

Transkriptionsfaktor AP-2 γ in Keimzellentwicklung und Keimzelltumorentstehung

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

vorgelegt von Susanne Nicole Weber

im Januar 2007

1. Referent: Prof. Dr. H. Schorle
2. Referent: Prof. Dr. D. Fürst

Tag der Promotionsprüfung: 11. Mai 2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erklärung zur Urheberschaft

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Wörtlich oder indirekt übernommenes Gedankengut wurde als solches kenntlich gemacht. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht wurde.

Susanne Nicole Weber, im Januar 2007

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Arbeitsgruppenleiter und Doktorvater Prof. Hubert Schorle für die Unterstützung dieser Arbeit und wertvolle Diskussionen in allen Lebenslagen.

Außerdem danke ich Prof. Fürst für die Übernahme des Koreferats.

Ich möchte Prof. Willecke und Prof. Büttner für die Bereitschaft danken, als Mitglieder meiner Prüfungskommission zu fungieren.

Danken möchte ich allen Kollegen und Kolleginnen, insbesondere Inge Heim, dem Diagnostikteam, dem Immunolabor, dem Tierstallteam und Gaby Beine für ihre großen und kleinen Hilfen im Laboralltag. Außerdem danke ich Richard Jäger für die vielen wertvollen Diskussionen.

Ich bedanke mich bei Dr. Garbe für die Bestrahlung der Feeder-Zellen und bei Dr. Reinsberg für die Hilfe bei der Hormonbestimmung.

Großer Dank geht an meine Familie, besonders an meine Eltern und ihre Lebenspartner für das Interesse und die Unterstützung, ohne die diese Arbeit in ihrer Form nicht möglich gewesen wäre.

Ich bedanke mich bei meinen Freunden für ihre uneingeschränkte Unterstützung, die mir - besonders im letzten Jahr - immer wieder Auftrieb gegeben hat. Vielen Dank Kathrin, Mine, Bö, Dawid und Inge. Ihr seid die besten Freunde, die man sich wünschen kann.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die Rolle von AP-2 γ während der Keimzellentwicklung und Keimzelltumorentstehung untersucht werden.

AP-2 γ gehört zur Familie der AP-2-Transkriptionsfaktoren. Mitglieder dieser Familie werden in der Embryonalentwicklung in verschiedensten Geweben exprimiert und sind in biologische Vorgänge wie Zellzykluskontrolle, Proliferation und Apoptose involviert.

Der Verlust von AP-2 γ führt zu einem embryonal letalen Phänotyp, der sich bereits am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung manifestiert. Betroffen sind hier die extraembryonalen Gewebe, weswegen es zu einer Unterversorgung des Embryos kommt. Um diesen embryonal letalen Phänotyp zu umgehen, wurde ein Mausmodell etabliert, welches es erlaubt, AP-2 γ durch Cre-vermittelte Exzision gewebs- und zelltypspezifisch auszuschalten, um so Defekte im Tier zu untersuchen.

Zuerst wurde das Expressionsmuster von AP-2 γ analysiert, wobei sich herausstellte, dass AP-2 γ in der Embryonalentwicklung unter anderem in den primordialen Keimzellen exprimiert wird. Die primordialen Keimzellen entstehen bereits am Tag 7,5 der Embryonalentwicklung an der Basis der Allantois, treten von dort aus in den Embryo ein und wandern entlang des Enddarms zu den Genitalanlagen, aus denen später Hoden und Ovarien entstehen. Verpaarungen mit ubiquitär exprimierenden Cre-Mäusen konnten zeigen, dass der Verlust von AP-2 γ zu einem Verlust der Keimzellen zwischen Tag 7,5 und Tag 8,5 der Embryonalentwicklung führt. Die Keimzellmigration wird nicht eingeleitet. Dieser Verlust führt zur Sterilität der Tiere in beiden Geschlechtern. Der beobachtete Phänotyp ist zell-intrinsisch, was durch Verpaarung mit einer Keimzell-spezifischen Cre-Linie gezeigt werden konnte. Um genauen Aufschluss über den Mechanismus des Keimzellverlustes zu bekommen, wurde die AP-2 γ -abhängige Transaktivierung von Kit analysiert.

Um einen möglichen Gendosiseffekt von AP-2 γ zu untersuchen, wurden AP-2 γ heterozygote Tiere in den genetischen Hintergrund 129/SV eingekreuzt. Dieser genetische Hintergrund bietet sich für Analysen von Keimzellen und Keimzelltumoren an, da Wildtyp-Mäuse dieses Hintergrundes mit geringer Inzidenz spontan Teratome entwickeln. Männliche heterozygote AP-2 γ -Tiere entwickelten in der 7. Generation im 129/SV-Hintergrund Teratome mit einer Inzidenz von 95%. Die Teratome traten sowohl uni- als auch bilateral auf und enthielten ausdifferenzierte Gewebe. Es konnte gezeigt werden, dass Keimzellen heterozygoter Tiere in Kultur verstärkt proliferieren.

Am Ende dieser Arbeit wird ein Modell diskutiert, welches versucht, die gefundenen Ergebnisse in den heutigen Kenntnisstand zu integrieren und die Rolle von AP-2 γ in Keimzellentwicklung und Keimzelltumorentstehung zu erklären.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung zur Urheberschaft	II
Danksagung	III
Zusammenfassung	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
1.1 Keimzellen	1
1.1.1 Die Entwicklung der murinen Keimzellen	1
1.1.2 Die Entwicklung des Ovars	5
1.1.3 Die Entwicklung des Hodens	7
1.1.4 Hypogonadismus	8
1.1.5 Keimzelltumore	9
1.1.5.1 Teratome	10
1.2 Transkriptionsfaktorfamilie AP-2	11
1.2.1 Allgemeiner Aufbau	11
1.2.2 AP-2 α	12
1.2.3 AP-2 β	13
1.2.4 AP-2 γ	14
1.2.4.1 AP-2 γ in humanen Keimzellen und Keimzelltumoren	15
1.2.5 AP-2 δ	16
1.2.6 AP-2 ϵ	17
1.2.7 AP-2 in anderen Spezies	17
1.2.8 Mechanismen von AP-2	19
1.3 Gezielte Mutagenese	20
1.3.1 Herstellung von konstitutiven Nullmutanten	20
1.3.2 Herstellung von konditionalen Nullmutanten	21
1.3.3 Generation AP-2 γ -konditional-defizienter Mäuse	22
1.4 Zielsetzung	23
2. Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Allgemeine Chemikalien	25
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	27

2.1.3 Radiochemikalien	27
2.1.4 Verwendete Enzyme	28
2.1.5 Medien und Chemikalien für die Zellkultur	28
2.1.6 Allgemeine Lösungen	29
2.1.7 Lösungen für die Bakterienkultur	30
2.1.8 Lösungen für <i>In Situ</i> Hybridisierung	30
2.1.9 Lösungen für Antikörperfärbung von Embryonen.....	31
2.1.10 Lösungen für die Zellkultur	31
2.1.11 Verwendete Kits	31
2.1.12 Oligonukleotide.....	32
2.1.13 Verwendete Plasmide.....	32
2.1.14 Verwendete Mauslinien	33
2.1.15 Verwendete Bakterien	33
2.1.16 Verwendete Membranen	33
2.1.17 Verwendete Antikörper	33
2.1.18 Verwendete Zelllinien	34
2.2 Methoden	34
2.2.1 Tierhaltung.....	34
2.2.2 DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien der Maus	35
2.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	35
2.2.4 Agarosegelelektrophorese.....	36
2.2.5 Analytischer und präparativer Verdau von DNA.....	36
2.2.6 Präparation von Dialyseschläuchen	36
2.2.7 Elektroelution von DNA-Fragmenten.....	36
2.2.8 Phenol/Chloroform-Extraktion nukleinsäurehaltiger Lösungen	37
2.2.9 Ethanol-Präzipitation nukleinsäurehaltiger Lösungen	37
2.2.10 Herstellung von Agar-Platten.....	37
2.2.11 Präparation kompetenter Bakterien.....	37
2.2.12 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien	38
2.2.13 Klonierung von PCR-Produkten	38
2.2.14 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA („Mini-Präp“).....	38
2.2.15 Präparation großer Mengen Plasmid-DNA („Maxi-Präp“).....	39
2.2.16 Konzentrationsbestimmung nukleinsäurehaltiger Lösungen im Photometer.....	39
2.2.17 Herstellung radioaktiv markierter Sonden	39
2.2.18 Hybridisierung.....	40
2.2.19 RNA-Isolierung aus Zellen.....	40
2.2.20 RNA-Isolierung aus Geweben	41

2.2.21 cDNA-Synthese	41
2.2.22 Expressionsnachweis mittels RT (Reverse Transkriptase) -PCR	41
2.2.23 Digoxigenin-Markierung von RNA	42
2.2.24 <i>In Situ</i> Hybridisierung von Embryonen	42
2.2.25 Alkalische Phosphatase-Färbung von Embryonen.....	43
2.2.26 Antikörper-Färbung von Embryonen	44
2.2.27 Gewinnung von Serum aus Mäusen	44
2.2.28 Bestimmung von Hormonwerten aus Serum.....	44
<i>Histologie</i>	45
2.2.29 Fixierung.....	45
2.2.30 Einbetten	45
2.2.31 Herstellung von Paraffinschnitten.....	45
2.2.32 Hämatoxylin/Eosin (H/E)-Färbung von Paraffinschnitten	45
2.2.33 Immunhistochemie	46
2.2.34 Periodsäure-Schiff (PAS)-Färbung.....	47
2.2.35 Lasermikrodissektion von Gewebe aus Paraffinschnitten	47
<i>Zellkultur</i>	47
2.2.36 Auftauen von Zellen.....	47
2.2.37 Mediumwechsel.....	47
2.2.38 Splitten von Zellen	47
2.2.39 Zählen von Zellen	48
2.2.40 Einfrieren von Zellen.....	48
2.2.41 Gelatinisieren von Zellkulturschalen und -platten.....	48
2.2.42 Handhabung von SI/SI ⁴ mSCF220	48
2.2.43 Keimzellkultur	49
2.2.44 Transfektionen von HepG2.....	49
2.2.45 Luziferase-Assay	49
2.2.46 Alkalische Phosphatase-Färbung von Zellen	49
3. Ergebnisse	51
3.1 Die Expression von AP-2 γ	51
3.1.1 Allgemeine Expressionsanalysen.....	51
3.1.2 Zelltyp-spezifische Expressionsanalysen	53
3.2 AP-2 γ -konditional-defiziente Tiere.....	56
3.2.1 Verpaarungsschema	56
3.2.2 Genotypisierung	57
3.2.3 Der ubiquitäre Phänotyp.....	59

3.2.3.1 Makroskopie	59
3.2.3.2 Histologie.....	60
3.2.3.3 Nachweis der unvollständigen Cre-Exzision	63
3.2.3.4 Serumwerte der AP-2 γ Δ /-:M Tiere	64
3.2.4 Der Keimzell-spezifische Phänotyp	65
3.2.4.1 Histologie adulter Gonaden	65
3.2.4.2 Histologie neonataler Gonaden	68
3.2.4.3 Statistik	70
3.2.5 Der ubiquitäre Phänotyp während der Embryogenese.....	70
3.3 Untersuchungen zum Mechanismus	74
3.4 Teratomentstehung in AP-2 γ -heterozygoten Tieren.....	76
3.4.1 Verpaarungsschema	76
3.4.2 Makroskopie der Teratome.....	77
3.4.3 Histologie der Teratome	78
3.4.4 Proliferationsverhalten AP-2 γ heterozygoter Keimzellen.....	79
4. Diskussion	81
4.1 Die Expression von AP-2 γ	81
4.2 AP-2 γ -konditional defiziente Tiere	83
4.2.1 Der Epiblast-spezifische Phänotyp.....	83
4.2.2 Der Keimzell-spezifische Phänotyp	85
4.3 Der Keimzellverlust in der frühen Embryogenese	86
4.4 Kit, ein Zielgen von AP-2 γ ?	89
4.5 Keimzelltumore in AP-2 γ heterozygoten Tieren	91
4.6 Modell zur Rolle von AP-2 γ in Keimzellentwicklung und Keimzelltumorentstehung.....	93
4.7 Ausblick	95
5. Literaturverzeichnis	97
6. Anhang	107
6.1 Publikationen	107
6.2 Buchbeiträge	107
6.3 Poster-Präsentationen.....	108
6.5 Vorträge.....	108

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung der Keimzellentwicklung in der frühen Embryogenese der Maus	1
Abbildung 2	Migrationsweg der primordialen Keimzellen in der Maus	2
Abbildung 3	Schematische Darstellung der Keimzellentwicklung von Tag 6 der Embryonalentwicklung bis zur Geburt	4
Abbildung 4	Schematische Darstellung eines Ovars	6
Abbildung 5	Schematische Darstellung eines Hodens	8
Abbildung 6	Schematische Darstellung der dimeren AP-2-Proteinstruktur am Beispiel von AP-2 α	11
Abbildung 7	Immunhistochemische Färbung von AP-2 γ in fetalem Hoden und Seminom	16
Abbildung 8	Phylogenetische Analyse der AP-2-Transkriptionsfaktorfamilie	18
Abbildung 9	Schematische Darstellung der homologen Rekombination	20
Abbildung 10	LoxP-Sequenz	22
Abbildung 11	Schematische Darstellung der Cre-Exzisionsreaktion im AP-2 γ -Lokus	23
Abbildung 12	Zeitliches Expressionsmuster von AP-2 γ während der murinen Embryonalentwicklung	52
Abbildung 13	Räumliches Expressionsmuster von AP-2 γ im adulten Tier	52
Abbildung 14	Räumliches Expressionsmuster von AP-2 γ während der Embryonalentwicklung	54
Abbildung 15	AP-2 γ -Expression auf Proteinebene	55
Abbildung 16	Verpaarungsschema zur Erlangung AP-2 γ -konditional-defizienter Tiere	56
Abbildung 17	Schematische Darstellung der AP-2 γ -Genotypisierung	57
Abbildung 18	Ergebnisse der Genotypisierungs-PCRs	58
Abbildung 19	Makroskopisches Bild der Gonaden von AP-2 γ Δ /-:M Tieren	59
Abbildung 20	Phänotyp der AP-2 γ Δ /-:M Hoden	60
Abbildung 21	Phänotyp der AP-2 γ Δ /-:M Ovarien	61
Abbildung 22	Mosaikphänotyp eines AP-2 γ Δ /-:M Hodens	62
Abbildung 23	Lasermikrodissektion der gesunden Samenkanälchen	63
Abbildung 24	Vergleich der Serumwerte der AP-2 γ ^{+flox} und AP-2 γ Δ /-:M Tiere	64
Abbildung 25	Phänotyp der AP-2 γ Δ /-:T Hoden	66
Abbildung 26	Phänotyp der AP-2 γ Δ /-:T Ovarien	68
Abbildung 27	Phänotyp der AP-2 γ Δ /-:T Tiere am Tag der Geburt	69

Abbildung 28	Der Phänotyp während der frühen Embryogenese	71
Abbildung 29	Der Phänotyp nach Erreichen der Genitalanlagen	72
Abbildung 30	Nachweis des Keimzellverlustes mit anderen Markern	73
Abbildung 31	Schematischer Aufbau des Kit-Luziferase-Konstruktes (pmkitLuc)	75
Abbildung 32	HepG2-Transfektionsexperimente	75
Abbildung 33	Verpaarungsschema für AP-2 γ heterozygote Tiere	76
Abbildung 34	Makroskopie der Teratome im adulten Tier	77
Abbildung 35	Histologie der adulten Teratome	78
Abbildung 36	Teratomentstehung	78
Abbildung 37	Proliferationsverhalten der Keimzellen in Kultur	80
Abbildung 38	Modell zur Rolle von AP-2 γ in Keimzellentwicklung und Keimzelltumorentstehung	93

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Übersicht der murinen AP-2-Proteine	12
Tabelle 2	Übersicht über die Zugangsnummern zu den Sequenzdaten der verschiedenen AP-2-Gene in den verschiedenen Spezies	18
Tabelle 3	Übersicht über Pipettierschemata und Programme der Genotypisierungs-PCRs	35
Tabelle 4	Übersicht über Pipettierschemata und Programme der RT-PCRs	41/42
Tabelle 5	Liste der verwendeten Antikörper und ihrer Färbebedingungen	46

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Amp.	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
cDNA	copyDNA
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
dpc	Tage post coitum
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E	Tag der Embryonalentwicklung
EDTA	Etylendiamintetraacetat
ES	Embryonale Stamm(zelle)
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde(n)
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
Lif	Leukaemia Inhibiting Factor
M	Molar
min	Minute(n)
ml	Mililiter
mM	milimolar

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
nm	nanomolar
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen/Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
sog.	so genannte(n)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
U	Enzymeinheiten
UV	ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

1.1 Keimzellen

1.1.1 Die Entwicklung der murinen Keimzellen

Murine primordiale Keimzellen sind die Vorläufer der Gameten und entstehen im extraembryonalen Gewebe. Am Tag 7,25 der Embryonalentwicklung (E7,25) sind sie als Ansammlung von ca. 45 Zellen aufgrund ihrer hohen Aktivität an alkalischer Phosphatase detektierbar und sind posterior zum Primitivstreifen lokalisiert (Chiquoine 1954; Ginsburg et al. 1990) (Abb. 1). Am Tag 8,0 der Embryonalentwicklung befinden sich die Zellen an der Basis der Allantois (=Urharnsack), wo sie in den Embryo eintreten, aktiv entlang des darunter liegenden Enddarms wandern (E8,5-E10,5) und schließlich bis zum Tag E10,5/E11,5 die Genitalanlagen erreichen (Lawson und Hage 1994; Anderson et al. 2000).

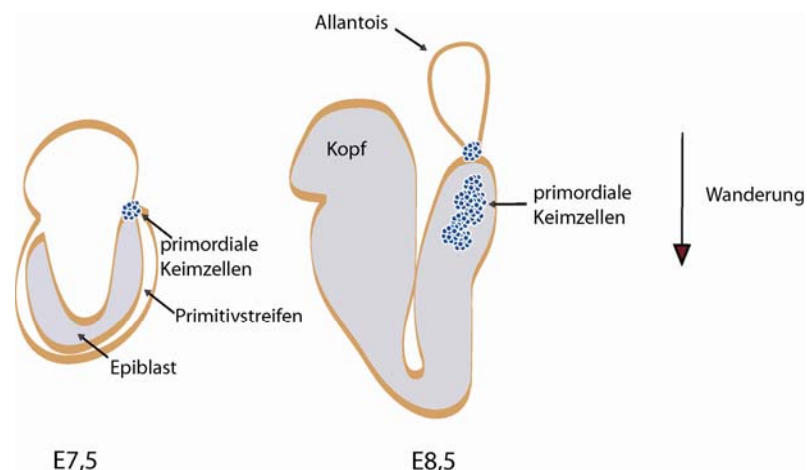


Abbildung 1: **Schematische Darstellung der Keimzellentwicklung in der frühen Embryogenese der Maus**

Die Keimzellen sind am Tag 7,5 posterior zum Primitivstreifen detektierbar, befinden sich am Tag 8,0 an der Basis der Allantois und treten von dort aus in den Embryo ein.

Während der Migration (Abb. 2) proliferieren die Zellen, werden mit Erreichen der Genitalanlagen als Gonozyten bezeichnet und erreichen eine Populationsgröße von ungefähr 26000 am Tag 13,5 der Embryonalentwicklung (Tam und Snow 1981; Ginsburg et al. 1990).

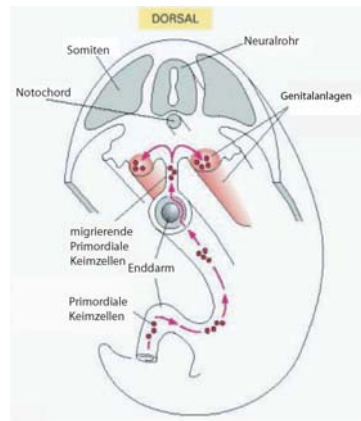


Abbildung 2: **Migrationsweg der primordiales Keimzellen in der Maus**

Die primordiales Keimzellen wandern entlang des Enddarms zu den Genitalanlagen, aus denen später Hoden und Ovarien entstehen.

(verändert nach: Alberts, Molekularbiologie der Zelle)

Bis zum Tag 12,5 der Embryonalentwicklung gibt es bei der Keimzellentwicklung keine sexuellen Unterschiede. Die sexuelle Differenzierung ist abhängig vom Geschlecht der umliegenden somatischen Zellen im Gonadengewebe, nicht vom Geschlecht der Keimzellen (McLaren 2003). Zu diesem Zeitpunkt wird der prämeiotische Arrest eingeleitet. In den männlichen Genitalanlagen findet außer dem prämeiotischen Arrest nun ein mitotischer Arrest statt, die Zellen verbleiben im G0/G1-Arrest als so genannte Präspmatogonien und bis zur Geburt finden keine weiteren Mitosen statt. Im Gegensatz dazu wird in den weiblichen Genitalfalten die Prophase der Meiose eingeleitet und die nun als Oozyten bezeichneten Keimzellen durchlaufen die verschiedenen Stadien der Meiose; Leptotän, Zygotän und Pachytän bevor es zu einem Arrest im Diplotän-Stadium um den Zeitpunkt der Geburt kommt (McLaren 1984).

Die Keimzellentwicklung unterliegt einer strengen genetischen Kontrolle. So spielt die extraembryonale Expression von *Bmp4*¹ und *Bmp8b* bereits in der ganz frühen Entwicklung eine wichtige Rolle, nämlich bei der Spezifizierung der Keimzellen um den Tag E6 (Ying et al. 2000; Ying et al. 2001) (Abb. 3). *Bmp4* bindet hierbei *Alk2* im visceralen Endoderm, wodurch eine Signalkaskade ausgelöst wird, die in *Smad1*-Phosphorylierung und transkriptioneller Regulation der Zielgene von *Bmp4* resultiert (de Sousa Lopes et al. 2004).

¹ In Anlehnung an die genetische Nomenklatur (<http://www.informatics.jax.org>) werden Gene kursiv geschrieben. Handelt es sich um Proteine, erfolgt keine kursive Schreibweise.

Durch diese Signalkaskade und die Repression von *Homeobox (Hox)* Genen werden im Epiblasten die Keimzellen spezifiziert (Saitou et al. 2002).

Zu diesem frühen Zeitpunkt werden im Epiblasten außerdem die Gene *Fragilis* und *Stella* exprimiert (Saitou et al. 2002). *Stella*, dessen Protein vor allem für chromosomale Organisation und RNA-Prozessierung zuständig ist, ist in genau dem Bereich, der von den Keimzellvorläufern besetzt wird, aktiv (Abb. 3). Obwohl *Stella* zu diesem Zeitpunkt in den primordialen Keimzellen exprimiert wird, führt ein Verlust von *Stella* nicht zu einem Verlust der Keimzellen, was durch *Stella*-defiziente Mäuse gezeigt werden konnte. Die Tiere entwickeln sich normal und sind fertil. Allerdings ist *Stella* als maternaler Faktor wichtig für die weitere Fortpflanzung, da Embryonen, die aus *Stella*-negativen Oozyten hervorgehen, im Blastozysten-Stadium absterben (Bortvin et al. 2004). Zwei weitere Gene, die in dieser frühen Phase in den primordialen Keimzellen exprimiert werden sind *Blimp1* und *Dnd1* (Ohinata et al. 2005; Yabuta et al. 2006). *Blimp1*-defiziente Mäuse zeigen einen frühen Keimzellverlust am Tag 8,5 der Embryonalentwicklung. Es wird vermutet, dass *Blimp1*-defiziente Keimzellen zu somatischen Zellen differenzieren (Ohinata et al. 2005). Auf *Dnd1* soll in Kapitel 1.1.5.1 näher eingegangen werden.

Während ihrer Migration entlang des Enddarms zu den Genitalanlagen ab dem Tag 8,5 der Embryonalentwicklung exprimieren die primordialen Keimzellen unter anderem die Gene *Nanos3* und *Kit* (Abb. 3). Studien an Nullmutanten haben gezeigt, dass der Verlust von *Nanos3* zu einem kompletten Verlust der Keimzellen in beiden Geschlechtern am Tag 12,5 der Embryonalentwicklung führt (Tsuda et al. 2003). Die anderen Mitglieder der *Nanos*-Familie betreffen die Keimzellen nur teilweise, *Nanos1* hat keinen Einfluss, aber der Verlust von *Nanos2* führt zu einem Verlust der Spermatogonien in der männlichen Keimbahn (Tsuda et al. 2003). Die Expression der *Nanos* Gene in den primordialen Keimzellen ist in der Evolution stark konserviert, man findet Vertreter dieser Genfamilie sowohl in *C.elegans* als auch in *D.melanogaster* und im Menschen (Subramaniam und Seydoux 1999; Jaruzelska et al. 2003). Während der Keimzellmigration wird außerdem die Rezeptortyrosinkinase *Kit* exprimiert (Manova und Bachvarova 1991). Ihr Ligand, der Stammzellefaktor (SCF) wird von den auf dem Migrationsweg liegenden somatischen Zellen bereitgestellt (Keshet et al. 1991; Matsui et al. 1991). Zellkulturexperimente zeigen, dass primordiale Keimzellen auf den Stammzellefaktor angewiesen sind. Entscheidend ist hier, neben der löslichen, die membrangebundene Form, die in der Kultur von speziellen Nährzellen exprimiert wird (Matsui et al. 1991). *Kit*-defiziente Mäuse zeigen einen Keimzellverlust in beiden Geschlechtern (Besmer et al. 1993) bereits ab Tag 9,0 der Embryonalentwicklung (Buehr et al. 1993). Man geht deshalb davon aus, dass *Kit* für die Keimzellmigration entscheidend ist und die Interaktion zwischen *Kit* und SCF einen Adhäsionsmechanismus zwischen Keim-

und somatischen Zellen darstellt, der für das Überleben und Migrieren der Keimzellen entscheidend ist (Runyan et al. 2006); Abb. 3).

