ApoE-Gens entsprachen.

Es wurden weitere PCR's durchgeführt und die Resultate miteinander verglichen, um für die anschließende Sequenzierung das spezifischste PCR-Produkt auszuwählen. Die Standard PCR nach SageTM Labs Vorgaben lieferte eine größere Anzahl unspezifischer DNA-Fragmente. In einer Standard PCR ist die optimale Temperatur zur Primer-Hybridisierung konstant und liegt 5 °C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer. Die Standard PCR wurde bereits

dahingehend von SageTM Labs optimiert, dass für die Primer-Anlagerung die Schmelztemperatur ohne eine Differenz von 5 °C als Hybridisierungs-Temperatur verwendet wurde (siehe Kapitel 3.2.1.4 und Gl. 1 in Kapitel 3.1.3). Die Modifikation wurde in dieser Arbeit für die PCR nach SageTM Labs Vorgaben übernommen. Die unspezifisch amplifizierten Banden resultierten daher nicht aus einer zu geringen Temperatur für die Primer-Hybridisierung, stattdessen waren die Oligonukleotide zu kurz und unspezifisch. Das Design der Primer wurde aus dem SageTM Labs Protokoll übernommen. Die Primer waren verglichen mit den spezifisch designten Oligonukleotiden der TD PCR zwei Guanin-Adenin-Nukleotide bzw. ein Cytosin kürzer. Adenin-Guanin-Basenpaarungen verfügen über drei, und Adenin-Thymin-Basenpaarungen über zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit der DNA. Oligonukleotide mit hohem Guanin- und Cytosin-Anteil hybridisieren dadurch mit einer höheren Bindungsaffinität und spezifischer an die DNA, und benötigen eine höhere Schmelztemperatur um die Basenpaare von der DNA zu trennen.

Zur Optimierung der Qualität und Spezifität wurde die PCR modifiziert. Es wurden Oligonukleotide designt, die sich nicht an den SageTM Labs Vorgaben orientierten und an einem anderen Locus innerhalb des ApoE-Gens hybridisierten, als die zuvor verwendeten Primer (siehe Abb. 6). Die Temperatur zur Primer-Anlagerung lag 5 °C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer, und war damit vergleichsweise niedrig.

Das Ergebnis der Gelelektrophorese nach der Standard PCR zeigte im Vergleich zu den beiden vorangegangenen PCR's eine reduzierte Menge unspezifischer Amplifikate. Die verbesserte Spezifität der PCR-Produkte basierte auf dem hohen Guanin- und Cytosin-Anteil der eingesetzten Oligonukleotide. Im Vergleich zu den Oligonukleotiden der TD PCR und der SageTM Labs PCR waren die Primer der Standard PCR am spezifischsten. Außerdem waren die Schmelztemperaturen der beiden Primer der Standard PCR identisch. Die Schmelztemperaturen der Primer-Paare in der TD PCR sowie in der PCR nach SageTM Labs Vorgaben unterschieden sich dagegen um je 2 °C voneinander. Die optimale Temperatur zur Primer-Hybridisierung wurde jeweils mit der niedrigeren Temperatur ermittelt. Die Spezifität des jeweiligen Gegenprimers wurde dadurch herabgesetzt und sorgte für unspezifische DNA-Banden.

Die verbesserte Spezifität der Standard PCR ging mit einer verminderten DNA-Ausbeute einher. Das PCR-Programm enthielt 30 Amplifikations-Zyklen. Die TD PCR und die PCR nach dem SageTM Labs Protokoll beinhalteten jeweils 35 Zyklen.

In der Theorie wird von einer DNA-Verdopplung pro Zyklus ausgegangen, in der Realität liegt der Vermehrungsfaktor jedoch immer darunter. Zunächst ist die Template-Menge begrenzt und die Wahrscheinlichkeit, dass sich Template, Primer und Polymerase zusammenlagern relativ gering. Die dNTPs werden verbraucht, und später wird die DNA-Amplifikation durch die Zunahme von Pyrophosphat und rehydrierenden Produkten inhibiert (Mülhardt 2009). Geht man vereinfachend von einer Verdopplung pro Zyklus aus, entstehen nach gerade mal 30 Zyklen $1,07 \times 10^9$ Amplifikate. Dagegen entstehen bei 35 Zyklen bereits $3,44 \times 10^{10}$ DNA-Kopien, also 32 mal so viel DNA. Die verminderte DNA-Ausbeute der Standard PCR lässt sich also mit einer geringeren Zyklenzahl begründen.