Nach der Ankunft in den Genitalfalten sind die primordialen Keimzellen gezwungen, ihre Motilitätsmaschinerie aufzugeben. Zelladhäsionsmoleküle wie Integrine und Mitglieder der ADAM-Familie werden nun exprimiert (Tres et al. 2004). Auch hier spielt weiter die Interaktion zwischen Kit von den Gonozyten und SCF von den umliegenden somatischen Zellen eine Rolle. Ein weiteres Beispiel für eine Rezeptor-Liganden-Verbindung zwischen Keimzellen und somatischen Zellen ist die Expression von ErbB2 und ErbB3-Tyrosinkinase (Keimzellen) und deren Ligand Neuregulin-b (somatische Zellen) (Toyoda-Ohno et al. 1999). Außerdem exprimieren die Keimzellen *Fgf4* (Fibroblasten-Wachstumsfaktor 4) unter der Kontrolle der Transkriptionsfaktoren Oct4 und Sox2. Auch keimzell-spezifisch-*Oct4*-defiziente Tiere zeigen einen kompletten Verlust der Keimzellen bereits um den Tag 10,5 der Embryonalentwicklung, also in der spätmigratorischen Phase (Kehler et al. 2004).

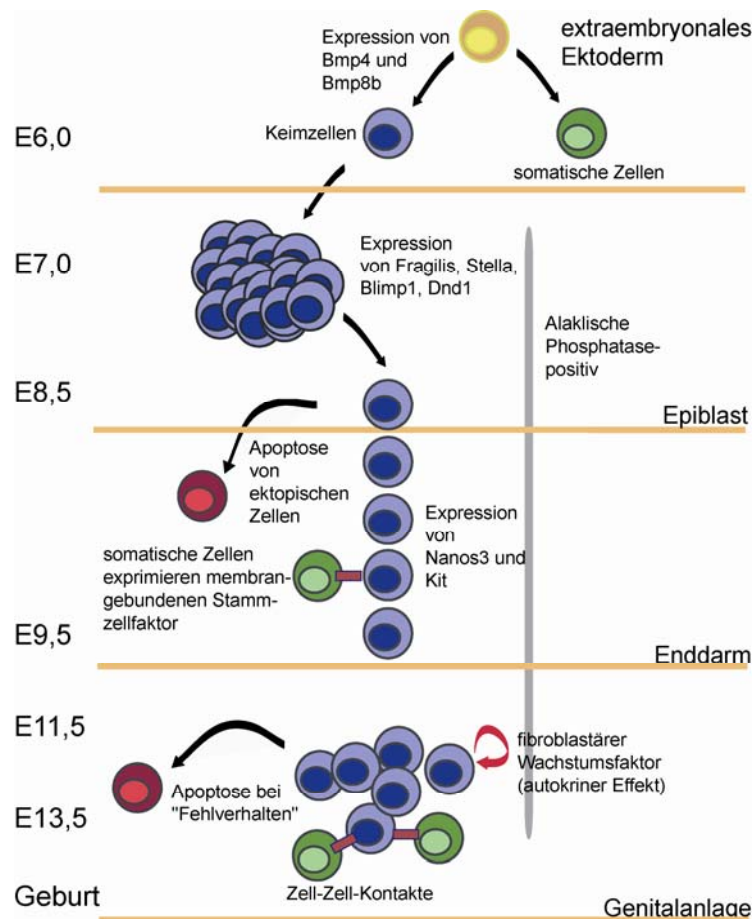


Abbildung 3: **Schematische Darstellung der Keimzellentwicklung von Tag 6 der Embryonalentwicklung bis zur Geburt**

Gelb: Stammzellen

Blau: Keimzellen

Grün: somatische Zellen

Rot: Ektopische Keimzellen

Als extragonadale Keimzellen bezeichnet man diejenigen Zellen, die nicht in den Genitalanlagen ankommen und entweder auf dem Migrationsweg verbleiben oder in andere Organe fehlmigrieren. Extragonadale primordiale Keimzellen sterben durch Apoptose. Für den programmierten Zelltod ist das pro-apoptotische Gen *Bax* verantwortlich (Stallock et al. 2003). Dieses wird sowohl während der Keimzellmigration als auch während der postmigratorischen Phase exprimiert. Bei Mäusen, denen *Bax* fehlt, sterben die extragonadalen Keimzellen nicht ab, sondern sie verbleiben in verschiedenen Geweben, wie z.B. dem Darmmesenterium oder dem Rückenmark.

Sterben die ektopischen Keimzellen nicht, können aus solchen Zellen Tumore entstehen. Ca. 3% aller malignen pädiatrischen Tumore sind Keimzelltumore, 50% davon und 18% aller Keimzelltumore von Erwachsenen entstehen außerhalb der Gonaden, meist entlang der Körpermittellinie, was mit dem Migrationsweg der Keimzellen in Verbindung gebracht wird (Gobel et al. 2000). Man nimmt an, dass diese Tumore aus Keimzellen hervorgehen, die dem programmierten Zelltod entkommen sind (Schneider et al. 2001).

Apoptose in Keimzellen bezieht sich allerdings nicht nur auf ektopische Keimzellen, sie kommt auch in den Genitalanlagen während der Keimzellentwicklung vor. Ein großer Teil der männlichen Keimzellen stirbt zwischen dem Tag 13,5 und 17,0 der Embryogenese (Cocouvanis et al. 1993), eine weitere Apoptosewelle folgt um den Zeitpunkt der Geburt, was zu einer Reduktion der Keimzellen um bis zu 50% führt (Roosen-Runge und Leik 1968). Auch in den weiblichen Genitalfalten verläuft die Apoptose von Keimzellen in zwei Wellen, zum einen um den Tag 13,5 der Embryonalentwicklung, zum anderen zwischen Tag 15,5 der Embryogenese und der Geburt (Borum 1961; Beaumont und Mandl 1963; Bakken und McClanahan 1978).

1.1.2 Die Entwicklung des Ovars

Sind die Gonozyten nach ihrer Wanderung in der Ovaranlage angekommen, vermehren sie sich stark durch Mitosen und werden nun als Oogonien bezeichnet. Diese können durch Zellbrücken miteinander verbunden sein. Die meisten Oogonien gehen zugrunde, die verbleibenden bilden Tochterzellen, die miteinander durch Zytoplasmabrücken Zellklone bilden. Eine Zelle in solch einem Klon tritt in die Oogenese ein, die übrigen gehen wiederum zugrunde. Durch Wachstum gehen aus den Oogonien die primären Oozyten hervor. Dieser Vorgang wird Oogenese genannt.

Während der Oogenese werden die Eizellen auf die Befruchtung vorbereitet. In der Meiose wird der diploide Chromosomensatz auf einen haploiden reduziert. Eingeleitet wird die Meiose bereits in der Embryonalzeit, die Keimzellen werden jedoch in der Diktyotän-Phase,

einer Sonderform des Zygotän, arretiert und verbleiben bis zur Bildung des Tertiärfollikels im Stadium der homologen Rekombination.

Parallel zur Keimzellentwicklung verläuft die Entwicklung des Epithels, welches später die Eizelle umgibt. Die primären Keimstränge, die einen großen Teil der Gonozyten einschließen, werden abgebaut bis sie vollständig verschwunden sind. An ihren Platz treten die sekundären Keimstränge (Rindenstränge). Wieder werden Gonozyten vom auswachsenden Coelomepithel umschlossen und teilen sich zu Oogonien. Nun erfolgen Veränderungen an Keimsträngen und Oogonien, die parallel verlaufen. Die Keimstränge gliedern sich auf, und die Oogonien wachsen zu primären Oozyten. Das Ergebnis sind Primordialfollikel, die aus einer im Diktyotän arretierten primären Oozyte und einem sie umgebenden plattenförmigen Follikelepithel bestehen.

Follikel werden in Primordialfollikel, Primärfollikel, Sekundärfollikel und Tertiärfollikel unterteilt, wobei sich Tertiärfollikel noch in präovulative Follikel, reife Follikel und Graaf'sche Follikel umwandeln können. In einem geschlechtsreifen Ovar finden sich alle Follikeltypen (Abb. 4). Das Endstadium des reifen Follikels wird nur von wenigen Primordialfollikeln erreicht, deshalb findet man im Ovar meist sehr viele Primär- und Sekundärfollikel, aber nur wenige Tertiärfollikel. In allen Stadien der Follikelentwicklung kann es zur Follikelrückbildung kommen, so dass schließlich im Laufe der Zeit alle nicht benötigten Follikel abgebaut werden. Diese Follikel werden auch als atretische Follikel bezeichnet (Schieble, Peiper, Schneider: Histologie).

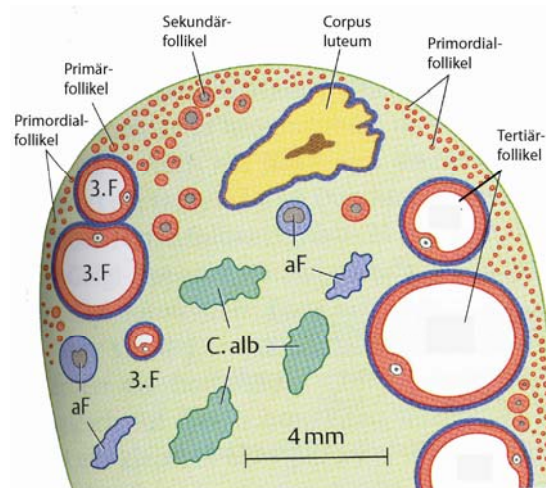


Abbildung 4: **Schematische Darstellung eines Ovars**

3.F: Tertiärfollikel

aF: atretischer Follikel

C.alb: Corpus albicans

Rot: Follikelepithel

Blau: Theca interna und Nachfolger

Hellgrün: Rindenstroma

(verändert nach: R. Lüllmann-Rauch, Histologie)

1.1.3 Die Entwicklung des Hodens

Der Hoden ist von der Tunica albuginea, einer Kapsel aus kollagenem Bindegewebe umgeben und geht aus der Genitalleiste hervor. Anders als beim Ovar bleiben die primären Keimstränge erhalten, aus ihnen entwickeln sich die Hodenstränge, die Anlagen der Hodenkanälchen. Jedes Hodenkanälchen ist beim Menschen etwa 20 cm lang, wird jedoch durch Knäulung auf einer Strecke von ca. 3 cm untergebracht. Umgeben werden die Hodenkanälchen von einer Basallamina und einer Lamina propria, die durch ihren hohen Anteil an Myofibroblasten zur Kontraktion fähig ist. So werden die noch bewegungsunfähigen Spermatozoen durch das Lumen der Kanälchen in den Nebenhoden transportiert.

Das Keimepithel besteht aus zwei Zelltypen, den Keimzellen und den somatischen Sertoli- oder Stützzellen (Abb. 5). Als Keimzellen bezeichnet man alle im Hoden auftretenden Vor- und Endstufen der Samenzellen. Diese reichen von Spermatogonien, den Abkömmlingen der Gonozyten über Spermatozyten und Spermatiden zu Spermien. Spermatozyten gehen durch mitotische Teilungen aus den Spermatogonien hervor. Dieser Vorgang wird als Spermatozytogenese bezeichnet. In den Spermatozyten findet die Meiose statt, der diploide Chromosomensatz wird auf einen haploiden reduziert und die Zellen werden nun als Spermatiden bezeichnet. Spermatiden liegen bereits in der Nähe des Lumens der Hodenkanälchen, da sich die Zellen mit jedem Differenzierungsschritt von der Basalmembran entfernen. Durch ihren haploiden Chromosomensatz sind sie auf die Befruchtung vorbereitet. Aus den Spermatiden gehen schließlich durch verschiedenste Umbaumaßnahmen in der Zelle über die Zwischenstufe der Spermatozoen die Spermien hervor, man spricht von Spermiogenese. Die gesamte Differenzierung von Spermatogonium zu Spermium bezeichnet man als Spermatogenese.

Zwischen den verschiedenen Stadien der sich entwickelnden Samenzellen sitzen die Sertolizellen. Sie kleiden die Hodenkanälchen palisadenartig aus und dienen der Ernährung und dem Schutz der Keimzellen, außerdem besitzen sie eine Stützfunktion und sind zu Phagozytose und Sekretion fähig. Im reifen Hoden teilen sie sich nicht mehr. Sertolizellen sind mit der Basalmembran der Hodenkanälchen verbunden und reichen apikal in deren Lumen hinein. Durch ihre unregelmäßige Form und die interzellulär liegenden Spermatogenesezellen sind ihre Zellgrenzen im Lichtmikroskop kaum erkennbar, allerdings ist ihr dreieckiger Zellkern eindeutig.

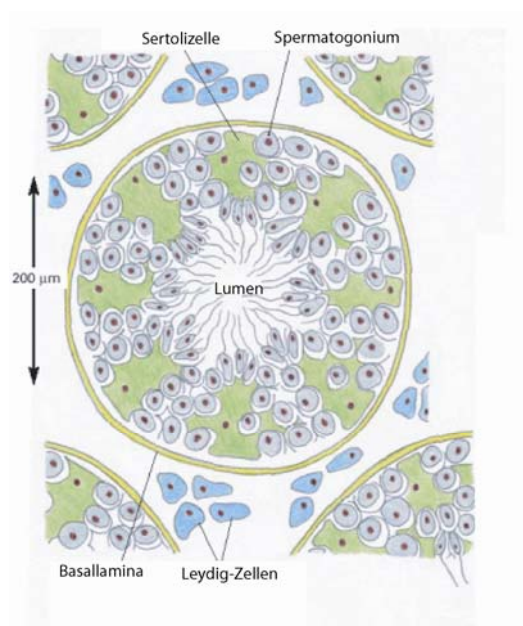


Abbildung 5: **Schematische Darstellung eines Hodens**

Grün: Sertolizellen

Grau: Keimzellen

Blau: Leydigzellen

Gelb: Basallamina

Die Differenzierung der Keimzellen beginnt an der Basallamina des Kanälchens in Richtung des Lumens, in dem man schon fertige Spermatozoen findet.

(aus: Alberts, Molekularbiologie der Zelle)

Die dritte im Hoden vorkommende Zellpopulation sind die Leydigzellen oder interstitiellen Zellen. Sie liegen in enger Beziehung zu Blutgefäßen zwischen den Hodenkanälchen. Dort bilden sie Testosteron und sind somit für die korrekte Hormonsekretion zuständig. Sie nehmen etwa 12% des Hodenvolumens ein und sind in Gruppen angeordnet (Abb. 5).

Lokalisiert sind die Hoden im Skrotum außerhalb der Leibeshöhle, um die für die Spermatogenese erforderliche niedrige Temperatur zu gewährleisten. Im Fall von Kryptorchismus (Hodenhochstand) unterbleibt die Spermatogenese aufgrund der zu hohen Temperatur (Schiebler, Peiper, Schneider: Histologie).

1.1.4 Hypogonadismus

Eine Unterfunktion der Gonaden wird als Hypogonadismus bezeichnet. Dabei kann der Hypogonadismus angeboren oder durch hormonelle Dysfunktion erworben werden, da die Gonadenentwicklung einer strengen hormonellen Kontrolle unterliegt.

Man unterscheidet den primären und den sekundären Hypogonadismus. Beim primären Hypogonadismus sind die Gonaden direkt betroffen, der sekundäre Hypogonadismus geht auf eine Fehlfunktion in einem übergeordneten Steuerungsorgan (Hypophyse oder Hypothalamus) zurück.

1.1.5 Keimzelltumore

Keimzelltumore sind die am meisten vorkommenden Tumore bei Männern im Alter von 17 bis 45 Jahren. Ihre Inzidenz ist ohne erkennbaren Grund in den letzten Jahren stark angestiegen, was eine Erforschung der molekularen Ursachen solcher Malignitäten immer wichtiger macht (Adami et al. 1994). Keimzelltumore beinhalten eine sehr heterogene Gruppe von Neoplasien, die nicht zwangsläufig in den Gonaden entstehen müssen. Sie können auch extragonadal entlang der Körpermittellinie entstehen, was mit dem Wanderweg der primordialen Keimzellen (s. Kap. 1.1) während der Embryogenese in Verbindung gebracht wird. So können Keimzelltumore z.B. auch im Kopf- und Nackenbereich und in der Hypothalamus- und Epiphysenregion gefunden werden. Sehr selten kommen sie auch in anderen Organen, die nicht mit der Körpermittellinie assoziiert sind, vor. Allgemein geht man jedoch davon aus, dass Keimzelltumore aus embryonalen Keimzellen entstehen, die in irgendeiner Form entartet sind.

Keimzelltumore lassen sich nach Looijenga und Oosterhuis in drei Gruppen einteilen: Teratome und Dottersacktumore bei Neugeborenen und Kindern (Typ I), seminomatöse und nicht-seminomatöse Tumore bei Heranwachsenden und jungen Erwachsenen (Typ II) und spermatozytäre Seminome bei älteren Patienten (Typ III) (Oosterhuis und Looijenga 2005). Dottersacktumore können sowohl intra- als auch extragonadal auftreten, wobei beide Geschlechter betroffen sein können. Die Gewebestrukturen im Tumor erinnern an einen Dottersack, es handelt sich um frühe embryonale und extraembryonale Gewebe, die in einer großen Variationsbreite vorliegen können. Dottersacktumore sind bei Erwachsenen extrem selten, zählen allerdings zu den häufigsten Hodentumoren bei Kindern unter 3 Jahren. Auf Teratome soll im nächsten Unterkapitel genauer eingegangen werden.

Keimzelltumore vom Typ II lassen sich weiter in seminomatöse (Seminome (in den Hoden)), Dysgerminome (in den Ovarien) und Germinome (im Gehirn) und nicht-seminomatöse Keimzelltumore unterscheiden (Oosterhuis und Looijenga 2005). Seminome machen mit 50% die häufigste Gruppe der Hodentumore bei Männern aus. Sie treten meist im 4. Lebensjahrzent auf. Sie können bilateral und selten auch extragonadal vorkommen. Die Tumore sind makroskopisch gut abgegrenzt, mikroskopisch findet man uniforme Zellen mit hellem Zytoplasma, großen Kernen mit zentralen Nukleolen und deutlichen Zellgrenzen.

Spermatozytäre Seminome sind eine Sonderform der Seminome, die sich von unvollständig ausgereiften Vorstufen der haploiden Spermatozyten ableiteten. Histologisch bestehen sie aus drei Zelltypen: Mittegroße Zellen mit rundem Zellkern und eosinophilem Zytoplasma, kleinen, lymphozytenartigen Zellen, die an Spermatozyten erinnern und mehrkernigen Tumorriesenzenellen (Riede, Schäfer, Wehner: Allgemeine und spezielle Pathologie).

Über die molekularen Mechanismen der Keimzelltumorentstehung wird viel spekuliert. Es scheint als wären genau die Gene, die auch während der Embryogenese für die Keimzellentwicklung wichtig sind, in die Tumorbildung involviert, denn alle intratubulären Keimzellneoplasien (ITGCNU: "intratubular germ cell neoplasia unclassified"; CIS: "carcinoma *in situ*"), die Vorläufer der Tumore, zeichnen sich durch eine Expression von *Oct4* aus, wie sie auch in den frühen Keimzellen zu finden ist (Looijenga et al. 2003). Ebenso verhält es sich mit der Expression von *Kit* (Strohmeyer et al. 1991) und plazentarer alkalischer Phosphatase (PLAP) (Jeppsson et al. 1984). Bei beiden handelt es sich um Gene, die während der Embryogenese in den Keimzellen exprimiert werden und sich auch später im Tumor wieder finden (Jorgensen et al. 1993).

1.1.5.1 Teratome

Teratome sind Mischtumore, sie können aus allen drei Keimblättern bestehen und je nach Differenzierungsgrad in reife und unreife Teratome unterschieden werden. Reife Teratome bestehen aus voll differenzierten Elementen wie Neuralgewebe, Muskulatur, Knorpelgewebe, Fettgewebe, Plattenepithel und Drüsenstrukturen. Unreife Teratome bestehen im Wesentlichen aus den gleichen Geweben, allerdings sind diese hier weniger ausdifferenziert. Teratome entstehen, wie alle Keimzelltumore, aus fehlgeleiteten Keimzellen; für die Teratomentstehung werden frühe primordiale Keimzellen aufgrund ihres hohen Differenzierungspotentials verantwortlich gemacht (Riede, Schäfer, Wehner: Allgemeine und spezielle Pathologie).

In Mäusen entstehen Teratome spontan in einem Inzuchtmausstamm, den 129/SV-Mäusen. Diese Mäuse entwickeln Teratome mit einer Wahrscheinlichkeit von 1-10% im Alter von etwa 3 Wochen (Stevens und Hummel 1957). Man kennt bis heute nur wenige Mutationen, die mit der Teratomentstehung in Verbindung gebracht werden können. Eine davon ist die TER-Mutation, die in 129/SV-Mäusen zur Teratombildung und in anderen Mausstämmen zum Keimzellverlust führt (Noguchi und Noguchi 1985; Sakurai et al. 1994). Diese Mäuse besitzen eine rezessive Mutation im *Dnd1* (= *dead end1*)-Gen (s. Kap. 1.). *Dnd1* wird in embryonalen Gonaden exprimiert und besitzt ein RNA-Erkennungsmotiv, welches dieses Gen in Zusammenhang mit der RNA-Edierung bringt. Ein weiteres Beispiel für ein Mausteratommodell ist der *Pten*-Knockout. Es konnte gezeigt werden, dass die primordialen Keimzellen dieser *Pten*-defizienten Tiere verstärkt proliferieren und bereits während der späten Embryonalentwicklung bilaterale Teratome entstehen (Kimura et al. 2003).

1.2 Transkriptionsfaktorfamilie AP-2

1.2.1 Allgemeiner Aufbau

Die Isolierung des ersten AP-2 (Aktivator-Protein 2)-Transkriptionsfaktors gelang bereits 1988 aus HeLa-Zellen (Williams et al. 1988). Dieses Protein wird heute als AP-2 α bezeichnet. Mittlerweile umfasst die Familie der AP-2-Transkriptionsfaktoren fünf Mitglieder, AP-2 α , β , γ , δ und ϵ . Für alle Familienmitglieder ist eine Proteinstruktur charakteristisch, die sich in drei funktionelle Domänen gliedern lässt (s. Abb. 6):

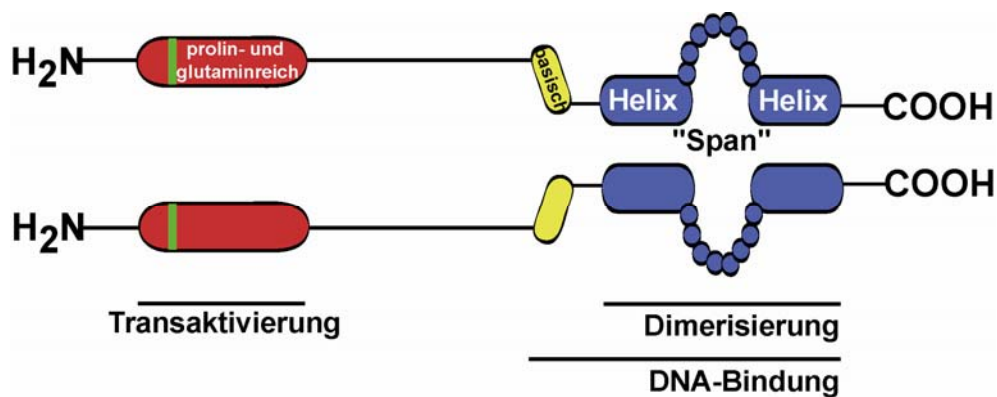


Abbildung 6: **Schematische Darstellung der dimeren AP-2-Proteinstruktur am Beispiel von AP-2 α**

N-Terminal befindet sich die prolinreiche Transaktivierungsdomäne (89 AS, rot) mit dem PY-Motiv (5 AS, grün). C-Terminal sind die basische Domäne (20 AS, gelb) und die Dimerisierungsdomäne in Form eines Helix-Span-Helix-Motivs (131 AS, blau) gezeigt, die zusammen die DNA-Bindung vermitteln (Quelle: SwissProt, ID: P34056).

Im N-terminalen Bereich der Proteine findet man die zwischen den Familienmitgliedern am wenigsten konservierte prolinreiche Transaktivierungsdomäne, die allerdings bei allen AP-2-Proteinen außer AP-2 δ ein stark konserviertes PY-Motiv enthält. C-terminal befindet sich die stark konservierte DNA-Binde-Domäne, die aus einem Helix-Span-Helix-Motiv, verantwortlich für die Dimerisierung und einer basischen Domäne besteht (Williams und Tjian 1991) (Abb. 6). AP-2-Proteine bestehen aus 437 bis 452 Aminosäuren und besitzen ein Molekulargewicht von 46 bis 52 kDa.

Die AP-2-abhängige Aktivierung der Transkription erfolgt durch Bindung an die palindromische Konsensus-Sequenz 5'-GCCN₃GGC-3', welche in vielen zellulären und viralen Promotoren nachgewiesen wurde (Mitchell et al. 1987). In späteren Studien konnte gezeigt werden, dass AP-2-Proteine auch an die Sequenzen 5'-GCCN₄GGC-3' und 5'-GCCN_{3/4}GGC-3' binden können (Mohibullah et al. 1999). Aufgrund dieser Studien und der

Tatsache, dass die AP-2-Bindestelle im SV40-Enhancer mit dem Motiv 5'-CCCCAGGGC-3' von den oben beschriebenen Sequenzen abweicht, postuliert man, dass die einzelnen Dimere mit unterschiedlicher Affinität an verschiedenste GC-reiche Sequenzen binden können.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die in der Maus vorhandenen AP-2-Gene und deren Proteine.

	Molekular- gewicht	Anzahl Aminosäuren	Länge der cDNA	Anzahl Exone	Chromosomale Lokalisation
AP-2α	48 kDa	437	2754 bp	7	13 A5-B1
AP-2β	50 kDa	459	1971 bp	7	1 A2-A4
AP-2γ	49 kDa	449	2804 bp	7	2 H3-H4
AP-2δ	50 kDa	452	1763 bp	8	1 A3
AP-2ϵ	46 kDa	442	1945 bp	7	4 D2.2

Tabelle 1: **Übersicht der murinen AP-2-Proteine**

In den folgenden Unterkapiteln soll auf die einzelnen AP-2-Proteine in der Maus genauer eingegangen werden.

1.2.2 AP-2 α

AP-2 α wurde als erstes Protein der Transkriptionsfaktorfamilie beschrieben und ein Jahr später aus HeLa-Zellen isoliert (Mitchell et al. 1987). Exprimiert wird AP-2 α vor allem während der Embryonalentwicklung in den Zellen der Neuralleiste und deren Derivaten. Bereits am Tag 8,5 der Embryogenese findet man AP-2 α in der Neuralfalte und im lateralen Kopfmesenchym. Vorher konnte die Expression nur im extraembryonalen Gewebe, nicht aber im Embryo gezeigt werden. Am Tag 9,5 findet man AP-2 α im Oberflächenektoderm, in den Kiemenbögen und in den Vorläufern der Kranielganglien. Schwach zeigt sich die Expression auch in Mesonephros, Pericard, diffus im Bereich der dorsalen Aorta und im Gliedmaßenknospenmesenchym. Einen Tag später, am Tag 10,5 der Embryonalentwicklung zeigt sich ein klares Signal in den dorsalen Wurzelganglien, welche aus Neuralleistenzellen entstehen, und im Rückenmark. AP-2 α zeigt in 11,5 Tage alten Embryonen die gleichen Expressionsorte wie am Tag zuvor, allerdings kommen noch der laterale Bereich des zentralen Nervensystems und andere Neuralleistenderivate, wie die sympathischen Ganglien hinzu. Am Tag 12,5 konzentriert sich die AP-2 α -Expression auf Oberflächenektoderm,

Gesichtsmesenchym, Zunge, Zahnanlagen, kraniale Ganglien und dorsale Wurzelganglien. Im adulten Tier wird *AP-2 α* stark in Haut und Auge und schwach in Thymus, Niere und Prostata exprimiert (Mitchell et al. 1991).

Studien mit *AP-2 α* -Nullmutanten haben gezeigt, dass *AP-2 α* vor allem für den kranialen Neuralrohrschluss verantwortlich ist. *AP-2 α* -defiziente Tiere sterben perinatal, sie zeigen eine schwere Cranioabdominoschisis, wodurch sich das Gehirn nach außen wölbt, die Mittellinie sich nicht schließt und Teile des Gesichts überwachsen werden. Bereits am Tag 16,5 der Embryonalentwicklung sind Knochen und Knorpel stark deformiert. Durch den fehlenden Schluss der Mittellinie entwickeln sich die Organe außerhalb des Embryos (Schorle et al. 1996; Zhang et al. 1996).

1.2.3 AP-2 β

Das zweite Mitglied der Transkriptionsfaktorfamilie wurde 1995 als *AP-2 β* beschrieben (Moser et al. 1995). Das Protein besteht aus 448 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 49 kDa. *AP-2 β* wird im Mausembryo von Tag 11,5 bis 17,5 in verschiedensten Geweben exprimiert. Zwischen Tag 13,5 und Tag 15,5 der Embryonalentwicklung ist die *AP-2 β* -Expression vor allem im Mittelhirn, aber auch im Rückenmark, im olfaktorischen Epithel, im ersten Kiemenbogen, in der Niere, der Haut und schwächer in Cerebellum, Rhombencephalon, dorsalem Wurzelganglion, in der Zunge und im Auge vorhanden. Keine Expression zeigen dagegen Leber, Vorderhirn, Milz und Herz (Moser et al. 1995). Starke *AP-2 β* -Expression findet man im adulten Tier in der Niere, schwächere in Haut und Auge. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass *AP-2 β* -defiziente Tiere einen schweren Nierendefekt aufweisen. Die Tiere sterben innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt, da sie ihren Wasser- und Elektrolythaushalt nicht aufrechterhalten können. Der Nierendefekt beginnt bereits am Tag 16,5 der Embryonalentwicklung durch ein vermehrtes Auftreten von Zysten im Bereich der Sammelrohre. Genauere Untersuchungen zeigten vermehrte Apoptose im Nierenepithel der Mutanten. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die embryonale Nierenentwicklung auf genetischer Ebene komplett abgeschlossen wird, durch die Herunterregulierung anti-apoptotischer Gene (z.B. *bcl-X_L*) gegen Ende der Entwicklung allerdings eine Apoptosewelle im Nierenepithel ausgelöst wird (Moser et al. 1997).

Interessanterweise konnte in anderen Organen und Geweben keine funktionelle Störung gefunden werden, was darauf schließen lässt, dass die fehlende *AP-2 β* -Expression durch die anderen Familienmitglieder ausgeglichen wird (Moser et al. 1995).

1.2.4 AP-2 γ

Als drittes Mitglied der AP-2-Familie konnte AP-2 γ 1996 beschrieben werden (Chazaud et al. 1996). Das murine AP-2 γ -Gen liegt auf Chromosom 2, die cDNA hat eine Länge von 2,8 kb und codiert für ein Protein mit 449 Aminosäuren. Exprimiert wird AP-2 γ sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im adulten Tier, wie durch *In-Situ*-Hybridisierungen gezeigt werden konnte. Bereits am Tag 3,5 der Embryonalentwicklung wird AP-2 γ im Trophoblasten exprimiert. Laut Literatur ist AP-2 γ am Tag 7,0 der Embryonalentwicklung im extraembryonalen Gewebe im frühen Primitivstreifen detektierbar. Starke Signale finden sich entlang des ekto-plazentaren Kegels, im Chorion, in den inneren Zellen der Decidua und sehr stark in den trophoblastären Riesenzellen. In diesen Geweben ist auch am Tag 8,5 noch eine starke Expression zu erkennen. Im Embryo findet man AP-2 γ am Tag 7,5 in der Grenzregion zwischen Neuralplatte und Ektoderm, am Tag 8,0 in den dorsalen Ecken der Neuralfurche und im angrenzenden Mesenchym, in dem sich die frühen migrierenden Neuralleistenstammzellen befinden. Am Tag 8,5 konnte AP-2 γ im Neuralrohr und zusätzlich im frontonasalen Mesenchym, welches die Neuralleistenzellen des Vorderhirns enthält, nachgewiesen werden. AP-2 γ -Expression findet sich außerdem zwischen Tag 9,5 und Tag 11,5 im sich entwickelnden Gesicht und in den Extremitätenknospen und von Tag 9,5 bis Tag 12,5 im Gehirn. Im Urogenitalsystem ist AP-2 γ im urethralen und rektalen Epithel detektierbar. In den Keimzellen konnte die Expression von AP-2 γ auf RNA-Ebene erst um den Tag 11,5 nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt besiedeln die primordialen Keimzellen die Genitalfalten und proliferieren dort. In den Keimzellen handelt es sich vermutlich um eine transiente Expression, da bereits am Tag 14,5 keine RNA im embryonalen Ovar mehr nachgewiesen werden konnte (Chazaud et al. 1996)

Um die Funktion von AP-2 γ in der Maus genauer zu untersuchen, wurde eine AP-2 γ -defiziente Maus generiert (Werling und Schorle 2002). AP-2 γ -defiziente Mäuse zeigen ein retardiertes Größenwachstum bereits am Tag 7,5 und werden schließlich am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung aufgrund eines Plazenta-Defektes resorbiert. Der Verlust von AP-2 γ führt zu einer verminderten Proliferation der Zellen im extraembryonalen Ektoderm und im ekto-plazentaren Konus, wodurch die Anzahl an Riesenzellen vermindert ist. Die Folge davon ist ein unterentwickeltes Labyrinth, welches den Embryo nicht mit genügend Nährstoffen versorgen kann (Auman et al. 2002; Werling und Schorle 2002). Zellkulturexperimente haben gezeigt, dass die Expression der Adenosindeaminase (ADA), einem Zielgen von AP-2 γ (Shi und Kellems 1998), in AP-2 γ -defizienten Blastozysten verringert ist. Deshalb kann das Zellgift Desoxyadenosin nicht zu Desoxyinosin abgebaut werden, was zum Tod der Zellen führt (Werling und Schorle 2002). Um weitere Funktionen von AP-2 γ *in vivo* untersuchen zu

können, musste eine Möglichkeit gefunden werden, den embryonal letalen Phänotyp von *AP-2 γ* zu umgehen. Hierzu wurde eine konditionale *AP-2 γ* Mauslinie unter Verwendung des Cre/loxP-Systems generiert, in der ein Plazenta-unabhängiger Phänotyp durch Verpaarung mit gewebs- und zelltyp-spezifischen Cre-Mäusen erzeugt werden kann (Werling und Schorle 2002).

1.2.4.1 *AP-2 γ* in humanen Keimzellen und Keimzelltumoren

In humanen Keimzellen wird *AP-2 γ* während der Schwangerschaft von der 12. bis zur 37. Woche exprimiert. Die Expression findet hier in den Gonozyten, statt. Die *AP-2 γ* -Expression nimmt zwischen der 12. (Abb. 7 A) und der 17. Woche etwas ab, bevor sie in der 18. Woche stark ansteigt und in der 19. Woche den während der Schwangerschaft höchsten *AP-2 γ* -Level erreicht. Zu diesem Zeitpunkt beginnen die Gonozyten zu Prä spermatogonien zu differenzieren. Nach der 19. Woche fällt die *AP-2 γ* -Expression wieder ab und *AP-2 γ* kann bis zur 37. Woche mit Zunahme der Keimzellendifferenzierung nur noch schwach nachgewiesen werden. (Pauls et al. 2005). Die *AP-2 γ* -Expression in der humanen Keimzelle geht mit der Expression von *Kit* einher. Betrachtet man die *Kit*-Expression während der Schwangerschaft, fällt auf, dass auch *Kit* in der 19. Woche den höchsten Level erreicht und die Expression anschließend abnimmt. *Kit* wurde bereits 1993 durch Promotorstudien (Yamamoto et al. 1993; Yasuda et al. 1993) als potentiell Zielgen von AP-2 beschrieben und es konnte gezeigt werden, dass *AP-2 α* *Kit* in Melanomzellen transaktivieren kann (Huang et al. 1998). In adulten Gonaden wird *AP-2 γ* nicht exprimiert.

AP-2 γ -Expression findet sich in intratubulären Keimzellneoplasien, in testikulären und metastasierenden Seminomen (Abb. 7 B), in extragonadalen Seminomen und in Dysgerminomen. Keine Expression findet sich in spermatozytären Seminomen, Teratomen und Dottersacktumoren. Aufgrund dieser sehr spezifischen *AP-2 γ* -Expression stellt *AP-2 γ* einen neuen Marker für seminomatöse Keimzelltumoren dar, der in der Diagnostik breite Anwendung findet (Hoei-Hansen et al. 2004; Pauls et al. 2005).

Bei einem Patienten mit einer intratubulären Keimzellneoplasie konnte *AP-2 γ* sogar in einigen Zellen der Samenflüssigkeit nachgewiesen werden (Hoei-Hansen et al. 2005). Diese Studie ist ein weiterer Hinweis auf die diagnostische Anwendbarkeit von *AP-2 γ* zur Früherkennung von veränderten Keimzellen, bzw. Keimzelltumoren.

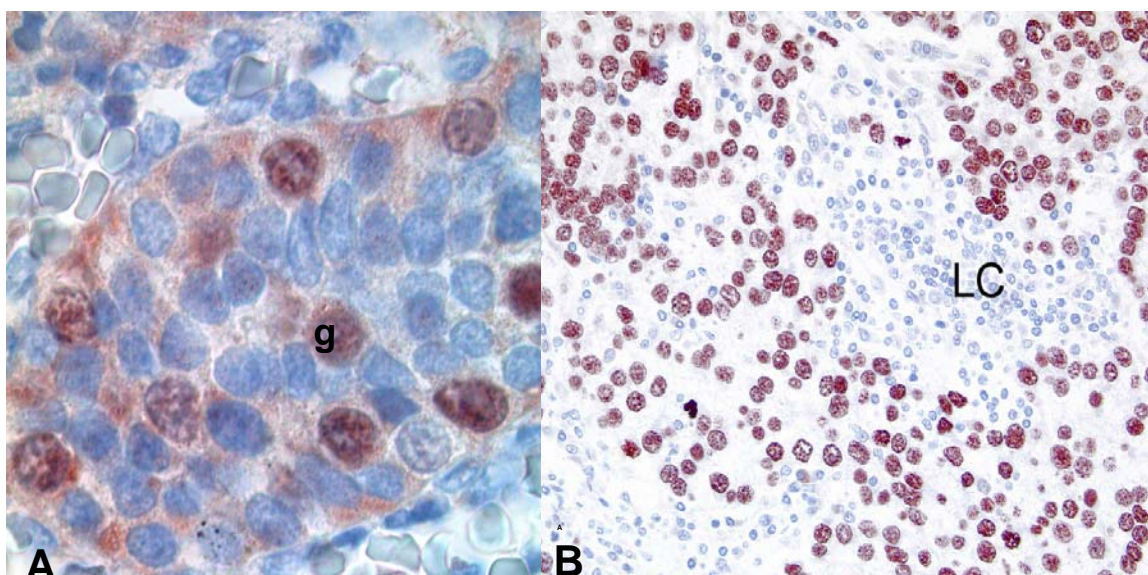


Abbildung 7: **Immunhistochemische Färbung von AP-2 γ in fetalem Hoden und Seminom**
 (A) AP-2 γ -Expression in humanen Gonozyten (g) in der 12. Schwangerschaftswoche; (B) AP-2 γ -Expression in einem testikulären Seminom,
 g: Gonozyt; LC= Lymphozyten

1.2.5 AP-2 δ

AP-2 δ wurde als viertes Mitglied der AP-2-Familie erstmals 2001 beschrieben (Zhao et al. 2001). Dabei wurde das Maus-Ortholog aus einer cDNA-Bank aus Mausköpfen isoliert. Es stellte sich heraus, dass das AP-2 δ -Protein 452 Aminosäuren umfasst, ein Molekulargewicht von 50 kDA besitzt und eine hohe Homologie zu den anderen AP-2-Proteinen im Bereich der DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne zeigt. In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass AP-2 δ in der Lage ist, Genexpression zu transaktivieren. Exprimiert wird AP-2 δ in der Embryonalentwicklung bis zur Geburt im Gehirn. In seiner Bindungsaffinität unterscheidet sich AP-2 δ jedoch von den anderen AP-2-Proteinen. Es bindet kaum an die im humanen Metallothionein IIa-Promotor vorhandene AP-2-Bindestelle, dahingegen sehr spezifisch an eine optimierte Konsensus-Sequenz. Auch in der Transaktivierungsdomäne am N-Terminus unterscheidet sich AP-2 δ , unter anderem durch Fehlen des PY-Motivs, von den anderen AP-2-Proteinen. Aminosäuren, welche ursprünglich als essentiell für die Transaktivierung eingestuft wurden, sind hier verändert oder fehlen ganz. Nicht zuletzt deshalb geht man davon aus, dass sich AP-2 δ in Bezug auf Transaktivierung und Interaktion mit anderen Proteinen von den übrigen Familienmitgliedern unterscheidet (Zhao et al. 2001) und so die Bandbreite der von der AP-2-Familie regulierten Gene erhöht wird.

1.2.6 AP-2 ϵ

AP-2 ϵ als fünftes Mitglied der AP-2-Familie wurde 2003 erstmals beschrieben (Feng und Williams 2003). Hier gelang die Identifizierung des Maus-Proteins bevor im gleichen Jahr auch das humane AP-2 ϵ beschrieben wurde (Tummala et al. 2003). Im Gegensatz zu AP-2 δ zeigt AP-2 ϵ eine starke Bindung an die Standard-AP-2-Konsensus-Sequenz im humanen Metallothionein IIA-Promotor. Auch die Dimerisierungs- bzw. DNA-Bindungsdomänen sind hochgradig homolog zu den anderen AP-2-Proteinen. AP-2 ϵ wird in der murinen Embryonalentwicklung zuerst um Tag 10,5 in Teilen des Gehirns und dem zentralen Nervensystem exprimiert. Mit fortschreitender Entwicklung verlagert sich die Expression in die mitrale und granuläre Zellschicht des Riechkolbens. Im adulten Tier ist AP-2 ϵ in der Haut zu finden, die Funktion hier ist allerdings unklar (Feng und Williams 2003).

1.2.7 AP-2 in anderen Spezies

Neben AP-2-Proteinen in Mensch und Maus wurden Mitglieder dieser Transkriptionsfaktor-Familie („Ensembl Familie“: ENSF 00000001105, <http://www.ensembl.org>) auch in anderen Spezies gefunden. Eine phylogenetische Analyse zeigt, dass die Proteine auf Basis der Aminosäuresequenz eine Homologie von 60-99% bezogen auf die Orthologe, und von 56-78% bezogen auf die Paraloge, besitzen. Die Wirbeltier-Proteine sind in einer Gruppe angeordnet, die aus fünf Teilen besteht, wobei das Xenopus-AP-2 die größte Verwandtschaft mit den Wirbeltierproteinen AP-2 α zeigt (Abb. 8); (Eckert et al. 2005).

In Wirbeltieren finden sich Vertreter der AP-2-Familie in *R. norvegicus*, *G. gallus* (Shen et al., 1997), *D. rerio* (Knight et al., 2003), *X. laevis* (Snape et al., 1991), *X. tropicalis* und *P. troglodytes* (<http://www.ensembl.org>).

Im Genom des Protochordaten *Ciona intestinalis* wurde eine putative AP-2-Sequenz gefunden, die große Ähnlichkeit zum AP-2 α -Protein zeigt, weswegen man davon ausgehen kann, dass es sich bei AP-2 α um das „Ur-AP-2“ handelt. Dafür spricht auch die stark konservierte epitheliale Expression von AP-2 α zwischen den Spezies.

Die AP-2-Proteine der Wirbellosen *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* zeigen die schwächste Verwandtschaft mit den Wirbeltier- und Protochordaten AP-2-Proteinen.

In *D. melanogaster* findet man ein Protein mit einer Homologie von 42-45% zu Wirbeltier-AP-2-Proteinen. Die 107 Aminosäuren lange DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne besitzt eine Homologie von 90-92% zum Wirbeltier-AP-2. Exprimiert wird Drosophila-AP-2 sowohl während der Embryogenese in Gehirn, Auge und in Zellen des ventralen Nervenstranges, als auch im adulten Tier (Bauer et al. 1998).

In Hefe konnte kein AP-2-Gen nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass sich die AP-2-Proteine erst später in der Evolution entwickelt haben (Eckert et al. 2005).

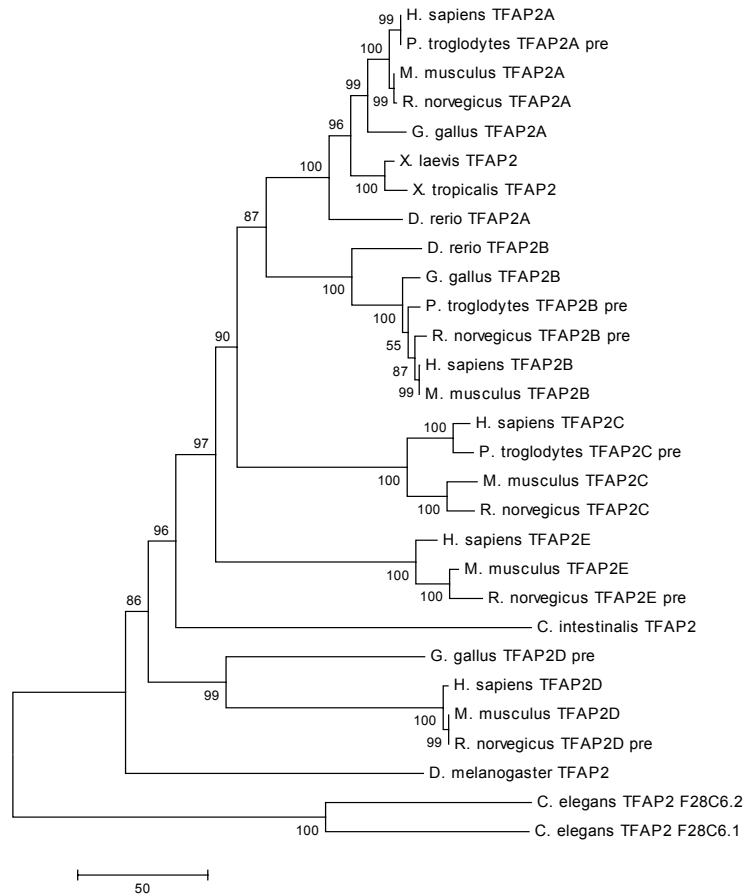


Abbildung 8: **Phylogenetische Analyse der AP-2-Transkriptionsfaktorfamilie** (Eckert et al. 2005); Pre = putative Aminosäuresequenz

	AP-2 α	AP-2 β	AP-2 γ	AP-2 δ	AP-2 ϵ	Andere AP-2
<i>H. sapiens</i>	NP_003211	NP_003212	NP_003213	NP_758438	NP_848643	
<i>P. troglodytes</i>	-	XP_518532	XP_526337	-	-	
<i>M. musculus</i>	NP_035677	NP_033360	NP_033361	NP_694794	NP_945198	
<i>R. norvegicus</i>	XP_225238	XP_217356	NP_958823	XP_236975	XP_233526	
<i>G. gallus</i>	NP_990425	NP_990226	-	XP_426224	-	
<i>X. tropicalis</i>	AAD53289	-	-	-	-	
<i>X. laevis</i>	AAA49972	-	-	-	-	
<i>D. rerio</i>	NP_789829	NP_001019836	-	-	-	
<i>C. elegans</i>						NP_4951819
<i>D. melanogaster</i>						NP_730664
<i>C. intestinalis</i>						BAE06307 / BAE06308

Tabelle 2: **Übersicht über die Zugangsnummern zu den Sequenzdaten der verschiedenen AP-2-Gene in den verschiedenen Spezies** (Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

1.2.8 Mechanismen von AP-2

In ihrer Eigenschaft als Transkriptionsfaktoren findet man AP-2-Proteine mehrheitlich im Zellkern, wo sie an die Promotorregionen ihrer Zielgene binden und so die Transkription dieser regulieren. Dazu zählt eine Reihe von Genen, die für die Proliferation und Differenzierung verschiedenster Zelltypen während der Entwicklung von entscheidender Bedeutung ist (Hilger-Eversheim et al. 2000; Pfisterer et al. 2002).

In vitro Experimenten konnten zeigen, dass z.B. *ADA* (Adenosin Deaminase) (Shi und Kellems 1998), das humane Metallothionin IIa Gen (Mitchell et al. 1987), Keratinozytenspezifische Gene (Fuchs und Byrne 1994), das humane *ILGBP-5* (Insulin-ähnliches Wachstumsfaktor-Bindeprotein-5) (Duan et al. 1995), *HER-2/neu* (Bosher et al. 1996), *Östrogen-Rezeptor* (McPherson et al. 1997), *p21^{WAF/CIP}* (Zeng et al. 1997), *TGF- α* (transformierender Wachstumsfaktor alpha) (Wang et al. 1997) und *Kit* (Huang et al. 1998) von AP-2 Proteinen aktiviert werden. So können AP-2 Proteine über eine Aktivierung von *p21* in den Zellzyklus eingreifen, wodurch das Wachstum von Krebszellen gehemmt wird. Der Promotor von *p21* enthält ein AP-2 Bindemotiv. Wird dieser Bereich mutiert, kann *p21* nicht mehr durch AP-2 aktiviert werden (Zeng et al. 1997).

Neben der Aktivierung der eben beschriebenen Gene kann AP-2 auch eine reprimierende Wirkung auf die Transkription haben. So wird zum Beispiel *MCAM/MUC18*, ein Zelloberflächenglykoprotein, dessen Expression mit Tumorprogression und Metastasierung assoziiert ist, von AP-2 reprimiert (Jean et al. 1998).

In einer Subtraktions-Hybridisierung, in der AP-2 α Nullmutanten mit Wildtypen verglichen wurden, konnte gezeigt werden, dass AP-2 α Gene reprimiert, die Proliferation verzögern und Differenzierung und Apoptose induzieren (Pfisterer et al. 2002). Diese Gene sind in den Mutanten früher exprimiert als in Wildtypen. Eines dieser Gene, *KLF4*, wird in AP-2 α -Mutanten bereits am Tag E8,5 der Embryonalentwicklung der Maus exprimiert, in Wildtyp-Tieren allerdings erst ab Tag E10,5. *KLF4* wird in Zellen in der Arrestphase, nicht aber in der Wachstumsphase exprimiert (Shields et al. 1996). Fibroblasten, denen AP-2 α fehlt, zeigen ein verzögertes Wachstum, was unter anderem an der verstärkten *KLF4*-Expression liegen könnte (Pfisterer et al. 2002).

Neben Proliferation und Differenzierung wird AP-2 auch eine Rolle beim programmierten Zelltod zugeschrieben. Nullmutanten für AP-2 α , β und γ zeigen verstärkt Apoptosen in den betroffenen Geweben. Transgene Mäuse, die AP-2 γ in der Brustdrüse überexprimieren, zeigen eine vermehrte Proliferation des Brustepithels, aber auch vermehrte Apoptosen (Jager et al. 2003).

Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass AP-2 Proteine mit dafür verantwortlich sind, Zellen in einem proliferativen Zustand zu halten und die Differenzierung unterdrücken. Bei Fehlen von AP-2 kommt es zu verstärkten Apoptosen in den betroffenen Geweben.

1.3 Gezielte Mutagenese

1.3.1 Herstellung von konstitutiven Nullmutanten

Um Funktionen von Genen gezielt aufklären zu können, bedient man sich seit Ende der 80er Jahre der „Gene-Targeting“-Technologie (Capecchi 1989). Hierbei wird ein bestimmtes Gen in beiden Allelen gezielt funktionsunfähig gemacht. Die daraus resultierenden Defekte im Tier (hier in der Maus) können nun nach eingehender Untersuchung diesem bestimmten Gen zugeschrieben werden.

Ausgangspunkt einer Nullmutante ist immer der so genannte Targetingvektor. Dieser stellt eine Kopie des auszuschaltenden Genabschnitts dar, welcher so verändert wird, dass ein funktioneller Bereich inaktiviert wird. Im einfachsten Fall besteht der Targetingvektor aus einer Selektionskassette, die von zwei zum gewünschten Gen homologen Bereichen flankiert ist (Capecchi 1989). Der Targetingvektor wird in murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) eingebracht und dort durch homologe Rekombination in das Genom integriert. Nun ersetzt die Selektionskassette den funktionell wichtigen Bereich des auszuschaltenden Gens (Abb. 9).