Zusammenfassend lieferten alle in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Ansätze Amplifikate. Die Agarosegele zeigten die entscheidenden Unterschiede in den Laufweiten der wt- und der ApoE-ko-DNA. Die PCR nach Vorgaben des SageTM Labs Protokolls lieferte die unspezifischsten PCR-Produkte. Die Optimierung durch ein modifiziertes Primerdesign resultierte in der Standard PCR in einer höheren Spezifität. Die DNA-Ausbeute war im Vergleich zur TD PCR geringer, weshalb die dem ApoE-Genabschnitt entsprechenden DNA-Banden der TD PCR aus dem Agarosegel ausgeschnitten und für weitere Klonierungsschritte extrahiert wurden. An die DNA der wt- und der ApoE-ko-Ratte wurde dA an die 3'-Enden synthetisiert. Danach wurde die DNA zu einem Expressionsvektor mit 3'-dT-Überhängen gegeben und integriert. Anschließend erfolgte die Transformation der Plasmid-DNA in *E.coli*-Zellen. Zu Beginn wurden laut Herstellerangaben chemisch kompetente Zellen mit einer Transformationseffektivität von 1×10^9 cfu/ μ g DNA verwendet. Die Bakterien inkubierten für 15 Minuten auf Eis, bevor die Transformation durch einen Hitzeschock induziert wurde. Laut Herstellerangaben reichen für die Transformation 2 μ l Plasmid für 50 μ l Zellen. Bei der Versuchsdurchführung wurden 5 μ l Plasmid eingesetzt. Die transformierten Bakterien exprimierten das auf dem Plasmid befindliche Resistenzgen, und wurden zur Selektion des Plasmids auf antibiotikahaltigen Agar-Agar-Platten ausplattiert und bebrütet. Die Transformation war zunächst nicht erfolgreich, da keinerlei Vermehrung der Zellen stattfand. Eine zu geringe Plasmid-Menge konnte als Ursache für die erfolglose Transformation ausgeschlossen werden, stattdessen musste die Transformationseffektivität erhöht werden. Durch die PCR war ausreichend DNA der wt- und der ApoE-ko-Ratte vorhanden und konnte wie zuvor in den Expressionvektor integriert werden. Die Transformationseffektivität wurde bei der Versuchswiederholung gesteigert, indem die Bakterien für 30 Minuten vor der Transformation auf Eis inkubierten. Diese Versuchsoptimierung war ebenfalls nicht erfolgreich. Schließlich wurde laut

Herstellerangaben ein Klonierungsstamm mit einer Transformationseffektivität von mindestens 5×10^9 cfu/ μ g DNA verwendet. Die Effektivität dieses Transformationssystems lag damit 5 mal höher als bei den zuvor eingesetzten Bakterien. Nach der Transformation wuchsen die *E.coli*-Zellen auf den antibiotikahaltigen Nährböden zu Kolonien heran. Einzelne Kolonien wurden selektiert und zur Replikation des Plasmids in antibiotikahaltigen Flüssigkulturen vermehrt. Anschließend erfolgte eine Minipräparation zur Isolierung der Plasmid-DNA. Die DNA der in Bezug auf das GOI mittels Restriktionsverdau positiv getesteten wt- und ApoE-ko-Klone wurde sequenziert. Der Vergleich der Sequenzen beider Tiere ließ Unterschiede in Exon 3 des ApoE-Gens erkennen, da im ko-Tier aufgrund der künstlichen Mutation Basenpaare deletiert wurden. Das Ergebnis der Sequenzierung der DNA beider Ratten ergab eine 100 %ige Übereinstimmung mit den von SageTM Labs vorgegebenen Sequenzen. Die Sequenzierung belegte das durch diese Arbeit zu bestätigende Postulat der Firma Sigma-Aldrich mittels ZFN gezielte Mutationen zu generieren. Für das Unternehmen CSL Behring GmbH bedeutet dies, dass die Forschung zukünftig auf derartig generierte Modellorganismen aufgebaut werden kann. Beispielsweise könnten in Folge dessen Medikamente gegen die Blutungsneigung von Hämophilie-A-Patienten, die an einer genetisch bedingten Verminderung des Gerinnungsfaktor VIII leiden, künftig an Faktor VIII ko-Ratten anstelle von ko-Mäusen untersucht werden. Die Verwendung von Ratten ist vorteilhaft, da Ratten physiologisch besser charakterisiert sind als Mäuse und dadurch als Tiermodelle geeigneter erscheinen, um auf den Menschen übertragbare Erkenntnisse zu gewinnen (Jacob 1999). Des Weiteren sind Ratten größer als Mäuse, wodurch z.B. mehr Blut für Arzneimitteluntersuchungen zur Verfügung steht. Eine ausgewachsene Maus mit einem Körpergewicht von 25 g verfügt über ein absolutes Blutvolumen von nur 1,7 ml, während eine 300 g schwere Ratte 19 ml Blut besitzt (Gesellschaft für Versuchstierkunde 2009). Die CSL Behring GmbH plant wegen diesen Vorteilen eine Gerinnungsfaktor VIII ko-Ratte bei Sigma-Aldrich in Auftrag zu geben, welche mittels ZFN generiert werden soll. SageTM Labs, das Tochterunternehmen von Sigma-Aldrich, verfügt über verschiedene Tiermodelle, wie z.B. ApoE- und p53-ko-Ratten, und bietet die Generierung von beliebigen Tiermodellen an.