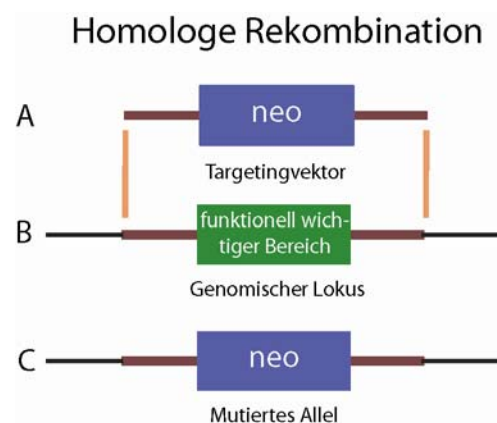


Abbildung 9: **Schematische Darstellung der homologen Rekombination**
(A) Targetingvektor mit Selektionskassette (=“neo“); **(B)** Genomischer Lokus; **(C)** Nach der homologen Rekombination wird der funktionell wichtige Bereich des Gens durch die Selektionskassette ersetzt

Diejenigen Stammzellen, die den Targetingvektor an der richtigen Stelle in das Genom integriert haben, werden in Blastozysten injiziert, die sodann in scheinsschwangere Weibchen transferiert werden. So entwickelt sich ein chimärer Embryo, dessen Anteil an injizierten Stammzellen an der Fellfarbe erkannt werden kann, da Empfängerblastozyste und ES-Zellen von verschiedenen Mausstämmen stammen. Meist besitzen die ES-Zellen das dominante Agouti-Allel (braune Fellfarbe), die Blastozysten dagegen das rezessive Gen für schwarze Fellfarbe. Bei der Verpaarung der Chimären können entweder schwarze oder braune Mäuse entstehen, wobei nur die braunen Mäuse von den ES-Zellen abstammen. Diese braunen Tiere sind heterozygot für das mutierte Allel. Nach weiterer Verpaarung dieser heterozygoten Tiere erhält man zu 25% homozygot mutierte Nachkommen, die Nullmutanten.

1.3.2 Herstellung von konditionalen Nullmutanten

Problematisch wird die Analyse der Mäuse, wenn der Verlust eines Gens bereits in der Embryonalentwicklung zum Tod der Tiere führt. In so einem Fall kann man zwar aussagen, dass das mutierte Gen für die Embryonalentwicklung essentiell ist, man kann allerdings keine Aussage darüber treffen, welche weiteren Funktionen das Gen, z.B. im adulten Organismus, hat. Schwierig ist die Analyse auch, wenn das ausgeschaltete Gen in mehreren Geweben aktiv ist, da man immer nur die Summe der Defekte beobachten kann.

Deshalb benötigt man eine Technologie, bei der man Gene zu bestimmten Zeitpunkten und/oder in bestimmten Geweben, bzw. Zellen gezielt ausschalten kann. Diese Technologie beruht darauf, dass der funktionell wichtige Teil, der für die Inaktivierung des Gens verantwortlich ist, nachträglich ausgeschnitten wird. Ermöglicht wird das durch das Enzym Rekombinase und DNA-Sequenzen, die von diesem Enzym erkannt werden. Zur Zeit sind zwei Rekombinase-Systeme etabliert, eines davon ist das Cre/loxP-System (Lakso et al. 1992; Orban et al. 1992), das andere das Flp/FRT-System (Dymecki 1996).

Das Cre/LoxP-System beruht auf der Kombination aus dem Enzym Cre-Rekombinase, welches aus dem Bakteriophagen P1 stammt, (Lakso et al., 1992; Orban et al., 1992) und einer 34 bp lange Konsensus-Sequenz, die auch als LoxP-Sequenz bezeichnet wird und die Erkennungssequenz für die Cre-Rekombinase darstellt. Die LoxP-Sequenz besteht aus zwei 13 bp langen palindromischen Sequenzen, die eine 8 bp lange, nicht palindromische Sequenz, flankieren (Abb. 10). Diese ist für die Orientierung zuständig. Da diese sehr kurze Sequenz im Mausgenom nicht vorkommt, kann sie gut für gezielte Mutationen genutzt werden.



Abbildung 10: LoxP-Sequenz

Randständig befinden sich die palindromischen Sequenzen, zentral befindet sich eine 8 bp lange Sequenz, die für die Orientierung zuständig ist.

Das Flp/FRT-System funktioniert auf dieselbe Weise. Die Flp-Rekombinase wurde aus Hefe isoliert, die FRT-Sequenz ist analog zur LoxP-Sequenz aufgebaut (Dymecki et al., 1996).

Um die Systeme effektiv nutzen zu können, benötigt man beide Komponenten in einer bestimmten Form. Der Targetingvektor muß so modifiziert werden, dass der auszuschaltende Bereich nun von LoxP-Sequenzen in der gleichen Orientierung flankiert ist, die im Intron liegen. Ansonsten muß die zu rekombinierende Sequenz nach der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen dem Wildtyp-Allel gleichen, damit das gewünschte Gen korrekt exprimiert wird. Die so erhaltenen Mäuse werden als konditionale Nullmutanten oder „gefloxt“ Mäuse bezeichnet. Diese Mäuse werden mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Mäusen verpaart. Durch die Aktivität der Cre-Rekombinase wird zwischen den LoxP-Sequenzen zuerst eine Schlaufe gebildet und der entsprechende Bereich anschließend entfernt (Kwan 2002). Dieser Vorgang wird auch als „Loop-Out-Reaktion“ bezeichnet.

Mittlerweile gibt es viele verschiedene Cre-Mäuse, die sowohl kommerziell als auch von anderen Arbeitsgruppen erworben werden können, so dass die Analyse von Genfunktionen in vielen verschiedenen Geweben und Zellen möglich ist.

1.3.3 Generation AP-2 γ -konditional-defizienter Mäuse

In dieser Arbeit wurde die AP-2 γ^{floxed} -Linie verwendet. Im AP-2 γ -Lokus dieser Mäuse wurde das Exon 5 von zwei LoxP-Sequenzen flankiert, da Exon 5 für die DNA-Bindung mitverantwortlich und somit für die Funktion von AP-2 γ essentiell ist (Werling und Schorle 2002). Durch die Aktivität der Cre-Rekombinase in verschiedenen Zellen, bzw. Geweben, wird das Exon 5 im AP-2 γ -Lokus ausgeschnitten und es entsteht nachträglich eine Maus mit gewebs-, bzw. zelltypspezifischer Ablation des AP-2 γ -Gens (s. Abb. 11).

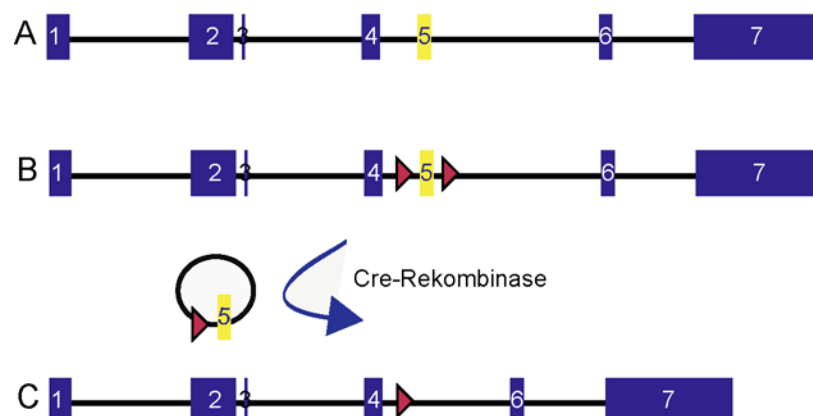


Abbildung 11: **Schematische Darstellung der „Loop-Out-Reaktion“ im AP-2 γ -Lokus**
 (A) Wildtyp-Allel; (B) konditionales Allel; (C) Durch Expression der Cre-Rekombinase generiertes Null-Allel

1.4 Zielsetzung

Die Analyse AP-2 γ -defizienter Tiere zeigte bereits, dass AP-2 γ für die Entwicklung des extraembryonalen Gewebes essentiell ist. Fehlt AP-2 γ , ist die Anzahl an Riesenzellen in der Plazenta vermindert. Dadurch kommt es zu einem unterentwickelten Labyrinth, weswegen der Embryo nicht mit genügend Nährstoffen versorgt werden kann und schließlich am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung abstirbt (Werling und Schorle 2002). Durch dieses frühe Absterben ist es nicht möglich, weitere Funktionen von AP-2 γ im Organismus zu untersuchen. Deshalb wurde ein konditionales Mausmodell etabliert, welches es erlaubt, die Ablation des AP-2 γ -Gens zelltyp-spezifisch zu induzieren (Werling und Schorle 2002). Dadurch wird es möglich, den embryonal-letalen Phänotyp zu umgehen.

In dieser Arbeit sollte zuerst das zeitliche und räumliche Expressionsmuster von AP-2 γ genauer untersucht werden, um einen genaueren Aufschluss über den zu erwartenden Phänotyp zu bekommen.

Des Weiteren sollten Verpaarungen der konditionalen Nullmutanten mit verschiedenen Cre-Linien durchgeführt werden, um erstens Aussagen über die Funktion von AP-2 γ machen zu können und zweitens den Phänotyp genauer zu verifizieren.

Da AP-2 γ im Menschen während der Embryonalentwicklung in den Keimzellen und später in Keimzelltumoren und deren Vorläufern exprimiert wird (Hoei-Hansen et al. 2004; Pauls et al. 2005), sollte der Zusammenhang zwischen einer veränderten Gendosis und dem Auftreten von Keimzelltumoren in der Maus untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

1 kb-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
AEC	Dako, Hamburg
Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Sigma-Aldrich, München
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
BM Block	Roche, Mannheim
BM Purple	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Cäsiumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylamonio]-1-Propan-Sulfonat (CHAPS)	Sigma-Aldrich, München
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich, München
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DPX Mountant für Histologie	Sigma-Aldrich, München
Eisessig	Merck, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Fast-Red	Sigma-Aldrich, München
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Sigma-Aldrich, München
Glycerin	KMF, Lohmar

Glycin	Sigma-Aldrich, München
Guanidinium-Isothiocyanat	Sigma-Aldrich, München
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Hefe-Extrakt	Merck, Darmstadt
Heparin	Sigma-Aldrich, München
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Carnation, Kanada
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Merck, Darmstadt
MOPS	Sigma-Aldrich, München
Naphthyl-Phosphat	Sigma-Aldrich, München
Natriumacetat-Lösung; 3 M; pH 4,6	Applied Biosystems, Darmstadt
Natriumchlorid	KMF, Lohmar
Natriumcitrat	KMF, Lohmar
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxidplättchen	Merck, Darmstadt
Natronlauge (5 M)	Merck, Darmstadt
N-Lauroyl-Sarcosine	Sigma-Aldrich, München
Nukleotid-Stammlösungen	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Oligo-d(T)-Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Oligonucleotide (Primer)	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Periodsäure-Schiff (PAS)-Reagenz	Sigma-Aldrich, München
Pferde-Serum	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth, Karlsruhe
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) – Tabletten	Sigma-Aldrich, München
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schaf-Serum	Sigma-Aldrich, München
Sephadex G50	GE Healthcare, München
Tris-Base	Merck, Darmstadt
tRNA (Hefe)	Sigma-Aldrich, München

Triton X 100	Serva, Heidelberg
Trypton	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

1,5 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
2 ml-Reaktionsgefäße	Greiner, Solingen
96-well-Mikrotiterplatte	Nunc, Wiesbaden
Bakterienschalen	Greiner, Solingen
Blaukappenröhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner, Solingen
Deckgläschen	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Dialyseschläuche	Merck, Darmstadt
Einstreu	Ssniff, Soest
Hybond XL Membranen	GE Healthcare, München
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Objektträger mit PEN-Membran	P.A.L.M., Bernried
PCR-Reaktionsgefäße	Axygen (Nerbe Plus), Winsen/Luhe
Röntgenfilme	Kodak, Rochester, USA
Serumröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Tierfutter	Ssniff, Soest
Tierkäfige und Zubehör	Techniplast, Hohenpleissenberg
Whatman Papier 3MM	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturschalen und -platten	Greiner, Solingen

2.1.3 Radiochemikalien

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-Desoxy-Cytidintriphosphat}$	GE Healthcare, München
--	------------------------

2.1.4 Verwendete Enzyme

AMV-Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Proteinase K	Merck, Darmstadt
RNase OUT	Invitrogen, Karlsruhe
T3 RNA-Polymerase	Roche, Mannheim
T7 RNA-Polymerase	Roche, Mannheim

2.1.5 Medien und Chemikalien für die Zellkultur

bFGF (FGF2)	Millipore, Schwalbach
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dulbecco's MEM mit Glutamax-1	GibcoBRL, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Gelatine	Sigma-Aldrich, München
Leukaemia Inhibiting Factor (LIF)	Millipore, Schwalbach
L-Glutamin	GibcoBRL, Karlsruhe
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Nicht-essentielle Aminosäuren	GibcoBRL, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	GibcoBRL, Karlsruhe
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	GibcoBRL, Karlsruhe
Stammzellfaktor (SCF)	Millipore, Schwalbach
Trypsin	PAN Biotech, Wien, Österreich
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg

2.1.6 Allgemeine Lösungen

Soweit nicht anders beschrieben, handelt es sich bei dem verwendeten Wasser um ddH₂O.

DNA-Lyse-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1% SDS
10x Ladepuffer	40% Glycerol; 40% H ₂ O; 10x TAE; 1 Spatelspitze Bromphenolblau; 1 Spatelspitze Xylencyanol
1 M Tris-Puffer	In H ₂ O; pH-Wert mit HCl oder Maleinsäure einstellen
20x MOPS	400 mM MOPS; 100 mM NAc; 10 mM EDTA
20x SSC pH 7,0	174 g NaCl; 88,2 g Na-Citrat; ad 1 l H ₂ O
5,7 M CsCl-Lösung	In 0,1 mM EDTA und 0,2% DEPC
50x TAE	2 M Tris; 5,7% Eisessig; 50 mM EDTA
Alkalische-Phosphatase-Färbelösung	80 mM MgCl ₂ ; 250 mM Tris-Maleinsäure pH 9,0; 0,4 mg/ml Naphthyl-Phosphat; 1 mg/ml Fast-Red
Church-Puffer	7% SDS; 0,5 M Natrium-Phosphatpuffer pH 7,2; 1 mM EDTA
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid
Formamid-Denaturierungspuffer	6,5% Formaldehyd; 0,5% Ethidiumbromid; 4x MOPS; 50% Formamid (rekristallisiert)
Guanidinium-Isothiocyanat-Lösung	2,5 M Guanidinium-Isothiocyanat; 50 mM Tris-HCl pH7,5; 10 mM EDTA pH8; 5% β- Mercaptoethanol; pH 5,2 mit Essigsäure einstellen
Lyse-Puffer zur Lasermikrodissektion	1 mM EDTA pH 8,0; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5% Tween 20; 100 µg Proteinase K
Natrium-Phosphatpuffer pH 7,2	342 ml 1 M Na ₂ HPO ₄ ; 158 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ für 500 ml
PCR-Puffer	500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,3
Qiagen-Puffer P1	50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNaseA
Qiagen-Puffer P2	200 mM NaOH; 1%SDS
Qiagen-Puffer P3	3 M KAc pH 5,5

Qiagen-Puffer QBT	750 mM NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0; 15% Isopropanol; 0,15% Triton X 100
Qiagen-Puffer QC	1 M NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0; 15% Isopropanol
Qiagen-Puffer QF	1,25 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 8,5; 15% Isopropanol
TE (pH 8,0)	10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA
Waschlösung 1 (Northern)	2x SSC; 0,1% SDS
Waschlösung 2 (Northern)	1x SSC; 0,1% SDS
Waschlösung 3 (Northern)	0,1x SSC; 0,1% SDS

2.1.7 Lösungen für die Bakterienkultur

1x LB-Agar	10 g Trypton; 5 g NaCl; 5 g Hefe-Extrakt; 16 g Agar; ad 1 l H ₂ O;
5x LB-Medium	50 g Trypton ; 25 g NaCl; 25 g Hefe-Extrakt; ad 1 l H ₂ O;
Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml Ampicillin

2.1.8 Lösungen für *In Situ* Hybridisierung

20x SSC pH 4,5	174 g NaCl; 88,2 g Na-Citrat; ad 1 l DEPC- H ₂ O, pH mit Zitronensäure einstellen
AP1-Puffer	100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl ₂ ;
BM-Block-Lösung	10% Schaf-Serum; 1% Boehringer Block; in PBSw
Hybridisierungslösung	1% Boehringer Block; 50% Formamid; 5x SSC pH 7,0; 1 mg/ml tRNA; 0,1 mg/ml Heparin; 1% CHAPS; 0,1% Tween 20; 50 mM EDTA; in DEPC-H ₂ O
MAB-Puffer	100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; pH 7,5
PBSw	0,1% Tween 20 in PBS

2.1.9 Lösungen für Antikörperfärbung von Embryonen

PBSMT	2% Milchpulver; 0,1% Triton X 100 in PBS
PBT	0,2% BSA; 0,1% Triton X 100 in PBS

2.1.10 Lösungen für die Zellkultur

Einfriermedium	10% DMSO; 90% FCS
Gelatine	0,1% (w/v) Gelatine
HepG2 Medium	500 ml Dulbecco's MEM; 10% FCS; 50 U/ml Pen/Strep; 200 nM L-Glutamin
Keimzellmedium	500 ml Dulbecco's MEM mit Glutamax-1; 15% FCS; 50 U/ml Pen/Strep; 200 nM L-Glutamin; 1x nicht-essentielle Aminosäuren; 100 nM β -Mercaptoethanol; 1000 U/ml LIF; 60 ng/ml SCF; 20 ng/ml bFGF
SI/Sl ⁴ -mSCF220 Medium	500 ml Dulbecco's MEM; 10% FCS; 50 U/ml Pen/Strep; 200 nM L-Glutamin

2.1.11 Verwendete Kits

Vectastain ABC System	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Alkaline Phosphatase Substrat Kit III	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
DIG-RNA-Labeling Kit	Roche, Mannheim
HiSpeed Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Rediprime DNA Labeling System	GE Healthcare, München
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
TOPO Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Coat-A-Count Total Testosterone	Diagnostic Products Corporation, Bad Nauheim
Rat Follicle Stimulating Hormone (rFSH)	GE Healthcare, München

[¹²⁵I] Biotrak Assay System with Magnetic Separation

Rat Luteinizing Hormone (rLH) [¹²⁵I] Biotrak GE Healthcare, München
Assay System with Magnetic Separation

2.1.12 Oligonukleotide

In4down	5'-AAC AGG TTA TCA TTT GGT TGG GAT T-3'
Ex5up	5'-CAA TTT TGT CCA ACT TCT CCC TCA A-3'
Ex6up	5'-AAT AGT CAG CCA CCG CTT TAC TAG G-3'
Cref	5'-CCA CGA CCA AGT GAC AGC AAT G-3'
Crer	5'-CAG AGA CGG AAA TCC ATC GCT C-3'
Gammaf	5'-CCT GGA TTT AAC TGG CGA CT-3'
Gammar	5'-CCT CCA GCC CTG AAA TAT GG-3'
Kitf	5'-CAG TTA CCG CGC TCT GTT TG-3'
Kitr	5'-GCC CCT TAA GTA CCT GAC ATC-3'
Dnd1f	5'-CCC TAA ATG GGT TAA GCA GAG-3'
Dnd1r	5'-GGC AAG GTT CCT CAC AAC TAA-3'
β-Actf	5'-CCA TCC TGC GTC TGG ACC TG-3'
β-Actr	5'-GTA ACA GTC CGC CTA GAA GC-3'

2.1.13 Verwendete Plasmide

pAP-2 γ FragNort (Northern Blot)	Selbst erstellt
pflAP-2 γ (In Situ Hybridisierung)	Mit freundlicher Genehmigung von R. Jäger
pmkitLuc	Mit freundlicher Genehmigung von D. Eckert
p3xAP-2Bluc	Mit freundlicher Genehmigung von H. Hurst (Braganca et al. 2002)
pcDNA-3	Mit freundlicher Genehmigung von R. Jäger
pcDNA-3-AP-2 α	Mit freundlicher Genehmigung von R. Jäger
pcDNA-3-AP-2 γ	Mit freundlicher Genehmigung von R. Jäger

2.1.14 Verwendete Mauslinien

129/SV-AP-2 γ	Heterozygote AP-2 γ -Linie, genetischer Hintergrund: 129/SV
129/SV-AP-2 γ^{floxed}	Heterozygot konditionale AP-2 γ -Linie, genetischer Hintergrund: 129/SV
129/SV-TNAP-Cre	(Lomeli et al. 2000)
B6-Mox2Cre	(Tallquist und Soriano 2000)
B6-Sox2Cre	(Hayashi et al. 2002)

2.1.15 Verwendete Bakterien

TOP10 F'	<i>E. coli</i> - Stamm: F' {lacIq Tn10(Tet ^R)} <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>rec A1 deoR</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galJ galK rpsL</i> (Str ^R) <i>end A1 nupG</i> Invitrogen, Karlsruhe
----------	--

2.1.16 Verwendete Membranen

Adult Multiple Tissue Northern Blot	Seegene, Korea
Mouse Embryo Stage Northern Blot	Seegene, Korea

2.1.17 Verwendete Antikörper

AP-2 γ (Kaninchen, polyklonal)	Mit freundlicher Genehmigung von M. Moser
GATA-1 (Ratte, monoklonal)	Santa Cruz, Heidelberg
GCNA (Ratte, monoklonal)	Mit freundlicher Genehmigung von G. Enders
Ki-67 (Ratte, monoklonal)	DAKO, Hamburg

MSY2 (Kaninchen, polyklonal)	(Gu et al. 1998)
nNOS (Kaninchen, polyklonal)	BD Biosciences, Heidelberg
Oct-4 (Maus, monoklonal)	Santa Cruz, Heidelberg
Sekundärantikörper	DAKO, Hamburg
Anti-Digoxigenin-Antikörper, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase	Roche, Mannheim

2.1.18 Verwendete Zelllinien

HepG2	Humane Leberzelllinie aus einem hepatozellulären Karzinom
SI/SI4 <i>mSCF220</i>	Murine Fibroblastenzelllinie aus Stammzellfaktor-defizienten Mäusen, stabil transfiziert mit der membran-gebundenen Form des murinen Stammzellfaktors, (geschenkt von D. Williams)

2.2 Methoden

2.2.1 Tierhaltung

Die Mäuse wurden in Plastikkäfigen auf Streu gehalten und erhielten Trockenfutter und Wasser *ad libitum*. Tag- und Nachtzyklus betragen jeweils 12 h. Zur Identifikation wurden die Tiere im Alter von drei Wochen mit nummerierten Ohrmarken versehen und eine Schwanzbiopsie zur DNA-Gewinnung durchgeführt. Das Töten der Tier erfolgte durch zervikale Dislokation. Nach Verpaarung der Tiere für die Gewinnung von Embryonen wurde jeden Morgen eine Pfropfkontrolle durchgeführt. Der Tag, an dem ein Vaginalpfropf gefunden wurde, wurde als Tag 0,5 der Embryonalentwicklung festgelegt (E0,5).

2.2.2 DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien der Maus

Die Schwanzspitzen wurden über Nacht in 710 µl Lyse-Puffer und 40 µl Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) bei 55°C im Brutschrank lysiert. Am nächsten Morgen wurden die Proben 5 min bei Raumtemperatur gemischt. Den Proben wurden je 300 µl 5 M NaCl zugegeben, erneut 5 min gemischt und 10 min bei 13000 rpm und 10°C zentrifugiert. 750 µl des Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit vorgelegten 500 µl Isopropanol überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch 10-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C. Das so erhaltene Pellet wurde zweimal mit 500 µl 80%igem Ethanol gewaschen, bei 37°C 30 min getrocknet und anschließend in 400 µl H₂O aufgenommen. Danach wurde die DNA 2 h bei 37°C gelöst.

2.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde eine PCR durchgeführt, die in einem Volumen von 50µl angesetzt wurde:

	<u>Gamma:</u>	<u>Cre:</u>
DNA	10 µl	5 µl
PCR-Puffer	5 µl	5 µl
Primer (15 µmol)	1 µl In4down 1 µl Ex5up 1 µl Ex6up	1 µl Cref 1 µl Crer
dNTPs (10 mM)	1 µl	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	5 µl	4 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	0,5 µl
H ₂ O	25,5 µl	32,5 µl
Programme	94°C; 45 sec 55°C; 30 sec 72°C; 1 min	94°C; 45 sec 56°C; 30 sec 72°C; 45 sec
Zyklenanzahl	37	35

Tabelle 3: **Übersicht über Pipettierschemata und Programme der Genotypisierungs-PCRs**

2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Gemischen und deren Größenbestimmung. Dazu wurden horizontale 2%ige (für PCR), bzw. 1%ige Agarosegele (für sonstige Analysen) verwendet. Die Agarose wurde abgewogen, mit der entsprechenden Menge an TAE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugegeben und das Gel gegossen. Den Proben wurde jeweils 1/10 des Volumens Ladepuffer zugefügt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte je nach Gelstärke bei 70-130 V. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenz im UV-Licht (320 nm).

2.2.5 Analytischer und präparativer Verdau von DNA

Für einen analytischen Verdau wurden 5 µl Plasmid-DNA mit 2 µl 10x Restriktionsenzym-puffer und 0,5 µl (10 U/µl) Restriktionsenzym versetzt. Das Gemisch wurde mit H₂O auf ein Volumen von 20 µl gebracht und 1-3 h bei 37°C inkubiert.

In einem präparativen Verdau wurden 20 µg DNA eingesetzt, das Gesamtvolumen betrug 70 µl. Entsprechend wurden 7 µl 10x Restriktionsenzym-puffer und 3 µl (10 U/µl) Enzym zugegeben und der Verdau bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.6 Präparation von Dialyseschläuchen

Dialyseschläuche mit 25 mm Breite wurden in ca. 7 cm lange Stücke geschnitten und in 2% Na₂CO₃; 1 mM EDTA 10 min gekocht. Die Schläuche wurden anschließend zweimal mit H₂O gewaschen und in 1 mM EDTA autoklaviert. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C.

2.2.7 Elektroelution von DNA-Fragmenten

Die Bande von Interesse wurde mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in einen, mit H₂O ausgespülten, Dialyseschlauch überführt. Der Schlauch wurde unten mit einer Klammer verschlossen. Zu dem Gelstück wurden 350 µl TE gegeben, und der Schlauch wurde oben mit einer weiteren Klammer luftblasenfrei verschlossen. Anschließend wurde der Schlauch in einer mit 1xTAE gefüllten Gelkammer plziert und eine Spannung von 90 V angelegt. Die DNA konnte so elektrophoretisch aus dem Gel eluiert werden. Nach 45 min wurde die Polungsrichtung für 1 min umgekehrt und schließlich die DNA-haltige Lösung aus dem Schlauch herauspipettiert, Phenol/Chloroform-extrahiert und Ethanol-präzipitiert.

2.2.8 Phenol/Chloroform-Extraktion nukleinsäurehaltiger Lösungen

Die Nukleinsäurelösung wurde mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) versetzt, gemischt und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, mit dem gleichen Volumen an Chloroform versetzt und wiederum 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abermals in ein neues Gefäß überführt und die DNA schließlich Ethanol-präzipitiert.