Die Mutation des ApoE-Gens verursacht in ApoE-ko-Tieren die neurodegenerative Alzheimer-Krankheit. Die Alzheimer-Krankheit ist durch A β -Plaques, intrazelluläre Neurofibrillenbündel und durch eine verminderte Neuronenanzahl gekennzeichnet (Maier et al. 2011). Außerdem werden entzündlichen Prozessen eine weitere Bedeutung in der Alzheimer-Pathogenese beigemessen (Harry et al. 2000). Die neuronalen Veränderungen treten hauptsächlich in limbischen Arealen, dem *Neocortex*, in Kernbereichen des

Hirnstammes, aber auch im *Striatum* auf (Purves et al. 2004; Gearing et al. 1993). Die histologische Untersuchung des potentiell an Alzheimer erkrankten ko-Tieres und des Kontrolltieres erfolgte an den entnommenen Gehirnen. Nach der Formalin-Fixierung der Gehirne wurden Gefrierschnitte angefertigt. Schnitte mit dem *Hippocampus*, dem *Cortex* und dem *Striatum* wurden zur Differenzierung der Gewebsstrukturen gefärbt, oder zum Nachweis von pathologischen Veränderungen mit spezifischen Antikörpern behandelt. Die angewandten Färbemethoden zur Visualisierung der Gewebestrukturen waren für Gefrierschnitte aus Rattengehirnen von den Mitarbeitern der CSL Behring GmbH etabliert worden. Die HE-Übersichtsfärbung ließ keine Unterschiede im direkten Vergleich im Gehirn der ApoE-ko- und der wt-Ratte erkennen. Die Kongorot- oder die strukturgebendere Kongorot-Hämatoxylin-Färbung diente dem potentiellen Nachweis von Amyloid-Plaques, zeigte jedoch keine Amyloid-Ablagerungen im Gehirn der ApoE-ko-Ratte.

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen im Hinblick auf eine Alzheimer-Erkrankung diskutiert. Es wurden Antikörper gegen die Proteine NeuN, GFAP, MPO und Iba1 verwendet, um eine potentielle Alzheimer-Erkrankung durch eine verminderte Neuronenanzahl und durch inflammatorische Prozesse im Gehirn des ApoE-ko-Tieres nachzuweisen. Zur Färbung der Nervenzellen wurden Anti-NeuN-Antikörper verwendet. Es konnte keine optische Differenz in der Zelldichte der ApoE-ko-Ratte im Vergleich zur wt-Ratte festgestellt werden, was gegen eine Neuronendegeneration und eine Alzheimer-Pathogenese im ko-Tier spricht. Auch die GFAP-Färbung ergab keine Hinweise auf degenerierende Neuronen. Die Färbung diente dem Nachweis von Astrozyten, die in sämtlichen Hirnarealen im ko- sowie im wt-Tier gleichermaßen erkennbar waren. Durch eine Neuronendegeneration in Folge einer Alzheimer-Erkrankung wäre die GFAP-Expression gesteigert gewesen (Middeldorp und Hol 2011).

Die MPO ist ein Enzym, welches nach inflammatorischer Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten vermehrt exprimiert wird (Reynolds et al. 1999). Die MPO-Antikörperfärbung ergab keine positiven Signale in beiden Ratten, es ließ sich also keine Entzündung nachweisen. Dagegen visualisierte die Iba1-Färbung eine Mikroglia-Ansammlung im *Cortex* des ko-Tieres. Die erhöhte Zelldichte deutete auf einen inflammatorischen Prozess hin. Als Reaktion auf neuronale Erkrankungen werden Gliazellen vermehrt gebildet (Luo et al. 2010). Die aktivierten Zellen waren weder mit A β -Plaques co-lokalisiert, noch waren sie diffus über verschiedene Hirnareale verteilt, wie es bei einer Alzheimer-Erkrankung zu erwarten wäre. Es kann daher nicht davon ausgegangen werden, dass die neuronalen Veränderungen mit einer Alzheimer-Erkrankung in Verbindung

stehen, die tatsächliche Ursache ist jedoch unklar. Die Tatsache, dass im *Cortex* der ApoE-ko-Ratte eine entzündliche Reaktion mit einem Antikörper gegen Iba1 nachgewiesen werden konnte, nicht jedoch mit einem Anti-MPO-Antikörper, lässt sich damit erklären, dass die Aktivierung der Mikroglia als Erstes in der Immunabwehr des ZNS einsetzt (Luo et al. 2010). Eine erhöhte Mikroglia-Zelldichte kann daher bereits nachgewiesen werden, wenn neutrophile Granulozyten und Monozyten noch nicht aktiviert sind und die MPO-Färbung negativ erscheint.

Alle Übersichts- und immunhistochemischen Färbungen des Gehirns der ApoE-ko-Ratte zeigten keine Hinweise auf eine Alzheimer-Pathogenese. Die hier erzielten Ergebnisse bedeuten keinesfalls, dass die ApoE-ko-Ratte ein ungeeignetes Tiermodell für die Erforschung der Alzheimer-Erkrankung darstellt. Die phänotypische Untersuchung der Ratten während des Praxissemesters wies bereits eine Störung im Fettmetabolismus der ApoE-ko-Ratte nach. Das ko-Tier besaß ein größeres Körpergewicht als die wt-Ratte. Zum Zeitpunkt der Terminierung der Tiere wog die ApoE-ko-Ratte 324 g und die wt-Ratte 312 g. Der durchschnittliche Futter- und Wasserverbrauch beider Tiere war nahezu identisch und zeigte keine signifikanten Unterschiede. Da die ko-Ratte nicht mehr Nahrung aufnahm als das wt-Tier, musste ihr Fettstoffwechsel gestört sein. Das bestätigte die Vermutung, dass das etwas größere Körpergewicht der ko-Ratte eine Folge des ApoE-Gen-ko's war. Außerdem zeigte die von dem veterinärmedizinischen Labor der Firma Biocontrol durchgeführte Serumanalyse signifikante Unterschiede in den klinischen Parametern der Tiere. Die Gesamtcholesterin- und LDL-Werte waren im ApoE-ko-Tier ca. 4,5 mal bzw. 25,5 mal so hoch wie im Kontrolltier. Die Arbeitsgruppe um Ullrich zeigte bereits, dass erhöhte Cholesterinwerte eine Alzheimer-Erkrankung in Ratten begünstigt. In der Studie wurden 6 Monate alte naive männliche SD-Ratten für 5 Monate mit einem um 5 % Cholesterin angereicherten Spezialfutter ernährt. Nach 2 Monaten war eine signifikante Gewichtszunahme im Vergleich zu den Kontrolltieren zu beobachten. Auch das Serumcholesterin war deutlich erhöht. Die mit Cholesterin behandelten Tiere zeigten in Verhaltensversuchen eingeschränkte kognitive Fähigkeiten. Ein ELISA Test wies eine erhöhte A β -Konzentration im *Cortex* der Tiere nach, was auch mit einer immunhistochemischen Färbung visualisiert wurde. Diese Ergebnisse zeigten Indizien einer Alzheimer-Erkrankung (Ullrich et al. 2010).