2.2.9 Ethanol-Präzipitation nukleinsäurehaltiger Lösungen

Der Nukleinsäurelösung wurde 1/10 des Volumens Natriumacetat (3 M, pH 4,6) und das 2,5-fache Volumen an 100% Ethanol zugegeben. Das Gemisch wurde 45 min bei -80°C oder über Nacht bei -20°C inkubiert und anschließend 20 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 80% Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen H₂O aufgenommen.

2.2.10 Herstellung von Agar-Platten

Eine Flasche LB-Agar wurde in der Mikrowelle bei geringer Wärmezufuhr so lange gekocht, bis sich der Agar vollständig gelöst hatte. Danach wurde die Lösung im Wasserbad auf 60°C heruntergekühlt. Es wurden 100 µg/ml Ampicillin hinzugeben und ca. 20 Agar-Platten (9 cm Durchmesser) gegossen.

2.2.11 Präparation kompetenter Bakterien

Eine Bakterienkultur wurde über Nacht in 50 ml LB-Medium bei 37°C im Bakterien-schüttler inkubiert. Von dieser Kultur wurde am nächsten Morgen 1 ml in 100 ml LB-Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,3 wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen auf 4°C abgekühlt und bei 2000 rpm 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 ml 50 mM CaCl₂ resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter 5minütiger Zentrifugation bei 2000 rpm wurde das Zellpellet in 10 ml eiskalter CaCl₂-Lösung mit 15% Glycerol resuspendiert. Die Zellen wurden dann zu 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und konnten nun bei -80°C aufbewahrt werden.

2.2.12 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien

100 µl kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 5 ng des zu transformierenden Plasmids gemischt. Das Gemisch wurde 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 30 sec. Anschließend wurden die Bakterien noch einmal 3 min auf Eis inkubiert. Dann wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und die Bakterien 30 min bei 37°C und 750 rpm geschüttelt. 100 µl wurden direkt auf einer LB-Amp-Platte ausgestrichen, der Rest wurde 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf einer weiteren LB-Amp-Platte ausgestrichen.

2.2.13 Klonierung von PCR-Produkten

Hierzu wurde das „TOPO-TA-Cloning Kit“ der Firma Invitrogen verwendet. Es wurde nach Herstellerprotokoll verfahren.

4 µl des aus dem Gel eluierten und Ethanol präzipitierten PCR-Produktes wurden mit 1 µl Salzlösung und 1 µl TOPO-Vektor versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 µl dieser Reaktion zu den im Kit mitgelieferten kompetenten Bakterien gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 30 sec. Danach wurden die Zellen wiederum für 3 min auf Eis inkubiert. Nun wurden 250 µl SOC-Medium (im Kit mitgeliefert) zugegeben und die Zellen bei 37°C für 1 h bei 300 rpm geschüttelt. 50 µl dieses Ansatzes wurden auf einer LB-Amp-Platte ausgestrichen, die übrigen Bakterien wurden 2 min bei 3000 rpm sedimentiert, in 50 µl SOC-Medium aufgenommen und auf einer weiteren LB-Amp-Platte ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.14 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA („Mini-Präp“)

Von einer 3 ml-Übernachtskultur wurden ca. 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und 45 sec bei 13000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 150 µl Qiagen-Puffer P1 resuspendiert. Die Bakterien wurden durch Zugabe von 300 µl Qiagen-Puffer P2 lysiert. Die Neutralisation des Lysats sowie die Fällung des SDS erfolgte durch Zugabe von 150 µl Qiagen-Puffer P3. Nach Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm wurde der Überstand (600 µl) in ein neues Reaktionsgefäß mit vorgelegten 300 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) überführt, gemischt und abermals 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die DNA in der oberen, wässrigen Phase wurde schließlich Ethanol-präzipitiert und in 20 µl Wasser aufgenommen.

2.2.15 Präparation großer Mengen Plasmid-DNA („Maxi-Präp“)

Verwendet wurde das „HiSpeed Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen, es wurde nach Herstellerprotokoll verfahren.

Eine 200 ml-Übernachtskultur wurde 15 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml Qiagen-Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden 10 ml Qiagen-Puffer P2 zugegeben und die Zellen 5 min bei Raumtemperatur lysiert. In dieser Zeit wurde eine Kappe auf eine "QIA-Filter-Maxi-Cartridge" geschraubt und diese aufgestellt. Nach Zugabe von 10 ml Qiagen-Puffer P3 wurden die Bakterien sofort auf die "Cartridge" geschüttet. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 10 min. Während dieser Zeit wurde eine „HiSpeed-Maxi-Säule“ mit 10 ml Qiagen-Puffer QBT äquilibriert. Das Lysat wurde auf die Säule ausgepresst und diese wurde anschließend mit 60 ml Qiagen-Puffer QC gewaschen. Danach wurde ein 50 ml Blaukappenröhrchen unter die Säule gestellt und die DNA mit 15 ml Qiagen-Puffer QF eluiert. Zu der DNA-Lösung wurden 10,5 ml Isopropanol gegeben, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung durch einen „QIA-Präzipitator“ gedrückt. Die nun im Präzipitator befindliche DNA wurde mit 2x 600 µl H₂O in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß eluiert und die Konzentration im Photometer bestimmt.

2.2.16 Konzentrationsbestimmung nukleinsäurehaltiger Lösungen im Photometer

Die Nukleinsäure-Konzentration einer Lösung lässt sich im Spektralphotometer bestimmen. Dazu misst man die Lösung gegen ihr Lösungsmittel bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml und einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der Lösung. Er sollte bei DNA im Bereich von 1,8 und bei RNA im Bereich von 2,0 liegen.

2.2.17 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Hierzu wurde das „Rediprime Labeling Kit“ von Amersham verwendet. Es wurde nach Herstellerprotokoll verfahren.

25 ng der zu markierenden DNA-Probe wurden mit TE auf ein Gesamtvolumen von 45 µl gebracht, 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Die nun denaturierte DNA wurde in ein „Rediprime-Reaktionsgefäß“ überführt, und es wurden 5 µl αP³²dCTP zugegeben, einige Male auf- und abpipettiert und für 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA gestoppt, die Probe mit TE auf ein Gesamtvolumen von 200 µl gebracht und auf einer selbst hergestellten Sephadex G50-Filtrationssäule von freien Nukleotiden gereinigt. Dazu wurde eine 1 ml-Spritze mit etwas Glaswolle verstopft, darauf wurde Sephadex G50 (gequollen und autoklaviert in TE)

pipettiert. Diese Säule wurde durch zweiminütige Zentrifugation bei 1000 rpm mit 200 µl TE equilibriert. Anschließend wurde die Probe auf die Säule geladen, diese wurde in ein 15 ml Blaukappenröhrchen gestellt und wiederum 2 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Danach wurde mit 200 µl TE nachgewaschen. Schließlich wurde die Sonde erneut denaturiert (5 min 95°C, 5 min auf Eis) und konnte nun zu der Hybridisierungslösung hinzugegeben werden.

2.2.18 Hybridisierung

Die Membran wurde im Hybridisierungsofen bei 65°C 4 h mit Church-Puffer prähybridisiert. Nach der Prähybridisierung wurde der Church-Puffer erneuert und die radioaktiv markierte Sonde zugegeben. Die anschließende Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C. Am nächsten Morgen wurde die Hybridisierungslösung gegen Waschlösung ausgetauscht. Es wurde zweimal 10 min mit Waschlösung 1, einmal 10 min mit Waschlösung 2 und zweimal 10 min mit Waschlösung 3 bei 65°C im Schüttelwasserbad gewaschen. Zum Schluss wurde die Membran in eine Folie eingeschweißt, und es wurde ein Film aufgelegt. Die Exposition erfolgte bei -80°C für 1-14 Tage.

2.2.19 RNA-Isolierung aus Zellen

Die RNA-Isolierung aus Zellen erfolgte mit dem „Qiagen RNeasy Kit“. Es wurde nach Herstellerprotokoll verfahren.

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit Lysispuffer versetzt (350 µl Puffer RLT+3,5 µl β-Mercaptoethanol). Die so entstandene zähflüssige Lösung wurde mit einem Schaber abgekratzt, in eine „Qia-Shredder-Spinsäule“ überführt und 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit 350 µl 70%igem Ethanol versetzt, gemischt, in eine „RNeasy-Mini-Säule“ pipettiert und 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, 700 µl Puffer RW1 auf die Säule pipettiert und wiederum 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Gefäß überführt, es wurde mit 500 µl Puffer RPE gewaschen und dabei erneut 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, allerdings wurde nun 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Zur Elution der RNA wurde die Säule in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 30 µl DEPC-H₂O 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Die Konzentration der RNA-Lösung wurde im Photometer bestimmt. Die RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

2.2.20 RNA-Isolierung aus Geweben

8ml Guanidinium-Isothiocyanat-Lösung wurden in einem 50 ml-Blaukappenröhrchen vorgelegt. Das Gewebestück wurde zugegeben und ca. 3 min mit einem Ultraturrax zerkleinert. Anschließend wurde das Gemisch 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein 15 ml-Blaukappenröhrchen überführt, 0,8 g CsCl und 1,6 ml 10%ige Sarcosyl-Lösung zugegeben, gemischt und für 2 min bei 65°C inkubiert. In einem Zentrifugenröhrchen wurden 4 ml 5,7 M CsCl-Lösung vorgelegt, die mit dem Guanidinium-Lysat überschichtet wurden. Die Proben wurden über Nacht bei 28000 rpm in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Am nächsten Morgen wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 400 µl TE resuspendiert. Es erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Präzipitation. Schließlich wurde die RNA in 30 µl DEPC-H₂O aufgenommen und die Konzentration im Photometer bestimmt. Die RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

2.2.21 cDNA-Synthese

Für eine cDNA-Synthese wurde 1 µg RNA eingesetzt. Die RNA wurde mit 1 µl Oligo-d(T)-Primer, 2 µl dNTPs (10 mM) versetzt, auf 10 µl mit DEPC-H₂O aufgefüllt und 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl PCR-Puffer, 4 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl DTT (0,1 M), 1 µl DEPC-H₂O, 1 µl RNase OUT und 1 µl AMV-Reverse Transkriptase (15 U/µl) zugegeben. Die Reaktion wurde nun zur Erststrangsynthese 45 min bei 50°C und schließlich 5 min bei 80°C inkubiert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

2.2.22 Expressionsnachweis mittels RT (Reverse Transkriptase) -PCR

2 µl der cDNA wurden zur Expressionsanalyse in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die verwendeten Pipettierschemata und Programme:

	<u>Kit</u>	<u>Dnd1</u>	<u>AP-2γ</u>	<u>β-Actin</u>
cDNA	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
10xPuffer	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Primer (15µmol)	1 µl Kitf 1 µl Kitr	1 µl Dnd1f 1 µl Dnd1r	1 µl Gammaf 1 µl Gammar	1 µl β -Actf 1 µl β -Actr
dNTPs (10 mM)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl

MgCl ₂ (25 mM)	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
Taq- Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
H ₂ O	35,5 µl	35,5 µl	35,5 µl	35,5 µl

Programme	<u>Kit & Dnd1 :</u> 94°C; 45 sec 60°C; 30 sec 72°C; 30 sec	<u>Gamma RT :</u> 94°C; 30 sec 55°C; 30 sec 72°C; 1 min	<u>β-Actin :</u> 94°C; 2 min 94°C; 30 sec 59°C; 30 sec 72°C; 50 sec 72°C; 5 min
Zyklenanzahl	30	30	25

Tabelle 4: **Übersicht über Pipettierschemata und Programme der RT-PCRs**

2.2.23 Digoxigenin-Markierung von RNA

Hierzu wurde das „Digoxigenin-RNA-Labeling Kit“ der Firma Roche verwendet. Es wurde nach Herstellerprotokoll verfahren.

1 µg des linearisierten Plasmids wurde aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Es wurden 2 µl Transkriptionspuffer, 2 µl Digoxigeninmarkierungslösung und 2 µl RNA-Polymerase (T3 oder T7) dazugegeben, der Ansatz mit DEPC-H₂O auf 20 µl aufgefüllt und 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die markierte RNA mit 5 µl 4 M LiCl und 75 µl 100% Ethanol bei -80°C 45 min gefällt, bei 13000 rpm und 4°C 20 min pelletiert, das Pellet mit 80% Ethanol/DEPC-H₂O gewaschen, bei 37°C 20 min getrocknet und in 40 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Zu der Probe wurde 1 µl RNase-Inhibitor gegeben und die Probe bei -20°C aufbewahrt.

2.2.24 *In Situ* Hybridisierung von Embryonen

Die Embryonen wurden in kaltem PBS präpariert, über Nacht in 4% PFA/PBS bei 4°C fixiert, am nächsten Tag in einer aufsteigenden Methanol-Reihe (25%, 50%, 75%, 100%, jeweils 30 min) dehydriert und in 100% Methanol bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Am 1. Tag der *In Situ* Hybridisierung wurden die Embryonen zuerst in einer absteigenden Methanol-Reihe (75%, 50%, 25%, jeweils 30 min) rehydriert und in PBSw überführt. Sie

wurden zweimal für jeweils 5 min mit PBSw gewaschen und anschließend mit 5 µg/ml Proteinase K in PBSw inkubiert. Die Inkubationszeit variierte je nach Größe der Embryonen zwischen 3 min (E6) und 30 min (E12,5). Der Verdau wurde durch 2 mg/ml Glycin in PBSw gestoppt und die Embryonen erneut zweimal für jeweils 5 min mit PBSw gewaschen. Sie wurden 15 min mit 4% PFA; 0,2% Glutaraldehyd in PBSw refixiert, dreimal jeweils 5 min mit PBSw gewaschen und schließlich in 50% Hybridisierungslösung/50% PBSw und 100% Hybridisierungslösung überführt. Diese beiden Schritte erfolgten so lange, bis die Embryonen abgesunken waren. Danach wurde die Hybridisierungslösung ausgetauscht und 3 h bei 65°C inkubiert. Zur Hybridisierung wurden 200 ng der RNA-Sonde in 100 µl Hybridisierungslösung aufgenommen, 5 min bei 95°C denaturiert und zu den Embryonen gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 70°C.

Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung durch eiskalte Hybridisierungslösung ersetzt und 5 min bei 70°C gewaschen. Es wurden dreimal je 400 µl 2x SSC pH 4,5 hinzugegeben ohne die Hybridisierungslösung zu entfernen. Anschließend wurde die Lösung durch 2x SSC pH 7,0 ersetzt und 30 min bei 70°C gewaschen. Nun erfolgten vier Waschschriffe mit MAB-Puffer, zweimal bei RT für jeweils 10 min und zweimal bei 70°C für jeweils 30 min. Es folgten drei weitere Waschschriffe mit PBSw für jeweils 10 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Embryonen in BM-Block-Puffer 2 h bei 4°C unter leichtem Schaukeln inkubiert. In dieser Zeit wurde der Digoxigenin-Antikörper 1:10000 in BM-Block-Puffer verdünnt und bei 4°C inkubiert. Schließlich wurde die BM-Block-Lösung gegen Antikörper-Lösung ausgetauscht und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am dritten Tag wurden die Embryonen sechsmal für je 45 min mit 0,1% BSA/PBSw, zweimal jeweils 30 min mit PBSw gewaschen und zweimal für je 10 min in AP1-Puffer gewaschen. Zum Färben wurde die Waschlösung durch BM Purple ersetzt und bei Raumtemperatur im Dunkeln unter leichtem Schütteln inkubiert, bis eine Färbung sichtbar wurde. Danach wurden die Embryonen dreimal jeweils 10 min in PBSw gewaschen, in einer aufsteigenden Methanolreihe (25%, 50%, 75%, jeweils 30 min) dehydriert und schließlich in 100% Methanol aufbewahrt.

2.2.25 Alkalische Phosphatase-Färbung von Embryonen

Die Embryonen wurden in kaltem PBS präpariert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt. Dann wurden die Embryonen 10 min bei Raumtemperatur in 4% PFA/PBS-Lösung fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend gefärbt. Die Färbelösung wurde immer frisch angesetzt. Die Embryonen wurden 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt, anschließend für 1 h in 40% Glycerol überführt und letztlich in 80% Glycerol im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

2.2.26 Antikörper-Färbung von Embryonen

Die Embryonen wurden in kaltem PBS präpariert, über Nacht in Methanol:DMSO (4:1) bei 4°C fixiert, am nächsten Tag für 5 h in Methanol:DMSO:H₂O₂(30%) (4:1:1) transferiert und schließlich in Methanol bei -20°C aufbewahrt.

Am ersten Tag der Antikörperfärbung wurden die Embryonen zunächst in einer absteigenden Methanolreihe (75%, 50%, 25%; jeweils 30 min) rehydriert und in PBS überführt. Danach wurden die Embryonen zweimal 1 h in PBSMT bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Oct-4; Verdünnung: 1:100) erfolgte in PBSMT bei 4°C über Nacht. Am zweiten Tag wurden die Embryonen fünfmal jeweils 1 h in PBSMT gewaschen (zweimal bei 4°C, dreimal bei RT). Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:200) erfolgte in PBSMT bei 4°C über Nacht.

Am dritten Tag wurden die Embryonen wiederum fünfmal jeweils 1 h in PBSMT gewaschen (zweimal bei 4°C, dreimal bei RT) und danach für 20 min in PBT überführt. Anschließend wurden die Embryonen 30 min mit 0,3 mg/ml DAB in PBT inkubiert. Es wurde 30% H₂O₂ im Verhältnis 1:1000 dazugegeben, um das DAB zu aktivieren. Die Färbung erfolgt für 30 min im Dunkeln. Danach wurden die Embryonen kurz in PBT geschwenkt, durch eine aufsteigende Methanolreihe (25%, 50%, 75%) dehydriert und konnten schließlich in 100% Methanol aufbewahrt werden.

2.2.27 Gewinnung von Serum aus Mäusen

Die Mäuse wurden mit CO₂ betäubt und mittels Herzpunktion ausgeblutet. Das so gewonnene Blut wurde in ein Röhrchen überführt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben 15 min bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Serum im Überstand wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

2.2.28 Bestimmung von Hormonwerten aus Serum

Die Messung der Hormonwerte wurde im Labor für Endokrinologie in der Universitätsfrauenklinik Bonn unter Leitung von Dr. Jochen Reinsberg durchgeführt.

Zur Bestimmung der FSH-Konzentration wurde das „Rat Follicle Stimulating Hormone [¹²⁵I] Biotrak Assay System with Magnetic Separation“ der Firma GE Healthcare verwendet.

Zur Bestimmung der LH-Konzentration wurde das „Rat Luteinizing Hormone [¹²⁵I] Biotrak Assay System with Magnetic Separation“ der Firma GE Healthcare verwendet.

Zur Bestimmung der Testosteron-Konzentration wurde das „Coat-a-Count Total Testosteron“-Kit der Firma Diagnostic Products Corporation verwendet. Es wurde nach Herstellerprotokoll verfahren.

Histologie

2.2.29 Fixierung

Die Fixierung der Gewebe nach der Präparation erfolgte (falls nicht anders beschrieben) in 4%iger neutral gepufferter Formaldehydlösung bei 4°C über Nacht.

2.2.30 Einbetten

Nach der Fixierung wurden die Präparate zugeschnitten, in Einbettkassetten überführt und erneut 1 h bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Präparate unter fließendem Wasser ausgiebig gewässert und in die Einbettmaschine gelegt. Dort durchliefen die Präparate zuerst eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 60%, 70%, jeweils 1 h 35 min; 80%, 96%, 2x 100%, jeweils 1 h), wurden nun in Xylol (1 h, 2x 30 min) und schließlich in Paraffin überführt (3x 1 h) und in diesem bis zur weiteren Verwendung gelagert. Am nächsten Morgen wurden die Präparate aus den Einbettkassetten genommen und in Paraffinblöcke gegossen. Die Paraffinblöcke wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.2.31 Herstellung von Paraffinschnitten

Die Paraffinblöcke wurden in ein Mikrotom eingespannt und Schnitte von 1-3 µm Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden bei 45°C im Wasserbad geglättet, auf Objektträger aufgezogen und bei 50°C über Nacht im Brutschrank getrocknet.

2.2.32 Hämatoxylin/Eosin (H/E)-Färbung von Paraffinschnitten

Die Objektträger wurden zuerst in Xylol und dann in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70%, jeweils 5 min) entparaffiniert, 5 min in H₂O inkubiert und 2 min mit Hämatoxylin nach Meyer gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte unter warmem, fließendem Leitungswasser 10 min gebläut, bevor eine 30-sekündige Eosin-Färbung erfolgte. Nach Abschluss der Färbung wurden die Objektträger durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100%, jeweils 5 min) in Xylol überführt, hier 10 min inkubiert und schließlich mit „DPX“ eingedeckt.

2.2.33 Immunhistochemie

Die Schnitte wurden zuerst in Xylol (2x 10 min), danach in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (100%, 96%, 70%, jeweils 5 min) und in H₂O überführt. Endogene Peroxidasen wurden nach dem 100%igen Alkohol in Methanol/H₂O₂ (25:1) für 20 min geblockt. Je nach Primärantikörper erfolgte eine Vorbehandlung (s. Tabelle). Inkubiert wurden die Schnitte schließlich zuerst 15 min mit Pferde-Serum bei RT, danach wurde der Primärantikörper zugegeben und entsprechend inkubiert (s. Tabelle). Anschließend wurde 5 min mit 2% Milchpulver-Lösung gewaschen und mit dem entsprechenden Sekundärantikörper 30 min bei RT inkubiert (s. Tabelle). Die Schnitte wurden 2x 5 min mit PBS gewaschen. Zur Detektion des Sekundärantikörpers wurde die Avidin-Biotin-Methode gewählt (ABC-Komplex). Die Inkubation mit dem ABC-Komplex erfolgte für 30 min bei RT. Gefärbt wurden die Schnitte mit DAB, je nach Antikörper zwischen 3 und 10 min, die Färbung wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Schnitte wurden ausgiebig mit Leitungswasser gespült, mit Hämatoxylin nach Meyer 2 min gegengefärbt, in eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 2x100%, jeweils 5 min) und Xylol (2x 10 min) überführt und schließlich mit „DPX“ eingedeckt.

Antikörper/ Vorbehandlung	GCNA	MSY2	AP-2 γ	nNOS	GATA-1	Ki-67
Mikrowelle (600' W)	3x5 min	-	5x5 min	-	-	5x5 min
Inkubations- temperatur und -zeit	33°C, 1 h	4°C, ü.N.	37°C, 1 h	37°C, 1 h	37°C, 1 h	4°C, ü.N.
Trypsinbehandlung	-	-	-	15 min	-	-
Primärantikörper- verdünnung	unver- dünnt	1:2000	1:250	1:250	1:200	1:25
Sekundär- antikörper (Verdünnung)	Anti- Ratte (1:200)	Anti- Kaninchen (1:500)	Anti- Kaninchen (1:500)	Anti- Ratte (1:200)	Anti- Ratte (1:200)	Anti- Ratte (1:200)

Tabelle 5: Liste der verwendeten Antikörper und ihrer Färbebedingungen

2.2.34 Periodsäure-Schiff (PAS)-Färbung

Die Schnitte wurden zuerst in Xylol (2x 10 min), danach in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (100%, 96%, 70%, jeweils 5 min) und in H₂O überführt. Die Färbung erfolgte durch Inkubation in Periodsäure (10 min), Leitungswasser (5 min) und Schiff-Reagenz (20 min). Es wurde 2 min mit Hämatoxylin nach Meyer gegengefärbt, 5 min in Leitungswasser gebläut, die Schnitte in eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 2x100%, jeweils 5 min) und Xylol (2x 10 min) überführt und schließlich mit „DPX“ eingedeckt.

2.2.35 Lasermikrodissektion von Gewebe aus Paraffinschnitten

Von den Paraffinblöcken von Interesse wurden Schnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgezogen, die mit einer PEN-Membran beschichtet waren und vorher 30 min mit UV-Licht bestrahlt wurden. Anschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und bei Raumtemperatur getrocknet. Die entsprechenden Areale des Gewebes wurden am Laserdisektionsmikroskop ausgeschnitten, direkt in Lysispuffer überführt und 24 h bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben 12 min bei 95°C inkubiert und konnten danach für eine PCR verwendet werden.

Zellkultur

2.2.36 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, in Medium überführt und 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in der entsprechenden Menge Medium aufgenommen und ausplattiert.

2.2.37 Mediumwechsel

Je nach Zelllinie wurde das Medium alle 1-2 Tage erneuert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und es wurde neues Medium auf die Zellen gegeben.

2.2.38 Splitten von Zellen

Sobald eine gewisse Zelldichte erreicht war, wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Durch Zugabe von Trypsin und dreiminütiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen von der Platte gelöst. Die Trypsinisierung wurde durch Zugabe eines äquivalenten Volumen Mediums gestoppt, die Zellen in ein Blaukappenröhrchen pipettiert und 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der

Überstand wurde abgenommen, die Zellen in Medium resuspendiert und in der gewünschten Dichte neu ausgesät.

2.2.39 Zählen von Zellen

Zum Zählen wurde ein Tropfen der Zellsuspension vor dem Zentrifugieren in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die dort gezählten Zellen (X) entsprechen einer Zellzahl von $X \times 10^4/\text{ml}$. So konnte die gewünschte Zellzahl nach dem Zentrifugieren eingestellt und die Zellen entsprechend ausplattiert werden.

2.2.40 Einfrieren von Zellen

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine dreiminütige Inkubation der Zellen mit Trypsin bei 37°C. Die Trypsin-Reaktion wurde mit einem äquivalenten Volumen Medium abgestoppt, die Zellen in ein Blaukappenröhrchen überführt und 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen aufgeschnippt, in 500 µl Einfriermedium (FCS mit 10%DMSO) aufgenommen und bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die gefrorenen Zellen in flüssigen Stickstoff transferiert.

2.2.41 Gelatinisieren von Zellkulturschalen und -platten

Sowohl die Zellkulturschalen als auch die Platten für die Kultur von Keimzellen und *Sl/Sl⁴mSCF220* wurden vor ihrer Verwendung mit 0,1%iger Gelatinelösung benetzt. Diese wurde einige Minuten inkubiert und schließlich wieder abgesaugt.

2.2.42 Handhabung von *Sl/Sl⁴mSCF220*

Sl/Sl⁴mSCF220-Zellen dienen den Keimzellen als Nährzellen. Diese Zellen exprimieren membran-gebundenen Stammzellularfaktor, der für das Überleben der Zellen von entscheidender Bedeutung ist (Matsui et al. 1991). Um die Keimzellen auf den Nährzellen halten zu können, müssen diese teilungsunfähig gemacht werden, damit sie die Keimzellen nicht überwachsen. Dies geschah durch Bestrahlung mit einer Energiedosis von 15 Gy bei einer Dosisleistung von 2 Gy/min.