Die in dieser Arbeit erbrachten Resultate lassen keine Rückschlüsse auf eine Alzheimer-Pathogenese im ApoE-ko-Tier zu, wofür mehrere Ursachen denkbar sind. Zunächst ist darauf hinzuweisen, dass die Untersuchung eines Tieres keine allgemeingültigen

Aussagen zulässt, da es sich um eine nicht signifikante Tierzahl handelt. Des Weiteren war die Ratte mit 5,5 Monaten wahrscheinlich zu jung, um an Alzheimer zu erkranken. Die Ratten in der oben genannten Studie von der Arbeitsgruppe um Ullrich waren mit beispielsweise 11 Monaten deutlich älter als sie neuronale Veränderungen zeigten. Der direkte Vergleich mit diesen Tieren ist jedoch nicht möglich, da es sich nicht um ApoE-ko-, sondern um naive Ratten handelte. Der Lipidmetabolismus der naiven Tiere war dennoch mit dem der ApoE-ko-Ratte vergleichbar, da die Tiere über einen längeren Zeitraum mit Fettfutter ernährt wurden (Ullrich et al. 2010). Eine Studie von Raber et al. zeigt außerdem, dass mit Standardfutter ernährte ApoE-ko-Mäuse neurodegenerative Veränderungen ab einem Alter von 5 – 6 Monaten aufweisen, was vermuten lässt, dass auch eine Alzheimer-Erkrankung in ApoE-ko-Ratten nicht vorher auftritt (Raber et al. 1998).

Die Verwendung von weiblichen Ratten in dieser Arbeit war möglicherweise nicht zweckdienlich, da Östrogen hypolipidämisch wirkt. Durch das Hormon wird die hepatische Cholesterinaufnahme erhöht und vermindert damit die Wahrscheinlichkeit einer Alzheimer-Erkrankung (De Marinis et al. 2008). Die Fütterung von Fettfutter anstelle der Standardnahrung hätte die Pathogenese möglicherweise begünstigt.

Die Untersuchung männlicher Ratten im fortgeschrittenen Alter und in signifikanter Anzahl könnte künftig die mit ZFN generierte ApoE-ko-Ratte als nützliches Tiermodell für die Alzheimer-Pathogenese etablieren. Das Tiermodell ermöglicht die Erforschung der Funktion des ApoE's in der Alzheimer-Krankheit. Ein besseres Verständnis für die Funktion des Proteins im ZNS im murinen Tiermodell könnte neue, auf den Menschen übertragbare Erkenntnisse liefern und dabei helfen, eine Heilmethode gegen die Krankheit zu finden. Die bisher entwickelten Arzneistoffe können die Erkrankung nicht heilen. Sogenannte Antidementiva verzögern lediglich die Abnahme der kognitiven Leistungsfähigkeiten der Patienten. Mit Psychopharmaka lassen sich eventuelle psychische Veränderungen und Verhaltensauffälligkeiten behandeln, während nicht medikamentöse Therapien der Erhaltung der alltagsspezifischen Fähigkeiten dienen (Maier et al. 2011).

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde von SAGE™ Labs, ein Tochterunternehmen von Sigma-Aldrich, eine Wildtyp- (wt) und eine mit Zinkfingernukleasen generierte Apolipoprotein E (ApoE) knock-out-Ratte (ko) erworben, um diese genetisch und histologisch zu untersuchen.

Die genomische DNA der Tiere wurde aus dem Blut isoliert. Die Amplifikation eines ApoE-Genabschnitts erfolgte mittels touchdown PCR (TD PCR), PCR nach Vorgaben des SAGE™ Labs Protokolls und Standard PCR. Es wurden verschiedene PCR's durchgeführt und die DNA-Produkte elektrophoretisch nach der molekularen Größe getrennt, um für die anschließende Sequenzierung das spezifischste PCR-Produkt auszuwählen. Die DNA der TD PCR beider Tiere wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und für weitere Klonierungsschritte extrahiert. Die aufgereinigte DNA wurde zwecks Genotypisierung in einen Expressionsvektor integriert, in *E.coli*-Zellen transformiert und anschließend sequenziert. Der Sequenzvergleich der ApoE-ko- und der wt-Ratte wies die Mutation innerhalb des ApoE-Gens nach, und der Vergleich mit der von SAGE™ Labs ermittelten DNA-Sequenz belegte die Funktionalität der neuen Zinkfingernuklease-ko-Technik.

Die ApoE-ko-Ratte wurde außerdem als Tiermodell zur histologischen Untersuchung einer neuronalen Alzheimer-Erkrankung genutzt. Die Untersuchung des potentiell an Alzheimer erkrankten ko-Tieres und des Kontrolltieres erfolgte an den entnommenen Gehirnen. Nach der Formalin-Fixierung der Gehirne wurden Gefrierschnitte angefertigt. Schnitte mit dem *Hippocampus*, dem *Cortex* und dem *Striatum* wurden zur Differenzierung der Gewebsstrukturen gefärbt, oder zum Nachweis von pathologischen Veränderungen mit Antikörper gegen die Proteine NeuN, Iba1, MPO und GFAP behandelt. Alle Übersichts- und immunhistochemischen Färbungen der Gewebeschnitte der ko-Ratte zeigten keine Hinweise auf eine Alzheimer-Pathogenese. Die Etablierung der ApoE-ko-Ratte als Tiermodell für die Alzheimer-Erkrankung könnte zukünftig neue Erkenntnisse in Bezug auf die Funktion des ApoE-Proteins in der Alzheimer-Krankheit liefern.

7 Literaturverzeichnis

7.1 Publikationen

Chandrasegaran, S., Smith, J. 1999. Chimeric restriction enzymes: what is next? *Biol Chem.* 380(7-8):841-8.

Choi, J., Forster, M.J., McDonald, S.R., Weintraub, S.T., Carroll, C.A., Gracy, R.W. 2004. Proteomic identification of specific oxidized proteins in ApoE-knockout mice: relevance to Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 36(9):1155-62.

Cui, X., Ji, D., Fisher, D.A., Wu, Y., Briner, D.M., Weinstein, E.J. 2011. Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol.* 29(1):64-7.

De Marinis, E., Martini, C., Trentalance, A., Pallottini, V. 2008. Sex differences in hepatic regulation of cholesterol homeostasis. *J Endocrinol.* 198(3):635-43.

Doyon, Y., McCammon, J.M., Miller, J.C., Faraji, F., Ngo, C., Katibah, G.E., Amora, R., Hocking, T.D., Zhang, L., Rebar, E.J., Gregory, P.D., Urnov, F.D., Amacher, S.L. 2008. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol.* 26(6):702-8.

Duyckaerts, C., Potier, M.C., Delatour, B. 2008. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.* 115(1):5-38. Epub 2007 Nov 16.

Frid P., Anisimov, S.V., Popovic, N. 2007. Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev.* 53(1):135-60.

Fung, W.P., Howlett, G.J., Schreiber, G. 1986. Structure and expression of the rat apolipoprotein E gene. *J Biol Chem.* 261(29):13777-83.

Gearing, M., Wilson, R.W., Unger, E.R., Shelton, E.R., Chan, H.W., Masters, C.L., Beyreuther, K., Mirra, S.S. 1993. Amyloid precursor protein (APP) in the striatum in Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 52(1):22-30.

Gesellschaft für Versuchstierkunde. GV-SOLAS. 2009. Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren.

Geurts, A.M., Cost, G.J., Freyvert, Y., Zeitler, B., Miller, J.C., Choi, V.M., Jenkins, S.S., Wood, A., Cui, X., Meng, X., Vincent, A., Lam, S., Michalkiewicz, M., Schilling, R., Foeckler, J., Kalloway, S., Weiler, H., Ménoret, S., Anegon, I., Davis, G.D., Zhang, L., Rebar, E.J., Gregory, P.D., Urnov, F.D., Jacob, H.J., Buelow, R. 2009. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*. 24;325(5939):433.

Geurts, A.M., Moreno, C. 2010. Zinc-finger nucleases: new strategies to target the rat genome. *Clin Sci (Lond)*. 119(8):303-11.

Hall, B., Limaye, A., Kulkarni, A.B. 2009. Overview: generation of gene knockout mice. Chapter 19:Unit 19.12 19.12.1-17.

Harry, G.J., Lefebvre d'Hellencourt, C., Bruccoleri, A., Schmechel, D. 2000. Age-Dependent Cytokine Responses: Trimethyltin Hippocampal Injury in Wild-Type, APOE Knockout, and APOE4 Mice. *Brain Behav Immun*. 14(4):288-304.