Anschließend wurden die Zellen in Portionen zu 4×10^6 Zellen/Röhrchen eingefroren. Die Nährzellen wurden jeweils einen Tag vor den Keimzellen aufgetaut und ausplattiert.

2.2.43 Keimzellkultur

Die Keimzellen wurden aus Embryonen am Tag 12,5 der Embryonalentwicklung isoliert. Dazu wurden die Genitalfalten der Embryonen präpariert und mit 0,05%igem Trypsin 10 min bei 37°C verdaut bis eine Zellsuspension entstand. Die Zellen wurden mit der Mundpipette vereinzelt und auf eine 6-well-Platte ausgesät (1 Embryo pro Well), die eine Schicht *Sl/Sl⁴mSCF220*-Zellen enthielt.

2.2.44 Transfektionen von HepG2

Einen Tag vor der Transfektion wurden die HepG2-Zellen mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Loch auf einer 24-well-Platte ausgesät. Jede Transfektion wurde in Triplets angesetzt. Zum Transfizieren wurde Lipofectamine 2000 verwendet. 200 ng Reporterplasmid, 200 ng Expressionsplasmid und 20 ng interner Standard (in diesem Fall CMV-Renilla) wurden mit jeweils 50 µl MEM-Medium ohne FCS gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ebenso wurden 2 µl Lipofectamine 2000 mit 50 µl MEM-Medium ohne FCS gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden beide Proben gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 500 µl frischem Medium/Loch versetzt und das Lipofectamine-DNA-Gemisch zugegeben. Der Luziferase-Assay erfolgte nach 48 Stunden. Jede Transfektion wurde drei Mal wiederholt.

2.2.45 Luziferase-Assay

Hierzu wurde das „Dual Luciferase Reporter Assay System“ der Firma Promega verwendet. Es wurde nach Herstellerprotokoll verfahren.

48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, mit 100 µl Lysispuffer/well versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die lysierten Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, 10 µl des Lysats auf eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert und im Luminometer bei 562 nm gemessen. Die erhaltenen Werte für Firefly-Luziferase wurden auf die Werte für Renilla-Luziferase bezogen. Die Werte der Leerplasmidkontrollen wurden gleich 1 gesetzt.

2.2.46 Alkalische Phosphatase-Färbung von Zellen

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung mit dem „Vectastain Alkaline Phosphatase Substrate Kit III“. Zu 5 ml 100 mM Tris-HCl pH 8,5 wurden 2 Tropfen Lösung A zugegeben und

geschüttelt. Anschließend wurden 2 Tropfen Lösung B zugegeben und geschüttelt. Das gleiche erfolgte für Lösung C. Die so hergestellte Färbelösung wurde auf die Zellen gegeben und 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 4%iger neutral gepufferter Formaldehydlösung fixiert und konnten so aufbewahrt werden.

3. Ergebnisse

3.1 Die Expression von AP-2 γ

3.1.1 Allgemeine Expressionsanalysen

AP-2 γ wird während der Embryonalentwicklung in einer Reihe von Geweben exprimiert (s. Kap. 1.2.4). Dabei wurden die Embryonalstadien allerdings nicht im Totalpräparat untersucht, sondern es wurden Schnitte betrachtet (Chazaud et al. 1996). Über die Expression im adulten Tier sind bisher nur Daten bekannt, die auf der Hybridisierung einer RT-PCR, einer sehr sensitiven Methode, beruhen (Oulad-Abdelghani et al. 1996).

Um einen genaueren Eindruck von der Expression von *AP-2 γ* sowohl während der Embryogenese als auch im adulten Tier zu bekommen, wurden zuerst Northern Blot-Analysen durchgeführt. Zum einen wurde ein Northern Blot verwendet, der embryonale RNA der verschiedenen Stadien der Embryogenese (Tag 4,5 bis Tag 18,5 der Embryonalentwicklung) enthält (Abb. 12), zum anderen wurde eine Membran verwendet, auf der RNA verschiedener Organe einer adulten Maus geblottet ist (Abb. 13). Diese beiden Membranen wurden mit einer spezifischen *AP-2 γ* -Sonde, die einen Teil der cDNA (Base 180-618, entspricht Teilen von Exon 1 und 2) des unter den AP-2-Proteinen am wenigsten konservierten 5'-Bereiches enthält, hybridisiert.

Im Embryo lässt sich die *AP-2 γ* -Expression in allen untersuchten Stadien nachweisen. Besonders stark ist die Expression an den Tagen E7,5 bis E9,5 (Abb. 12 A). Allerdings ist hier neben der embryonalen RNA auch RNA extraembryonaler Gewebe vorhanden, was für die starke *AP-2 γ* -Expression mitverantwortlich ist, da *AP-2 γ* genau an diesen Tagen im extraembryonalen Gewebe exprimiert wird (Shi und Kellems 1998; Werling und Schorle 2002). In den folgenden Stadien, die nur embryonales Gewebe enthalten, sieht man ein Signal für *AP-2 γ* von Tag 10,5 bis Tag 18,5 der Embryonalentwicklung (Abb. 12 A). *AP-2 γ* wird also während der gesamten Embryogenese in der Maus exprimiert, allerdings hat man keinen Aufschluss darüber, in welchen Zellen die Expression stattfindet.

Abbildung 12 B zeigt ein Ethidiumbromid-gefärbtes Gel der verwendeten RNA als Ladekontrolle.

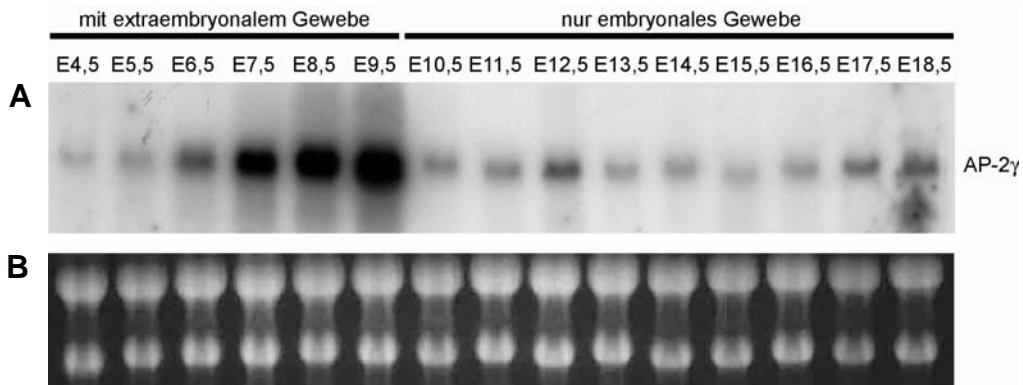


Abbildung 12: **Zeitliches Expressionsmuster von AP-2 γ während der murinen Embryonalentwicklung**

„Embryo Stage“ Northern Blot hybridisiert mit einer spezifischen AP-2 γ -Sonde
(A) Autoradiogramm des Northern Blots, der RNA der Stadien E4,5 bis E18,5 enthält; **(B)** Foto des Ethidiumbromid-gefärbten RNA-Gels zur Bestimmung der aufgetragenen RNA-Menge und Qualität

Im adulten Tier ist die Expression von AP-2 γ lediglich in der Plazenta eines 17,5 Tage alten Embryos nachweisbar. In allen anderen untersuchten Organen konnte keine AP-2 γ -Expression detektiert werden (Abb. 13 A). Abbildung 13 B zeigt ein Ethidiumbromid-gefärbtes Gel der verwendeten RNA als Ladekontrolle.



Abbildung 13: **Räumliches Expressionsmuster von AP-2 γ im adulten Tier**

„Multiple Tissue“ Northern Blot hybridisiert mit einer spezifischen AP-2 γ -Sonde
(A) Autoradiogramm des Northern Blots, der RNA verschiedener adulter Gewebe der Maus enthält; **(B)** Foto des Ethidiumbromid-gefärbten RNA-Gels zur Bestimmung der aufgetragenen RNA-Menge und Qualität

3.1.2 Zelltyp-spezifische Expressionsanalysen

Um das zelltyp-spezifische Expressionsmuster von *AP-2 γ* weiter zu untersuchen, wurden *In Situ* Hybridisierungen von Embryonen (Abb. 14) und immunhistochemische Analysen auf Paraffinschnitten (Abb. 15) durchgeführt.

Zur *In Situ* Hybridisierung wurde die gesamte cDNA (2,8 kb) von *AP-2 γ* in RNA umgeschrieben und zur Hybridisierung verwendet. Abbildung 14 A-I zeigt die Ergebnisse der *In Situ* Hybridisierungen mit der „antisense“-Sonde, der Embryo in Abbildung 14 J wurde als Kontrolle mit der „sense“-Sonde hybridisiert.

Am Tag 7,5 der Embryonalentwicklung sieht man unter anderem ein Signal für *AP-2 γ* an der Basis der Allantois (Abb. 14 A, Schere) und zwar genau in dem Bereich, in dem sich die Keimzellen zu diesem Zeitpunkt befinden. Um dieses Signal näher zu verifizieren, wurde dieser Bereich ausgeschnitten, RNA isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Zusätzlich zu *AP-2 γ* wurden auch die zu diesem Zeitpunkt in den Keimzellen exprimierten Gene *Kit* und *Dnd1* untersucht (Abb. 14 B). Alle drei Gene sind in dem ausgeschnittenen Bereich nachweisbar, weshalb man davon ausgehen kann, dass es sich tatsächlich um die Keimzellregion handelt. Am Tag 8,75 der Embryonalentwicklung lässt sich *AP-2 γ* in den Keimzellen detektieren. Diese befinden sich zu diesem Zeitpunkt bereits auf ihrer Wanderung entlang des Enddarms (Abb. 14 C, Pfeil). Auch mit Erreichen der Genitalanlagen am Tag 10,5 der Embryonalentwicklung, exprimieren die Keimzellen weiter *AP-2 γ* . Man sieht hier, dass *AP-2 γ* nicht nur in den Keimzellen, sondern auch in den Gliedmaßenknospen exprimiert wird (Abb. 14 D). Die Expression ist auch am Tag E11,5 detektierbar (Abb. 14 E) und hält bis zum Tag E16,5 (ältestes untersuchtes Stadium, Abb. 14 E-I) an.

Da sich die weitere Keimzellentwicklung nach der sexuellen Differenzierung zwischen den Geschlechtern unterscheidet, wurden am Tag E13,5 und E16,5 beide Geschlechter untersucht. Die Keimzellen der Männchen verbleiben nach der sexuellen Differenzierung in einem mitotischen Arrest, der bis zur Geburt andauert, erst dann wird die Meiose eingeleitet. Die Keimzellen der Weibchen hingegen durchlaufen die Stadien der Meiose bis zum Diplotän-Stadium und werden hier arretiert. Sind Gene in Männchen und Weibchen zu diesen Zeitpunkten unterschiedlich exprimiert, ist das ein Anzeichen dafür, dass es sich um für die Meiose relevante Gene handelt. Dies war bei *AP-2 γ* jedoch nicht der Fall. Sowohl am Tag E13,5 als auch am Tag E16,5 ließ sich *AP-2 γ* in den Gonaden beider Geschlechter nachweisen (Abb. 14 F-I).

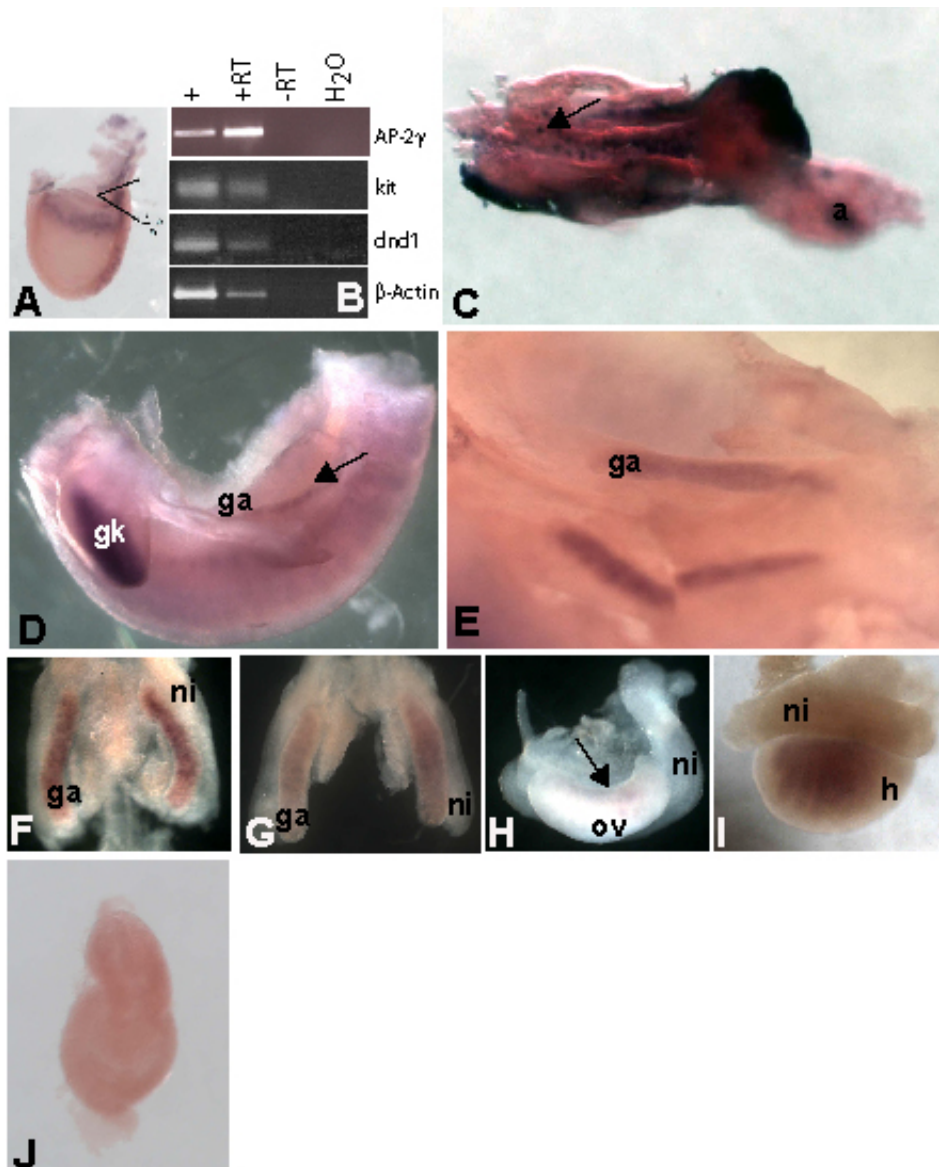


Abbildung 14: Räumliches Expressionsmuster von AP-2 γ während der Embryonalentwicklung

In Situ Hybridisierung mit einer AP-2 γ -spezifischen Sonde; (A)-(I) Hybridisierung mit der „antisense“-Sonde; (A) E7,5; die Schere markiert den ausgeschnittenen und AP-2 γ -positiven Bereich; (B) RT-PCR des in (A) ausgeschnittenen Bereiches für die Gene AP-2 γ , Kit und Dnd1; β -Actin dient als Kontrolle; +: Positivkontrolle; (C) E8,5; der Pfeil markiert die AP-2 γ -positiven Keimzellen auf ihrer Wanderung im Bereich des Enddarms; (D) E10,5; Die Keimzellen sind in den Genitalanlagen angekommen und positiv für AP-2 γ (Pfeil); (E) E11,5; Die Keimzellen in den Genitalanlagen sind AP-2 γ -positiv; (F) Weibliche Genitalanlage am Tag 13,5 der Embryonalentwicklung positiv für AP-2 γ ; (G) Männliche Genitalanlage am Tag 13,5 der Embryonalentwicklung positiv für AP-2 γ ; (H) E16,5 Tage altes Ovar; der Pfeil zeigt die Färbung für AP-2 γ ; (I) E16,5 Tage alter Hoden; die bereits sichtbaren Samenkanälchen sind AP-2 γ -positiv; (J) E7,5; Hybridisierung mit der „sense“-Sonde zur Kontrolle der Spezifität der „antisense“-Sonde

a: Allantois; ga: Genitalanlage; gk: Gliedmaßenknospe; h: Hoden; ni: Niere; ov; Ovar

Um die Expression von *AP-2 γ* in den Keimzellen nicht nur auf RNA- sondern auch auf Proteinebene zu verifizieren, wurden Paraffinschnitte durch die Genitalanlagen von Embryonen verschiedenerer Stadien mit einem *AP-2 γ* -spezifischen Antikörper gefärbt. Die Expression von *AP-2 γ* lässt sich in den Kernen der Keimzellen als braune Färbung von Tag 11,5 bis Tag 16,5 der Embryonalentwicklung nachweisen (Abb. 15 A-F).

In adulten Hoden und Ovarien konnte keine Expression nachgewiesen werden (Abb. 15 G, H), was sich mit den Ergebnissen der Northern Blot Analysen deckt.

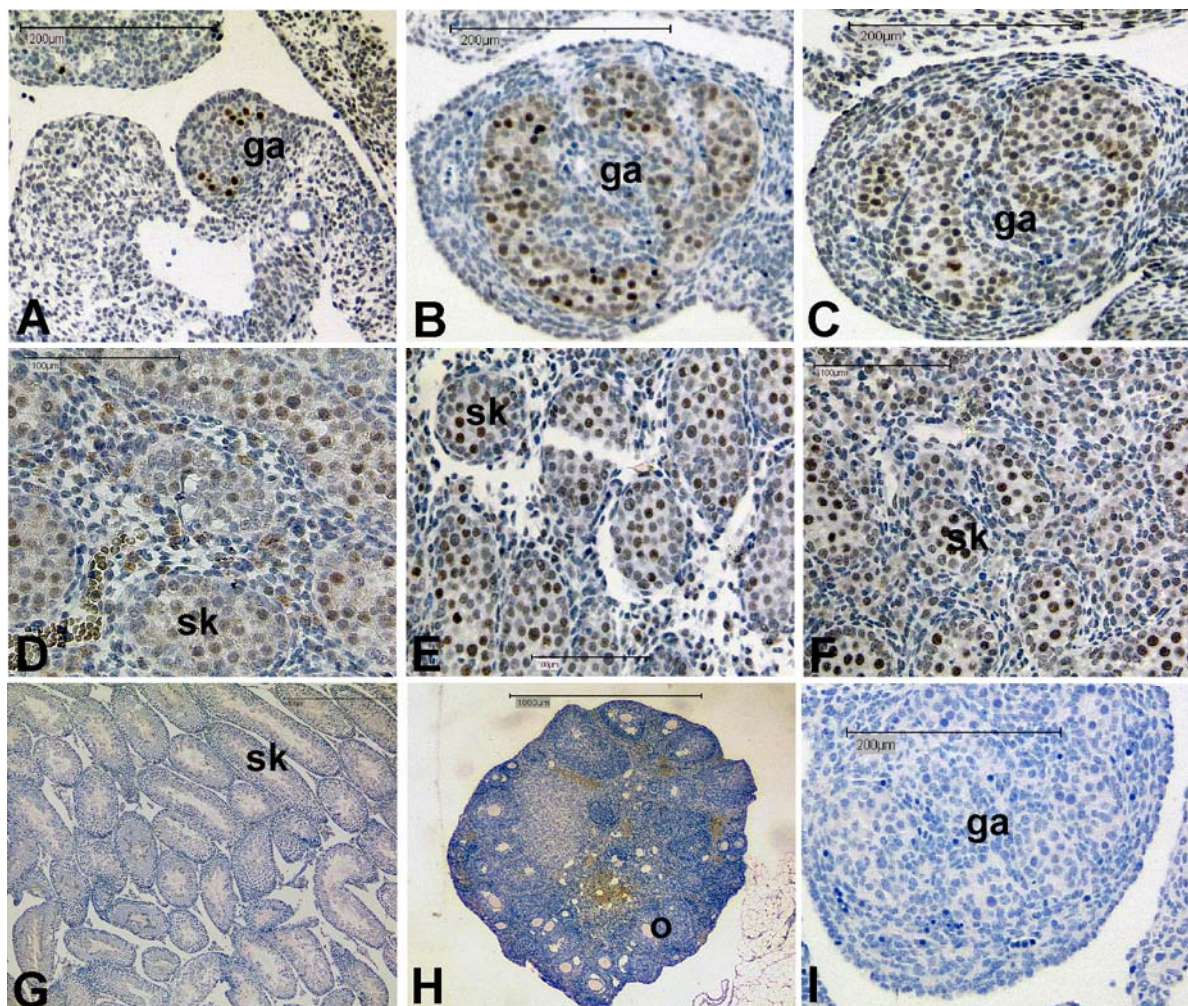


Abbildung 15: *AP-2 γ* -Expression auf Proteinebene

Antikörperfärbung von Paraffinschnitten mit einem spezifischen *AP-2 γ* -Antikörper; Schnitte durch die Genitalanlagen von (A) E11,5; (B) E12,5; (C) E13,5; (D) E14,5; (E) E15,5; (F) E16,5, Tage alten Embryonen; (G) Hoden, adult; (H) Ovar, adult; (I) Kontrolle ohne Primärantikörper
ga: Genitalanlage; o: Oozyte; sk: Samenkanälchen

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass *AP-2 γ* während der Embryogenese unter anderem in den Keimzellen exprimiert wird. Um die Funktion des Gens genauer zu untersuchen, wurde ein Mausmodell verwendet, in dem *AP-2 γ* gezielt ausgeschaltet wurde. Frühere Arbeiten konnten bereits zeigen, dass es bei Ablation des *AP-2 γ* -Gens zu einem frühen embryonal letalen Defekt kommt (Werling und Schorle 2002). Deshalb wurde ein Mausmodell entwickelt, in dem *AP-2 γ* durch das Cre/LoxP-System nachträglich ausgeschaltet wird (Werling und Schorle 2002). So kann der plazentare Phänotyp umgangen werden und es ist möglich, die Funktion von *AP-2 γ* sowohl allgemein als auch zelltypspezifisch im Tier zu untersuchen.

3.2 AP-2 γ -konditional-defiziente Tiere

3.2.1 Verpaarungsschema

Zur Erlangung konditional-defizienter *AP-2 γ* -Mäuse wurde folgendes Verpaarungsschema verwendet:

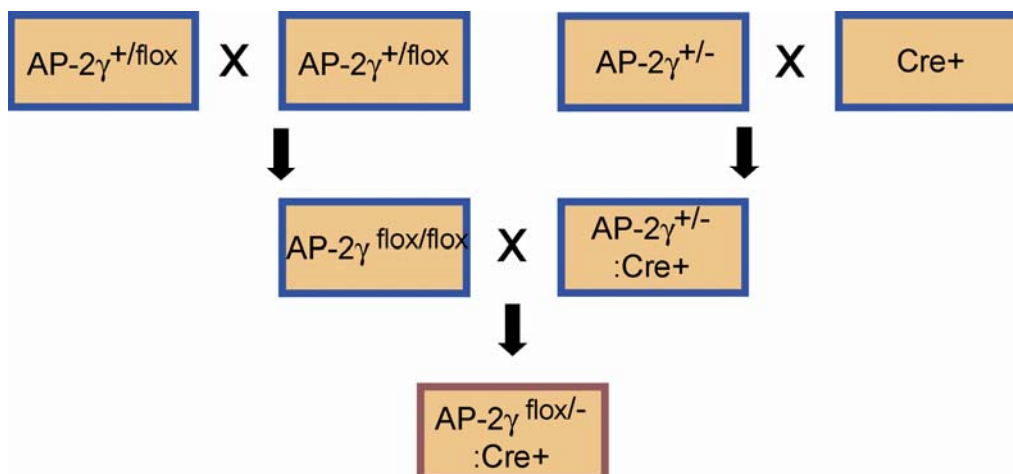


Abbildung 16 **Verpaarungsschema zur Erlangung *AP-2 γ* -konditional-defizienter Tiere**

$AP-2\gamma^{+/flox}$: heterozygot konditionale *AP-2 γ* -Tiere
 $AP-2\gamma^{+/-}$: heterozygote *AP-2 γ* Tiere
 $AP-2\gamma^{flox/flox}$: homozygot konditionale *AP-2 γ* -Tiere
 $Cre+$: Cre-exprimierende Tiere

Heterozygot konditionale AP-2 $\gamma^{+/flox}$ Mäuse ($\gamma^{+/flox}$) wurden untereinander verpaart, um homozygote AP-2 $\gamma^{flox/-}$ ($\gamma^{flox/flox}$) Mäuse zu erhalten. In einer anderen Verpaarung wurden heterozygote AP-2 γ -Tiere ($\gamma^{+/-}$) mit Cre-exprimierenden Tieren (Cre+) verpaart. Aus dieser Verpaarung erhält man zu 25% Nachkommen, die sowohl positiv für das Allel der Cre-Rekombinase als auch heterozygot für AP-2 γ sind ($\gamma^{+/-}$; Cre+). Diese Tiere wurden mit den homozygoten AP-2 γ^{flox} -Tieren ($\gamma^{flox/flox}$) verpaart, woraus sich für die Nachkommen wieder eine Frequenz von 25% für Tiere ergibt, die sowohl das Allel für die Cre-Rekombinase tragen, als auch ein AP-2 γ^{flox} und ein AP-2 γ^{-} -Allel ($\gamma^{flox/-}$; Cre+). Durch die Aktivität der Cre-Rekombinase wird in diesen Tieren das Exon 5, welches von LoxP-Sequenzen flankiert ist, ausgeschnitten und man erhält nachträglich AP-2 γ -defiziente Tiere (Abb. 16).

3.2.2 Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde eine PCR durchgeführt, in der durch die Kombination von drei Primern sowohl das AP-2 γ^{+} -Allel, als auch das AP-2 γ^{flox} -Allel und das AP-2 γ^{-} -Allel nachgewiesen werden können (Werling und Schorle 2002). Mit dem Primerpaar „In4down“ und „Ex5up“ werden das AP-2 γ^{+} -Allel und das AP-2 γ^{flox} -Allel detektiert. Beim AP-2 γ^{+} -Allel lässt sich ein Amplifikat mit einer Größe von 300 bp nachweisen, beim AP-2 γ^{flox} -Allel entsteht aufgrund der integrierten LoxP-Sequenz ein Amplifikat mit einer Größe von 343 bp. Zwischen den Primern „In4down“ und „Ex6up“ entsteht kein Produkt, da die Elongationszeit der PCR nicht ausreicht. Ein Produkt mit einer Länge von 700 bp basierend auf den Primern „In4down“ und „Ex6up“ entsteht nur, wenn das Exon 5 durch die Aktivität der Cre-Rekombinase ausgeschnitten und so der Abstand zwischen den beiden Primerbindestellen verringert wurde (Abb. 17).