Hatters, D.M., Peters-Libeu, C.A., Weisgraber, K.H. 2006. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem Sci*. (8):445-54. Epub 2006 Jul 3.

Hoy, A., Leininger-Muller, B., Kutter, D., Siest, G., Visvikis, S. 2002. Growing significance of myeloperoxidase in non-infectious diseases. *Clin Chem Lab Med*. 40(1):2-8.

Hussain, MM., Bucher, N.L., Faris, B., Franzblau, C., Zannis, V.I. 1988. Tissue-specific posttranslational modification of rat apoE. Synthesis of sialated apoE forms by neonatal rat aortic smooth muscle cells. *J Lipid Res*. 29(7):915-23.

Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., Kohsaka, S. 1998. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res*. 57(1):1-9.

Jacob, H.J. 1999. Functional Genomics and Rat Models. *Genome Res*. 9(11):1013-6.

Jin, M., Shepardson, N., Yang, T., Chen, G., Walsh, D., Selkoe, D.J. 2011. Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(14):5819-24. Epub 2011 Mar 18.

Kato, S., Gondo, T., Hoshii, Y., Takahashi, M., Yamada, M., Ishihara, T. 1998. Confocal observation of senile plaques in Alzheimer's disease: senile plaque morphology and relationship between senile plaques and astrocytes. *Pathol Int*. 48(5):332-40.

Kim, K.K., Adelstein, R.S., Kawamoto, S. 2009. Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J Biol Chem*. 284(45):31052-61.

- Kim, Y.G., Cha, J., Chandrasegaran, S.** 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(3): 1156–1160.
- Kim, Y.G., Chandrasegaran, S.** 1994. Chimeric restriction endonuclease. 91(3): 883–887.
- Lanza, F.** 1998. Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *J Mol Med (Berl).* 76(10):676-81.
- Luo, X.G., Ding, J.Q., Chen, S.D.** 2010. Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. *Mol Neurodegener.* 24;5:12.
- Mahley, R.W.** 1988. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science.* 240(4852):622-30.
- Mahley, R.W., Rall, S.C. Jr.** 2000. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 1:507-37.
- Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Huang, Y.** 2009. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J Lipid Res.* 50 Suppl:S183-8.
- Mashimo, T., Takizawa, A., Voigt, B., Yoshimi, K., Hiai, H., Kuramoto, T., Serikawa, T.** 2010. Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS One.* 25;5(1):e8870.
- Middeldorp, J., Hol, E.M.** 2011. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol.* 93(3):421-43.
- Porteus, M.H., Carroll, D.** 2005. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat Biotechnol.* 23(8):967-73.
- Raber, J., Wong, D., Buttini, M., Orth, M., Bellosta, S., Pitas, R.E., Mahley, R.W., Mucke, L.** 1998. Isoform-specific effects of human apolipoprotein E on brain function revealed in ApoE knockout mice: increased susceptibility of females. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(18):10914-9.
- Reardon, C.A., Driscoll, D.M., Davis, R.A., Borchardt, R.A., Getz, G.S.** 1986. The charge polymorphism of rat apoprotein E. *J Biol Chem.* 261(10):4638-45.
- Reynolds, W.F., Rhee, J., Maciejewski, D., Paladino, T., Sieburg, H., Maki, R.A., Masliah, E.** 1999. Myeloperoxidase polymorphism is associated with gender specific risk for Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 155(1):31-41.
- Stevenson, S.C., Marshall-Neff, J., Teng, B., Lee, C.B., Roy, S., McClelland, A.** 1995. Phenotypic correction of hypercholesterolemia in apoE-deficient mice by adenovirus-mediated in vivo gene transfer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15(4):479-84.

Taylor, J.M., Lauer, S., Elshourbagy, N., Reardon, C., Taxman, E., Walker, D., Chang, D., Paik, Y.K. 1987. Structure and evolution of human apolipoprotein genes: identification of regulatory elements of the human apolipoprotein E gene. *Ciba Found Symp.* 1987;130:70-86.