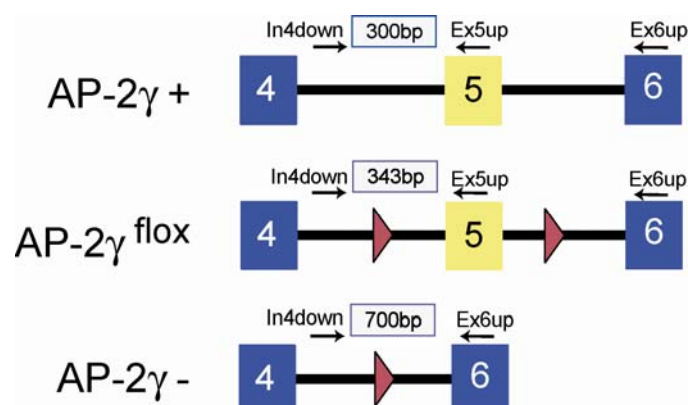


Abbildung 17: Schematische Darstellung der AP-2 γ -Genotypisierung

Diese PCR erlaubt es, alle möglichen Genotypen, die durch die Verpaarungen entstehen können, nachzuweisen.

Zum Nachweis der Cre-Rekombinase wurde eine PCR durchgeführt, die bei Vorhandensein des Cre-Gens ein Amplifikat mit einer Größe von 373 bp ergibt. Abbildung 18 veranschaulicht die erhaltenen Amplifikate.

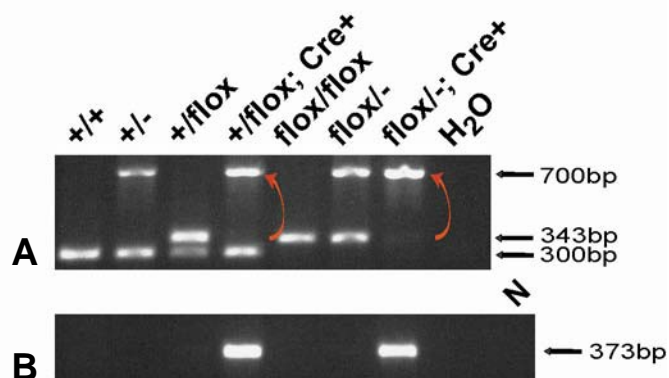


Abbildung 18: **Ergebnisse der Genotypisierungs-PCRs**

(A) PCR für AP-2 γ ; der rote Pfeil veranschaulicht die Cre-vermittelte Exzisionsreaktion; (B) PCR für Cre; N: Negativkontrolle

AP-2 γ ^{+/+}-Tiere zeigen lediglich eine Bande bei 300 bp. Bei heterozygoten Tieren, die über ein AP-2 γ ⁺- und ein AP-2 γ ⁻-Allel verfügen, sind zwei Banden sichtbar, eine mit einer Größe von 300 bp und eine mit einer Größe von 700 bp. AP-2 γ ^{+flox}-Tiere zeigen aufgrund der inserierten LoxP-Sequenz in einem Allel sowohl eine Bande bei 300 bp, als auch eine Bande bei 343 bp. Tiere, die neben dem AP-2 γ ⁺- und dem AP-2 γ ^{flox}-Allel die Cre-Rekombinase exprimieren, zeigen eine Bande bei 300 bp und eine Bande bei 700 bp, da durch die Cre-Aktivität das Exon 5 ausgeschnitten wird und so ein AP-2 γ ⁻-Allel entsteht (Abb. 18, roter Pfeil). Bei homozygoten AP-2 γ ^{flox/flox}-Tieren erhält man nur eine Bande mit einer Größe von 343 bp. Bei Tieren, die das AP-2 γ ^{flox}-Allel und das AP-2 γ ⁻-Allel tragen, lässt sich ein Amplifikat mit einer Größe von 343 bp und einer Größe von 700 bp nachweisen. Ist bei diesen Tieren zusätzlich die Cre-Rekombinase aktiv, ist das AP-2 γ ^{flox}-Allel nicht mehr detektierbar, man erhält lediglich eine Bande mit einer Größe von 700 bp, die dem AP-2 γ ⁻-Allel entspricht (Abb. 18, roter Pfeil).

Zum einfacheren Verständnis wird in Zukunft ein durch Cre-Exzision generiertes Nullallel als „ Δ “ bezeichnet. Dementsprechend bezeichnet der Begriff „flox“ ein Allel in dem das von LoxP-Sequenzen flankierte Exon 5 noch vorhanden ist. „-“ bezeichnet ein Nullallel, welches bereits in der embryonalen Stammzelle vor der Blastozysteninjektion generiert wurde und „+“ ein Wildtyp-Allel.

Neben den AP-2 γ Δ /- Tieren wurden auch Tiere aller anderen möglichen Genotypen, die aus den Verpaarungen (Abb. 16) resultieren können, untersucht. Dabei konnten, außer in den AP-2 γ Δ /- Tieren, keinerlei Auffälligkeiten festgestellt werden, die Tiere entwickelten sich normal und waren fertil.

3.2.3 Der ubiquitäre Phänotyp

Erste Analysen wurden mit AP-2 γ ^{flox}-Tieren durchgeführt, die mit ubiquitär exprimierenden Cre-Mäusen verpaart wurden. Bei diesen Mäusen wurde das Gen für die Cre Rekombinase in den Mox2-Lokus eingebracht, so dass diese Tiere auf einem Allel Cre anstelle von Mox2 exprimieren, was zu einer ubiquitären Cre-Expression im Embryo, aber nicht in den extraembryonalen Geweben, ab Tag 6 der Embryonalentwicklung, führt (Tallquist und Soriano 2000). Dadurch ist es möglich, den Implantationsdefekt, der bei AP-2 γ -defizienten Tieren zu deren Tod führt, zu umgehen und adulte AP-2 γ -Nullmutanten (Δ /-) zu erhalten. Die Nullmutanten, die aus der Verpaarung mit Mox2Cre-Tieren hervorgehen, werden im Folgenden als „AP-2 γ Δ /-:M“ bezeichnet, wobei „M“ für Mox2Cre steht.

3.2.3.1 Makroskopie

AP-2 γ Δ /-:M Tiere entwickeln sich normal und zeigen äußerlich keinerlei Auffälligkeiten. Allerdings sind sowohl Männchen als auch Weibchen steril. Makroskopisch fällt auf, dass die Hoden und die Ovarien stark größenretardiert sind (Abb. 19).

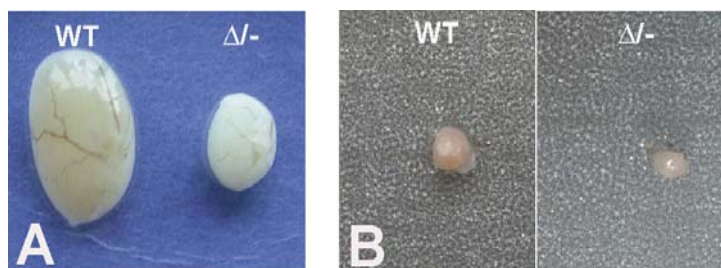


Abbildung 19: **Makroskopisches Bild der Gonaden von AP-2 γ Δ /-:M Tieren**
(A) Hoden; (B) Ovarien

3.2.3.2 Histologie

Die Gonaden der AP-2 γ Δ /-:M unterscheiden sich nicht nur makroskopisch, auch mikroskopisch sind die Unterschiede deutlich sichtbar.

In einem Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnitt durch den Hoden eines adulten AP-2 γ ^{+/*flox*}-Tieres sind alle im Hoden vorkommenden Zellpopulationen klar erkennbar (Abb. 20 A). Die Samenkanälchen sind als runde Strukturen sichtbar. An der Basallamina der Kanälchen befinden sich die Spermato gonien, die in das Lumen der Kanälchen hinein zu Spermato tiden differenzieren. Alle Keimzellstadien der Spermato genese sind vorhanden. Zwischen den Spermato gonien sitzen die Sertolizellen. Die Leydigzellen sind als Anordnung von Dreiecken zwischen den Samenkanälchen sichtbar (Abb. 20 A).

Im histologischen Schnitt durch Hoden adulter AP-2 γ Δ /-:M Mäuse sind die Samenkanälchen in ihrer Größe stark retardiert (Abb. 20 B; schwarzer Pfeil) und von großen Populationen an Leydigzellen umgeben. Viele Kanälchen erscheinen leer, in einigen sind im Lumen Zellaggregate erkennbar.

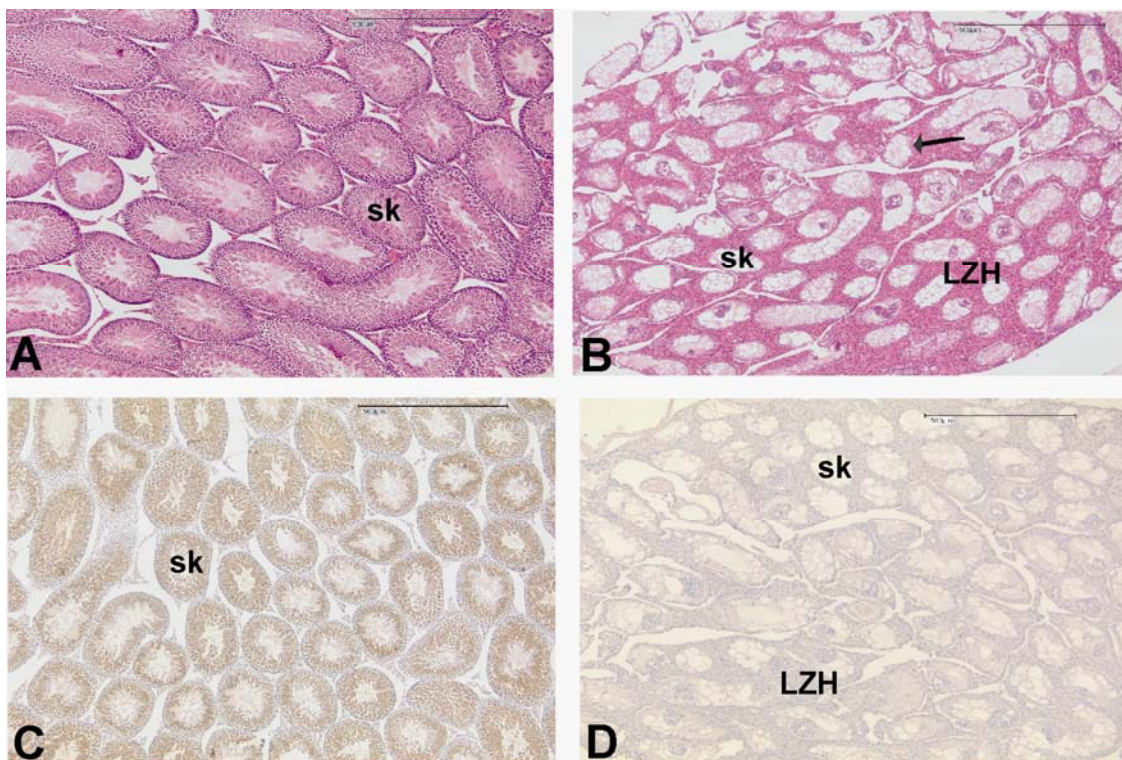


Abbildung 20: **Phänotyp der AP-2 γ Δ /-:M Hoden**
(A) H/E-Färbung eines adulten AP-2 γ ^{+/*flox*} Hodens; **(B)** H/E-Färbung eines adulten AP-2 γ Δ /-:M Hodens mit atrophisierten Samenkanälchen (schwarzer Pfeil); **(C)** MSY2-Färbung eines adulten AP-2 γ ^{+/*flox*} Hodens; **(D)** MSY2-Färbung eines adulten AP-2 γ Δ /-:M Hodens
 LZH: Leydig-Zell-Hyperplasie; sk: Samenkanälchen

Um festzustellen, ob in diesen Hoden noch Keimzellen vorhanden sind, die auf dem Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnitt nicht zu erkennen sind, wurden Schnitte mit dem keimzellspezifischen Marker MSY2 gefärbt. MSY2 färbt in den Weibchen ab Tag 18,5 der Embryonalentwicklung und in den Männchen ab Tag 17 nach der Geburt das Zytoplasma der Keimzellen (Gu et al. 1998). Dieser Marker eignet sich besonders gut für die Analyse im adulten Tier, da er in keinem anderen Gewebe exprimiert wird.

Betrachtet man die immunhistochemische Analyse der Keimzellen mit MSY2, fällt auf, dass sich in den Hoden der AP-2 γ Δ /-:M Mäuse tatsächlich keine Keimzellen befinden, die Spermato-genese ist, im Vergleich zum Kontrolltier (Abb. 20 C) vollständig gestört (Abb. 20 D). Die Sertolizellen sind allerdings noch vorhanden. Dieses Phänomen wird als Keimzellaplasie oder „Sertoli-Cell-Only“-Syndrom bezeichnet und kann auch bei anderen Mäusen, die keine Keimzellen besitzen, beobachtet werden (Fotovati et al. 2006).

Betrachtet man im Vergleich die Ovarien der AP-2 γ Δ /-:M Tiere, so fallen auch hier Unterschiede zu den Kontrolltieren auf (Abb. 21).

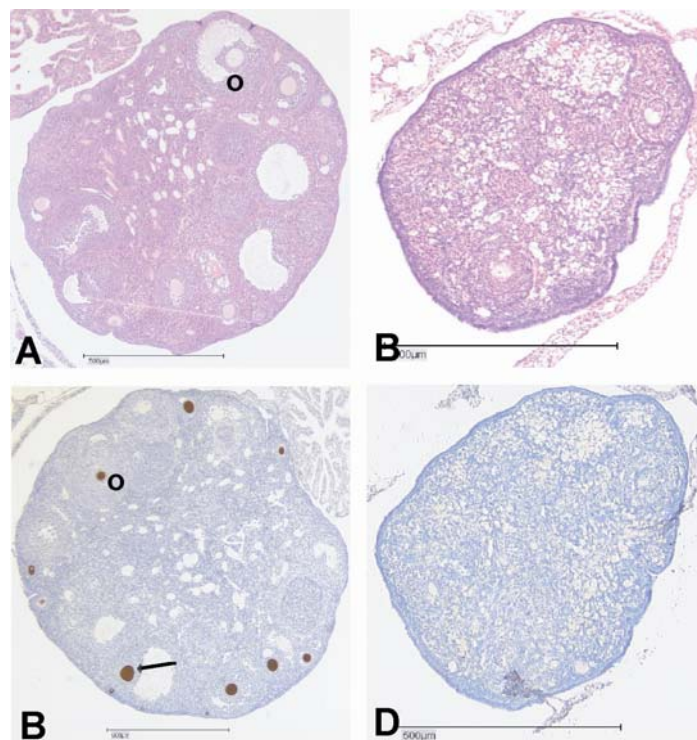


Abbildung 21: **Phänotyp der AP-2 γ Δ /-:M Ovarien**

(A) H/E-Färbung eines AP-2 γ ^{+flox} Ovars; (B) H/E-Färbung eines AP-2 γ Δ /-:M Ovars; (C) MSY2-Färbung eines AP-2 γ ^{+flox} Ovars mit braungefärbten Oozyten (schwarzer Pfeil); (D) MSY2-Färbung eines AP-2 γ Δ /-:M Ovars
o: Oozyte

Im Ovar einer adulten AP-2 γ ^{+/*flox*} Maus findet man Follikel aller Stadien (Abb. 21 A). Die Oozyten sind je nach Follikelstadium von unterschiedlich dicken Schichten an Granulosazellen umgeben. Betrachtet man dahingegen das Ovar einer adulten AP-2 γ Δ :-:M Maus, lassen sich dort keine Follikel oder Oozyten erkennen (Abb. 21 B). Die Zellen des Ovars wirken diffus, es ist keine klare Einteilung in Oozyten und Granulosazellen erkennbar. Auch hier wurden die Schnitte mit MSY2 gefärbt, um einen genauen Aufschluss über das Vorhandensein von Keimzellen zu bekommen (Abb. 21 C, D). In den AP-2 γ ^{+/*flox*}-Ovarien sieht man eine deutliche Braunfärbung der Oozyten (Abb. 21 C), die in den Ovarien der mutanten Tiere fehlt (Abb. 21 D), woraus man schließen kann, dass auch hier, analog zum Hoden, keine Keimzellen vorhanden sind.

Allerdings gibt es sowohl bei den pathologischen Phänotypen in den Ovarien als auch in den Hoden der AP-2 γ Δ :-:M Tiere große Unterschiede. Ein Beispiel hierfür ist Abbildung 22. Bei diesem Hodenpräparat findet man sowohl Bereiche, in denen Keimzellen vorhanden sind und die Spermatogenese korrekt abläuft, es finden sich aber auch Bereiche, in denen die Samenkanälchen vollständig atrophiert sind und sich keine Keimzellen mehr erkennen lassen. Dieses Phänomen wird auch als Mosaikphänotyp bezeichnet.

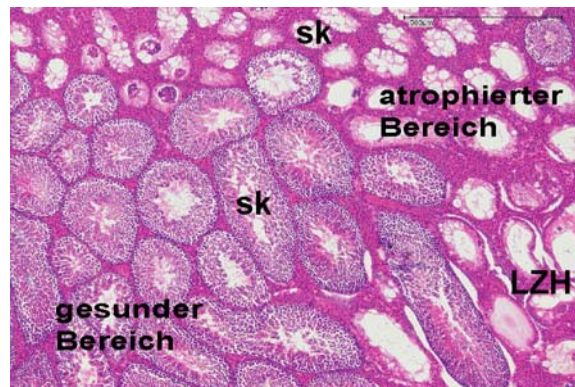


Abbildung 22: **Mosaikphänotyp eines AP-2 γ Δ :-:M Hodens**

H/E-Färbung

Sk: Samenkanälchen; LZH: Leydig-Zell-Hyperplasie

3.2.3.3 Nachweis der unvollständigen Cre-Exzision

Um zu verifizieren, ob die gesunden Bereiche innerhalb der AP-2 γ Δ /-:M Hoden auf eine unvollständige Aktivität der Cre-Rekombinase zurückzuführen sind oder durch den Verlust von AP-2 γ verursacht werden, wurden Samenkanälchen mit normaler Spermatogenese innerhalb der teilatrophierten Hoden mit Hilfe eines Laserdissektionsmikroskopes von einem Paraffinschnitt ausgeschnitten, daraus DNA isoliert und die für den AP-2 γ -Lokus spezifische PCR (s. Kap. 3.2.2) durchgeführt (Abb. 23).

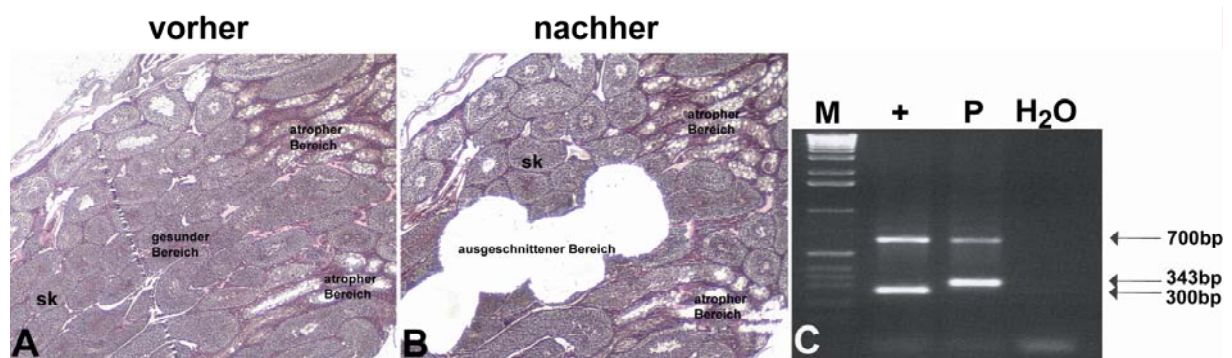


Abbildung 23: **Lasermikrodissektion der gesunden Samenkanälchen**

H/E-gefärbter Schnitt durch einen AP-2 γ Δ /-:M Hoden vor (A) und nach (B) der Mikrodissektion; (C) PCR-Ergebnis; +: Positivkontrolle; P: Probe des ausgeschnittenen Bereiches
sk: Samenkanälchen

Abbildung 23 zeigt einen Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnitt durch einen Hoden eines adulten AP-2 γ Δ /-:M Tieres vor und nach der Mikrodissektion (Abb. 23 A, B). Ein Teil des gesunden Bereiches wurde ausgeschnitten (Abb. 23 B). Die atrophierten Bereiche sind am rechten Bildrand klar zu erkennen. Da in der PCR neben dem AP-2 γ -Allel auch das AP-2 γ ^{flox}-Allel detektiert wird (Abb. 23 C), kann man davon ausgehen, dass die Cre-Exzision in den ausgeschnittenen Samenkanälchen nicht stattgefunden hat, da sonst die Bande für das AP-2 γ ^{flox}-Allel verschwunden wäre. Das bedeutet, dass der beobachtete Mosaikphänotyp nicht auf die Mutation zurückgeht, sondern hier eine unvollständige Cre-Exzision zugrunde liegt.

Der bei den AP-2 γ Δ /-:M Tieren beobachtete Phänotyp wird auch als Hypogonadismus bezeichnet. Damit bezeichnet man allgemein die Unterfunktion der Keimdrüsen. Beim Hypogonadismus unterscheidet man zwischen primärem und sekundärem Hypogonadismus. Der primäre Hypogonadismus ist direkt auf einen Defekt in den Gonaden zurückzuführen, wohingegen der sekundäre Hypogonadismus auf einen Defekt in einem übergeordneten Steuerungsorgan, wie dem Hypothalamus oder der Hypophyse hinweist.

3.2.3.4 Serumwerte der AP-2 γ Δ /-:M Tiere

Da die Cre-Exzision bei Verpaarung der AP-2 γ ^{flox} Tiere mit den Mox2Cre-Tieren nicht nur in den Keimzellen, sondern im gesamten Tier stattfindet, kann der beobachtete Phänotyp auch eine andere Ursache haben. Die Keimzellreifung und -erhaltung steht unter streng hormoneller Kontrolle durch das Hypothalamus-Hypophysen-System. Eine Störung in diesem System kann eine Keimzellaplasie hervorrufen. Eine Unterscheidung zwischen einem Defekt in den Zellen der Gonaden oder einem Defekt, der von der Hypophyse herrührt, kann durch die Untersuchung bestimmter Hormone im Serum gemacht werden.

Zu diesem Zweck wurde von Mutanten und Kontrollen Blut genommen, daraus Serum gewonnen und die Serumwerte für die Hormone FSH, LH und Testosteron in männlichen Tieren und FSH in weiblichen Tieren bestimmt. Für diese Analyse wurden nur Tiere herangezogen, die einen kompletten Keimzellverlust zeigten, was durch PCR und Histologie bestätigt wurde.

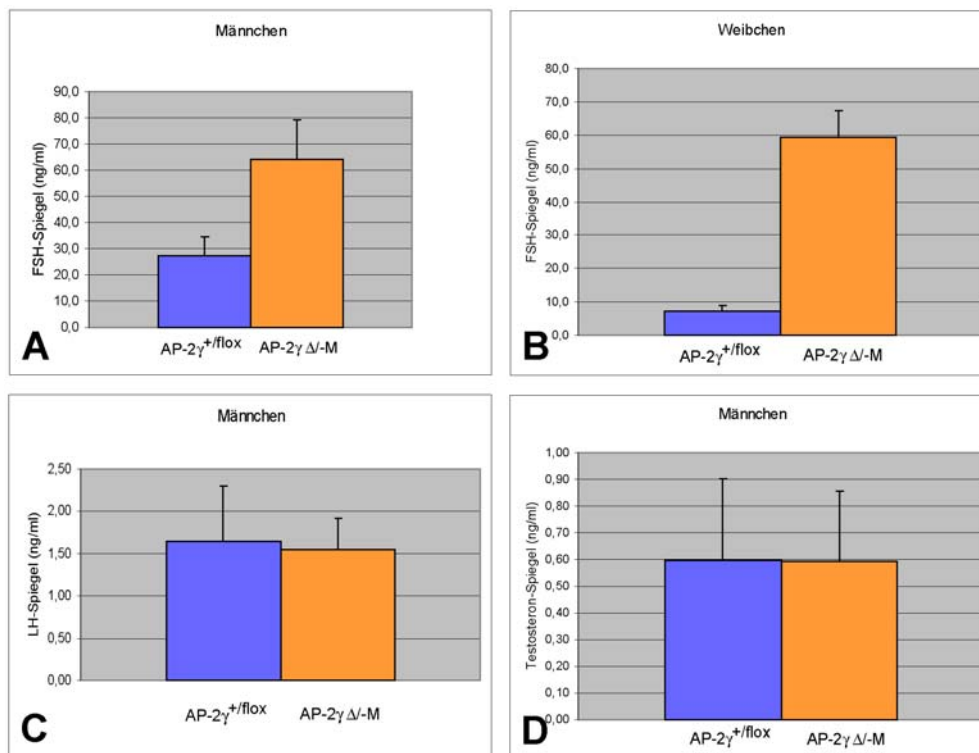


Abbildung 24: **Vergleich der Serumwerte der AP-2 γ ^{+/flox} und AP-2 γ Δ /-:M Tiere**
(A) FSH-Spiegel der Männchen; **(B)** FSH-Spiegel der Weibchen; **(C)** LH-Spiegel der Männchen; **(D)** Testosteron-Spiegel der Männchen;
 Blau: AP-2 γ ^{+/flox}; Orange: AP-2 γ Δ /-:M

Abbildung 24 zeigt, dass die FSH-Werte der Mutanten im Vergleich zu den Kontrolltieren in beiden Geschlechtern stark erhöht sind (Abb. 24 A, B), wohingegen LH und Testosteron in den Männchen unverändert sind (Abb. 24 C, D). Diese starke FSH-Erhöhung bei gleich bleibenden LH- und Testosteron-Werten ist typisch für einen primären Hypogonadismus, bei dem die Zellen der Gonaden direkt betroffen sind. Läge ein Defekt in einem übergeordneten Steuerungsorgan, also dem Hypothalamus oder der Hypophyse vor, wären die FSH-Werte erniedrigt, da von der Hypophyse kein FSH mehr ausgeschüttet werden würde.