Tesseur, I., Zou, K., Esposito, L., Bard, F., Berber, E., Van Can, J., Lin, A.H., Crews, L., Tremblay, P., Mathews, P., Mucke, L., Masliah, E. Wyss-Coray, T. 2006. Deficiency in neuronal TGF-beta signaling promotes neurodegeneration and Alzheimer's pathology. *J Clin Invest.* 116(11):3060-9.

Tong, C., Huang, G., Ashton, C., Li, P., Ying, Q.L. 2011. Generating gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nat Protoc.* 6(6):827-44.

Ullrich, C., Pirchl, M., Humpel, C. 2010. Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. *Mol Cell Neurosci.* 45(4):408-17.

Urnov, F.D., Miller, J.C., Lee, Y.L., Beausejour, C.M., Rock, J.M., Augustus, S., Jamieson, A.C., Porteus, M.H., Gregory, P.D., Holmes, M.C. 2005. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature.* 435(7042):646-51.

Vasquez, K.M., Marburger, K., Intody, Z., Wilson, J.H. 2001. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(15): 8403–8410.

Weisgraber, K.H., Mahley, R.W. 1996. Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection. *FASEB J.* 10(13):1485-94.

7.2 Bücherquellen

Mülhardt, C. 2009. Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics 6. Auflage. (Spektrum Akad. Verl.).

Schenkel, J. 2006. Transgene Tiere 2. Auflage (Springer)

Horn, F. 2009. Biochemie des Menschen 4. Auflage (Thieme)

Silbernagel, S., Despopolus, A. 2003. Taschenatlas der Physiologie 6. Auflage (Thieme)

Maier, W., Schulz, J.B., Weggen, S., Wolf, S. 2011. Alzheimer & Demenzen verstehen (Trias)

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A.S., McNamara, J.O., Williams, S.M. 2004. Neuroscience 3. Auflage (Sinaur Associates, Inc. Publishers)

Lottspeich, F., Engels, J.W. 2006. Bioanalytik 2. Auflage (Spektrum Akad. Verl.)

Romeis, B., Böck, P. 1989. Mikroskopische Technik 17. Auflage (Urban & Schwarzenberg)

8 Anhang



SD-ApoE^{tm1sage} Model Genotyping Protocol

Prepare PCR reaction as below.

Reaction components	Volume (μ l)	Final concentration
DNA template	1	-
10 μ M Cel-1 F primer	5	1 μ M
10 μ M Cel-1 R primer	5	1 μ M
Sigma JumpStart TM Taq ReadyMix TM (P2893)	25	1x
ddH ₂ O	14	-
	50 μ l reaction	

Primers	Sequence – 5' - 3'
ApoE small F	cgagggagagctggaggt
ApoE small R	tgtgtgacttgggagctctg

Cycling conditions:

Cycle Step	Temp ($^{\circ}$ C)	Time	
1	95	3 min	
2	95	30s	x35 cycles
3	60	30s	
4	68	40s	
5	68	5 min	
6	4	forever	

LacZ α initiation codon

M13 Reverse priming site | T3 priming site

201 CACACAGGAA ACAGCTATGA CCATGATTAC GCCAAGCTCA GAATTAACCC TCACTAAAGG
 GTGTGTCCTT TGTCGATACT GGTACTAATG CCGTTTCGAGT CTTAATTGGG AGTGATTTC

Spe I Pst I Pme I EcoR I EcoR I Not I

261 GACTAGTCCT GCAGGTTTAA ACGAATTGCG CCTT PCR Product AAGGGC GAATTCGCGG
 CTGATCAGGA CGTCCAAATT TGCTTAAGCG GGA A TTCCCG CTTAAGCGCC

T7 priming site M13 Forward (-20) priming site

311 CCGCTAAATT CAATTCGCC TATAGTGAGT CGTATTACAA TCACTGGCC GTCGTTTAC
 GCGGATTTAA GTTAAGCGGG ATATCACTCA GCATAATGTT AAGTGACCGG CAGCAAAATG



Abbildung 17: Vektorkarte des pCR[®] 4-TOPO[®]-Vektors (Fa. Invitrogen)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Carolin Elisabeth Zerahn, geboren am 30.07.1988 in Marburg, an Eidesstatt, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbstständig angefertigt und ausschließlich die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder anderen Quellen entnommen sind, sind als solche eindeutig kenntlich gemacht. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht veröffentlicht und noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Hamburg, 18.10.2011

Carolin Zerahn