3.2.4 Der Keimzell-spezifische Phänotyp

Um den gonadalen Phänotyp der $AP-2\gamma \Delta/-:M$ Tiere genauer zu untersuchen, wurde die Keimzell-spezifische Cre-Linie TNAP (=“tissue-non-specific-alkaline-phosphatase“)-Cre (Lomeli et al. 2000) in die $AP-2\gamma^{flox}$ -Linie eingekreuzt (s. Kap. 3.2.1.). Hierbei sollte untersucht werden, ob eine Keimzell-spezifische Ablation des $AP-2\gamma$ -Gens zu einem mit den Ergebnissen der Mox2Cre-Verpaarungen vergleichbaren Phänotyp führt.

Bei den TNAP-Cre-Mäusen wurde die für die Cre Rekombinase codierende Sequenz in den TNAP-Lokus eingebracht, was auf einem Allel zur Expression von Cre anstelle der Alkalischen Phosphatase führt. Dadurch wird Cre in ca. 60% der Keimzellen exprimiert. (Lomeli et al. 2000).

Die aus dieser Verpaarung resultierenden Mutanten werden in Folgenden als „ $AP-2\gamma \Delta/-:T$ “ bezeichnet, wobei „T“ für TNAP-Cre steht.

Keimzell-spezifische $AP-2\gamma$ -Mutanten entwickeln sich normal und zeigen äußerlich keinerlei Auffälligkeiten. Hoden und Ovarien sind jedoch stark größenretardiert und können mit den Ergebnissen aus der Verpaarung mit der Mox2Cre-Linie verglichen werden.

3.2.4.1 Histologie adulter Gonaden

Auch im histologischen Schnitt fallen Parallelen zu den $AP-2\gamma \Delta/-:M$ -Tieren auf.

Vergleicht man einen Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnitt durch den Hoden eines $AP-2\gamma^{+flox}$ Tieres mit dem Hoden eines $AP-2\gamma \Delta/-:T$ Tieres sieht man, dass die Samenkanälchen analog zu den $AP-2\gamma \Delta/-:M$ Tieren in ihrer Größe retardiert sind und leer erscheinen (Abb. 25 A, B). Auch hier ist eine große Population an Leydigzellen erkennbar, die sich um die Samenkanälchen ausgebreitet hat. Um den auftretenden Phänotyp näher zu analysieren wurden immunhistochemische Analysen mit mehreren Markern durchgeführt. Zuerst wurde wiederum der keimzell-spezifische Marker MSY2 verwendet, um das Vorhandensein von

Keimzellen zu überprüfen. Vergleicht man den Hoden eines Kontrolltieres mit dem einer Mutante, so fällt auf, dass in den Hoden der AP-2 γ Δ /:T Tiere keine Keimzellen vorhanden sind, wohingegen die Keimzellen im Kontrolltier eine starke Färbung aufweisen (Abb. 25 C, D). Des Weiteren wurden Marker für Sertoli- und Leydigzellen benutzt, um zu analysieren, inwieweit diese vorhanden sind.

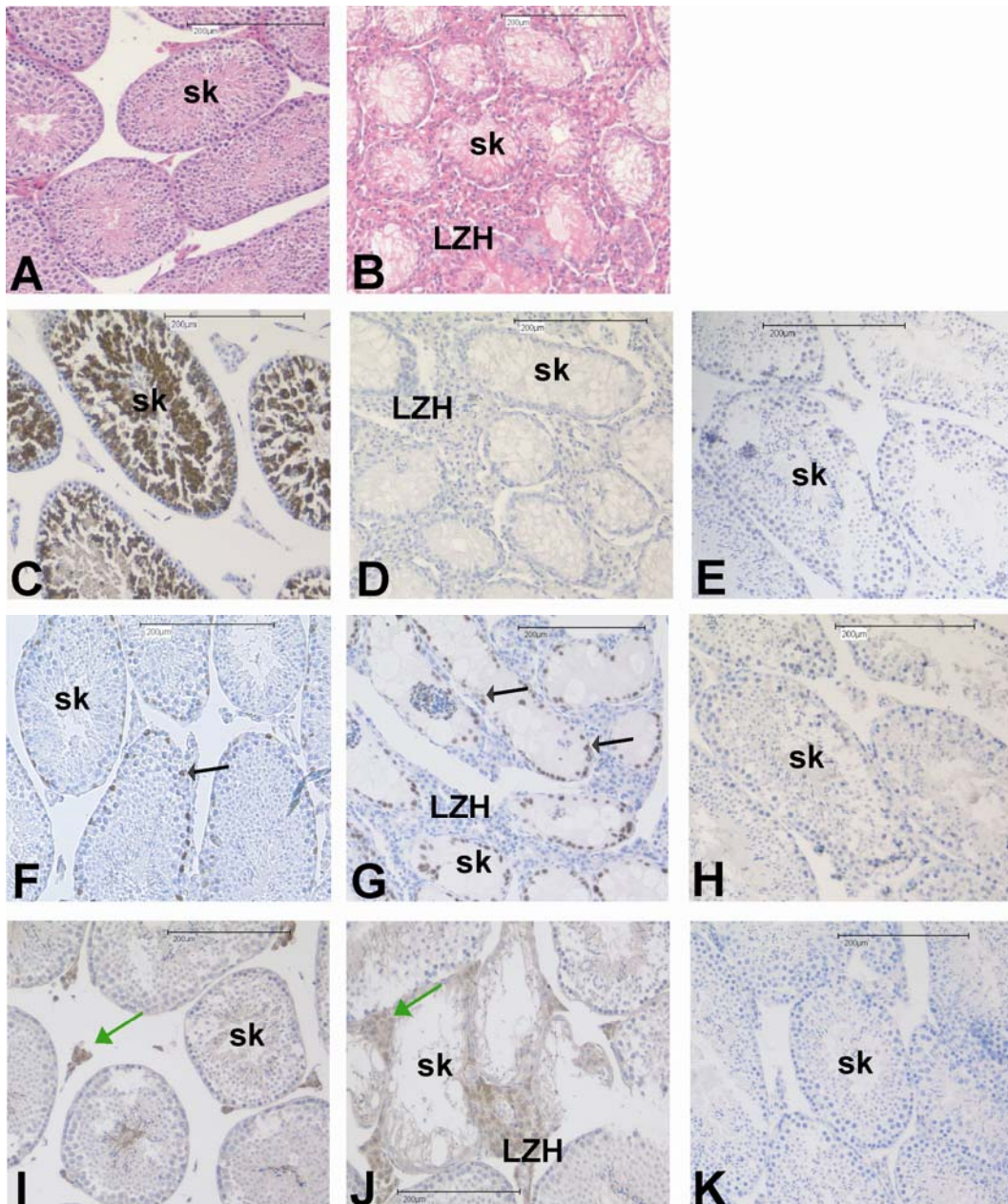


Abbildung 25: **Phänotyp der AP-2 γ Δ :-T Hoden**

(A) H/E-Färbung eines adulten AP-2 γ ^{+floX} Hodens; (B) H/E-Färbung eines adulten AP-2 γ Δ :-T Hodens mit atrophierten Samenkanälchen; (C) MSY2-Färbung eines adulten AP-2 γ ^{+floX} Hodens; (D) MSY2-Färbung eines adulten AP-2 γ Δ :-T Hodens; (E) MSY2-Kontrolle eines AP-2 γ ^{+floX} Hodens ohne Primärantikörper; (F) GATA-1-Färbung eines adulten AP-2 γ ^{+floX} Hodens; (G) GATA-1-Färbung eines adulten AP-2 γ Δ :-T Hodens; die schwarzen Pfeile markieren die GATA-1-positiven Sertolizellen; (H) GATA-1-Kontrolle eines AP-2 γ ^{+floX} Hodens ohne Primärantikörper; (I) nNos-Färbung eines adulten AP-2 γ ^{+floX} Hodens; (J) nNos-Färbung eines adulten AP-2 γ Δ :-T Hodens; die grünen Pfeile markieren die nNos-positiven Leydigzellen; (K) nNos-Kontrolle eines AP-2 γ ^{+floX} Hodens ohne Primärantikörper
LZH: Leydig-Zell-Hyperplasie; sk: Samenkanälchen

Die Färbung mit dem Sertoli-Zell-Marker GATA-1 (Yomogida et al. 1994) zeigt, dass sowohl in den Hoden der AP-2 γ ^{+floX}, als auch in den Hoden der AP-2 γ Δ :-T Tiere Sertolizellen in vergleichbarer Anzahl vorhanden sind (Abb. 25 F, G; schwarze Pfeile). In Abbildung 25 G sieht man im Lumen der atrophierten Kanälchen GATA-1-positive Zellen, was darauf hindeutet, dass die Sertolizellen bei Verlust des Keimepithels den Zellverband an der Basis des Kanälchens verlassen.

Als Marker für Leydigzellen wurde nNos verwendet (Wang et al. 2002). Im Hoden eines AP-2 γ ^{+floX} Tieres sieht man, dass die Leydigzellen in dreieckigen Gruppen zwischen den Samenkanälchen angeordnet sind (Abb. 25 I; grüner Pfeil). Vergleicht man dies mit der Mutante, fällt auf, dass die Leydigzellen hier vermehrt proliferieren und sich um die Samenkanälchen herum ausbreiten (Abb. 25 J; grüner Pfeil). Dieses Phänomen der Leydig-Zell-Hyperplasie tritt oft bei Keimzelldefekten in den Hoden auf (Holm et al. 2003).

Die Kontrolle ohne Primärantikörper ist in allen Fällen negativ (Abb. 25 E, H K).

Die Ovarien der AP-2 γ Δ :-T Tiere zeigen ein ähnliches Bild. Im Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnitt kann man hier allerdings nicht verifizieren, inwieweit in der Mutante Keimzellen vorhanden sind (Abb. 26 A, B), weswegen auch hier wieder der keimzell-spezifische Marker MSY2 verwendet wurde.

In der MSY2-Färbung des AP-2 γ ^{+floX} Ovars sieht man, dass viele Keimzellen vorhanden sind, die mit einer unterschiedlich dicken Schicht an Granulosazellen umgeben sind (Abb. 26 C). Im Ovar eines AP-2 γ Δ :-T Tieres finden sich vereinzelt Oozyten, allerdings ist ihre Anzahl im Vergleich zur Kontrolle gering (Abb. 26 D). Die hier vorhandenen Oozyten sind wahrscheinlich das Resultat einer unvollständigen Cre-Exzision, die für die TNAP-Cre-Tiere auch beschrieben ist (Lomeli et al. 2000).

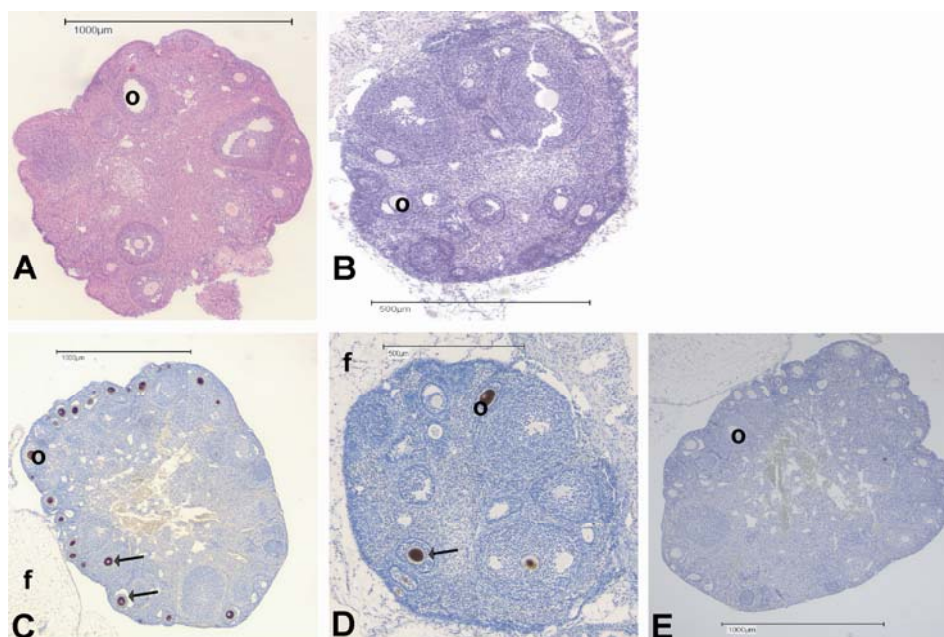


Abbildung 26: **Phänotyp der AP-2 γ Δ /-:T Ovarien**

(A) H/E-Färbung eines AP-2 γ ^{+flox} Ovars; (B) H/E-Färbung eines AP-2 γ Δ /-:T Ovars; (C) MSY2-Färbung eines AP-2 γ ^{+flox} Ovars mit braun gefärbten Oozyten (schwarze Pfeile); (D) MSY2-Färbung eines AP-2 γ Δ /-:T Ovars mit geringer Anzahl an Oozyten (schwarzer Pfeil); (E) MSY2-Kontrolle eines AP-2 γ ^{+flox} Ovars ohne Primärantikörper
o: Oozyte

Während die Hormonwerte einen Hinweis auf einen Defekt der Zellen in den Gonaden lieferten, konnte durch die Verpaarungen der AP-2 γ ^{flox} Tiere mit den TNAP-Cre Tieren gezeigt werden, dass der beobachtete Phänotyp des Keimzellverlustes tatsächlich direkt auf die Keimzellen zurückzuführen ist, da hier die Cre-Rekombinase nur in den Keimzellen aktiv ist und AP-2 γ im restlichen Tier nicht beeinträchtigt wird. AP-2 γ wird also in den Keimzellen benötigt. Um die pathomorphologischen Veränderungen genauer zu untersuchen, wurden Tiere am Tag der Geburt analysiert.

3.2.4.2 Histologie neonataler Gonaden

In Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnitten von Ovarien und Hoden von Kontrolltieren und Mutanten am Tag der Geburt sieht man keine großen Unterschiede (Abb. 27 A-D). Zur Färbung der Keimzellen wurde für die Ovarien wiederum der keimzell-spezifische Marker MSY2 verwendet (Abb. 27 E, F). Abbildung 27 E zeigt ein AP-2 γ ^{+flox} Ovar am Tag der Geburt, die Oozyten sind braun angefärbt. Im Vergleich dazu enthält das Ovar der AP-2 γ Δ /-:T Maus keine Oozyten (Abb. 27 F).

Da MSY2 am Tag der Geburt im Hoden noch nicht exprimiert wird, wurde hier ein anderer Keimzellmarker verwendet. Bei diesem Marker handelt es sich um GCNA (=germ-cell-nuclear-antigen), ein Marker, der frühe Keimzellen detektiert und deshalb für die Analyse embryonaler und früh postnataler Keimzellen eingesetzt werden kann (Enders und May 1994). In den Hoden der AP-2 γ ^{+floX} Tiere am Tag der Geburt finden sich einige Keimzellen in den Samenkanälchen (Abb. 27 G), wohingegen die Hoden der AP-2 γ Δ :-T Tiere nur eine sehr geringe Anzahl an Keimzellen enthalten (Abb. 27 H).

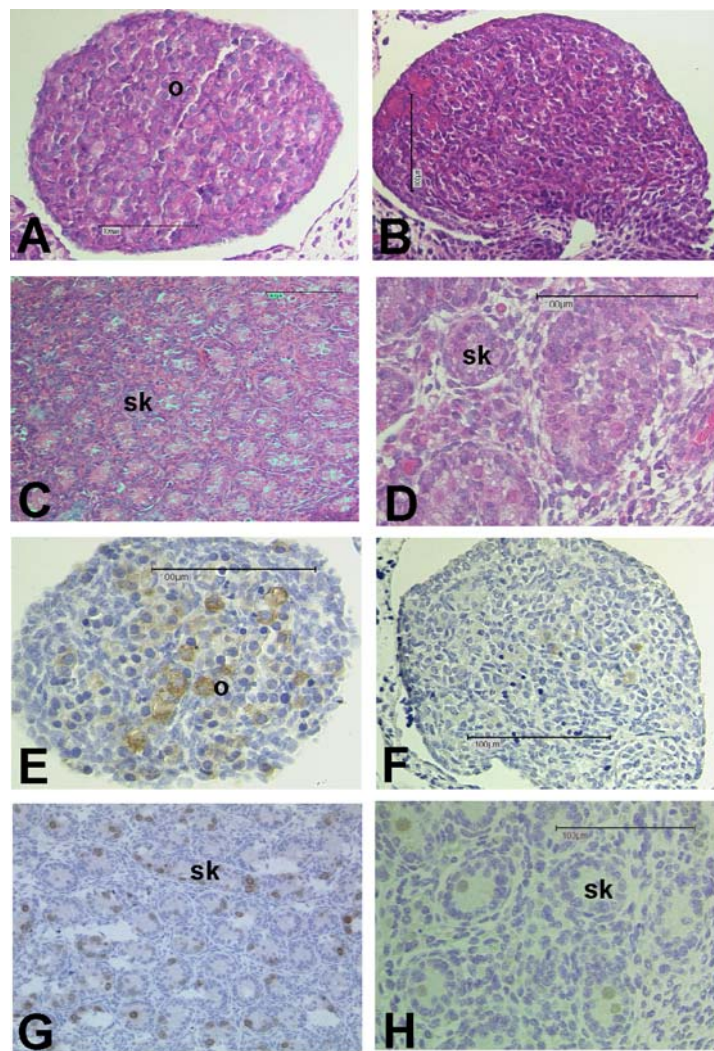


Abbildung 27 Phänotyp der AP-2 γ Δ :-T Tiere am Tag der Geburt

(A) H/E-Färbung eines AP-2 γ ^{+floX} Ovars am Tag der Geburt; (B) H/E-Färbung eines AP-2 γ Δ :-T Ovars am Tag der Geburt; (C) H/E-Färbung eines AP-2 γ ^{+floX} Hodens am Tag der Geburt; (D) H/E-Färbung eines AP-2 γ Δ :-T Hodens am Tag der Geburt; (E) MSY2-Färbung eines AP-2 γ ^{+floX} Ovars am Tag der Geburt; (F) MSY2-Färbung eines AP-2 γ Δ :-T Ovars am Tag der Geburt; (G) GCNA-Färbung eines AP-2 γ ^{+floX} Hodens am Tag der Geburt; (H) GCNA-Färbung eines AP-2 γ Δ :-T Hodens am Tag der Geburt

o: Oozyte; sk: Samenkanälchen

3.2.4.3 Statistik

Aus der Verpaarung $AP-2\gamma^{flox/flox} \times AP-2\gamma^{+/-}; TNAP-Cre^{+}$ wurden insgesamt 564 Tiere erhalten. Nur 37 Tiere hatten den Genotyp $AP-2\gamma \Delta/-:T$, was einer Frequenz von 6,6% entspricht. Nach den Mendelschen Regeln sollten die Nullmutanten allerdings mit einer Frequenz von 25% auftreten. Dass dies hier nicht der Fall war, liegt wahrscheinlich an der ektopischen Expression von TNAP-Cre in den Zellen der Plazenta (Lomeli et al. 2000). Dadurch wird $AP-2\gamma$ in der Plazenta inaktiviert und es tritt der Implantationsdefekt auf, der die Tiere während der frühen Embryogenese sterben lässt (Werling und Schorle 2002).

Um den Keimzellverlust weiter zu untersuchen, wurde eine weitere Cre-Linie in die $AP-2\gamma^{flox}$ -Linie eingekreuzt. Bei dieser Cre-Linie handelt es sich um Sox2Cre, die Cre analog zu Mox2Cre Cre im Embryo, aber nicht im extraembryonalen Gewebe exprimieren (Hayashi et al. 2002). Dadurch kann der Implantationsdefekt der $AP-2\gamma$ -defizienten Tiere umgangen werden. Es ist beschrieben, die Sox2-vermittelte Cre-Exzision im Vergleich zu Mox2Cre eine höhere Effizienz hat, weshalb Mosaikphänotypen, die durch unvollständige Cre-Exzision hervorgerufen werden, minimiert werden (Hayashi et al. 2002).

Die Sox2Cre-Tiere wurden analog zu den Mox2Cre- und TNAP-Cre-Tieren in die $AP-2\gamma^{flox}$ -Linie eingekreuzt (s. Kap.3.2.1). Nullmutanten, die aus dieser Verpaarung erhalten wurden, werden im Weiteren als $AP-2\gamma \Delta/-:S$ bezeichnet, wobei „S“ für Sox2Cre steht.

3.2.5 Der ubiquitäre Phänotyp während der Embryogenese

Da bereits zum Zeitpunkt der Geburt keine Keimzellen in den Mutanten vorhanden sind und der Phänotyp in beiden Geschlechtern auftritt, wurden Embryonen von dem Stadium der sexuellen Differenzierung (E12,5) in der Embryonalentwicklung rückwärts gehend bis zum Stadium E7,5 auf das Vorhandensein von Keimzellen untersucht.

Durch ihre hohe Aktivität an Alkalischer Phosphatase (AP) kann man die Keimzellen bereits kurz nach ihrer Entstehung, ab dem Tag 7,2 der Embryonalentwicklung, anfärben (Ginsburg et al. 1990).

Am Tag E7,5 befinden sich die Keimzellen als Ansammlung von ca. 45 Zellen an der Basis der sich entwickelnden Allantois. Es ist kein Unterschied zwischen Kontrolle und Mutante erkennbar (Abb. 28 A, B; Pfeile). Am Tag 8,5 der Embryonalentwicklung beginnen die Keimzellen mit ihrer Wanderung. Sie sind nun im Kontrolltier als „Pfefferkorn-ähnliche“-Struktur zu erkennen und wandern von der Basis der Allantois entlang des sich entwickelnden Enddarms (Abb. 28 C; Pfeile). In der Mutante befinden sich zu diesem

Zeitpunkt nur sehr wenige Zellen an der Basis der Allantois, wandernde Zellen sind nicht vorhanden (Abb. 28 D; Pfeile). Am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung befinden sich die Keimzellen auf ihrer Wanderung entlang des Enddarms. In einem $AP-2\gamma^{+/flox}$ Embryo sind sie als braune Zellen sichtbar (Abb. 28 E, Pfeile). In einem $AP-2\gamma \Delta/-:S$ Embryo hingegen sind zu diesem Zeitpunkt keine braunen Zellen vorhanden (Abb. 28 F).

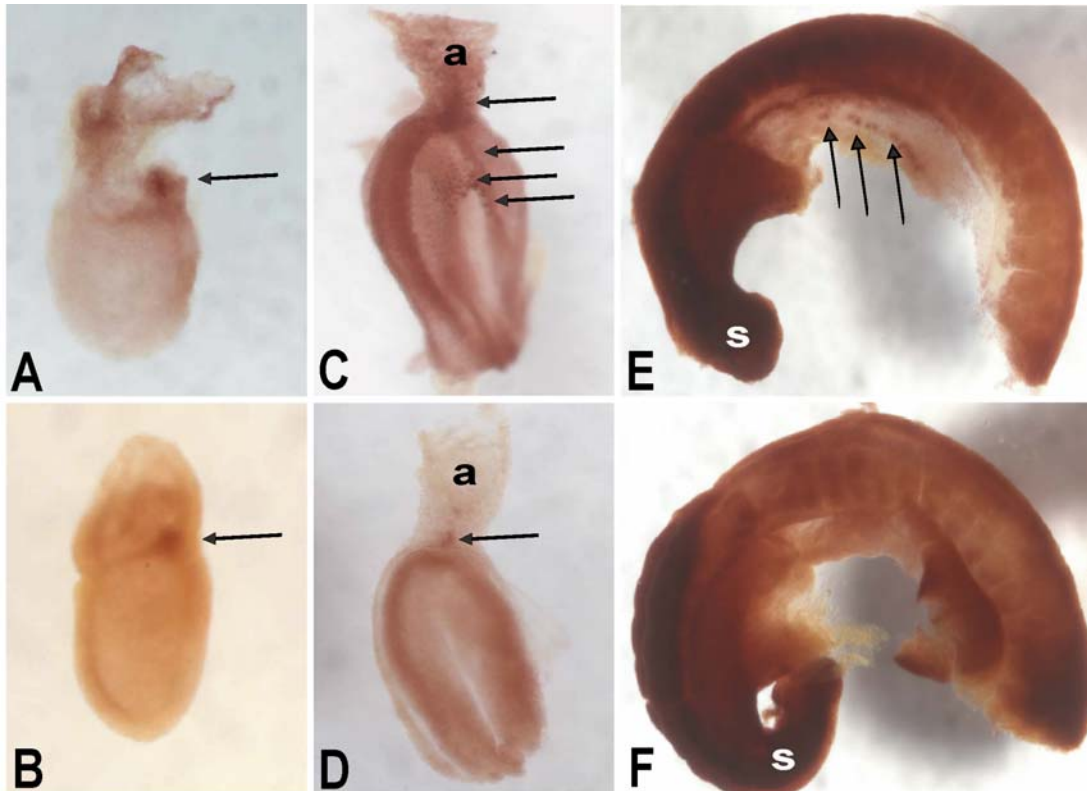


Abbildung 28: **Der Phänotyp während der frühen Embryogenese**

Alkalische Phosphatase-Färbung am Totalpräparat; (A) $AP-2\gamma^{+/flox}$ Embryo am Tag 7,5 der Embryonalentwicklung; (B) $AP-2\gamma \Delta/-:S$ Embryo am Tag 7,5 der Embryonalentwicklung; (C) $AP-2\gamma^{+/flox}$ Embryo am Tag 8,5 der Embryonalentwicklung; (D) $AP-2\gamma \Delta/-:S$ Embryo am Tag 8,5 der Embryonalentwicklung; (E) $AP-2\gamma^{+/flox}$ Embryo am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung; (F) $AP-2\gamma \Delta/-:S$ Embryo am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung; die schwarzen Pfeile markieren die gefärbten Keimzellen:

a: Allantois, s: Schwanzbereich

Am Tag 10,5 haben die Keimzellen ihre Wanderung beendet und die Genitalanlagen erreicht. Sie sind in den $AP-2\gamma^{+/flox}$ Tieren wiederum als „Pfefferkorn-ähnliche“ Strukturen entlang der Genitalanlagen zu erkennen und proliferieren dort bis am Tag 12,5 die gesamten Genitalanlagen als braune Strukturen sichtbar sind (Abb. 29 A, B). In den Genitalanlagen der $AP-2\gamma \Delta/-:S$ Embryonen sind am Tag 10,5 der Embryonalentwicklung konsequenterweise

keine Keimzellen vorhanden (Abb. 29 C). Am Tag 12,5 der Embryonalentwicklung sind die Genitalfalten an sich als Struktur erkennbar, allerdings befinden sich auch hier keine Keimzellen, die angefärbt werden könnten (Abb. 29 D).

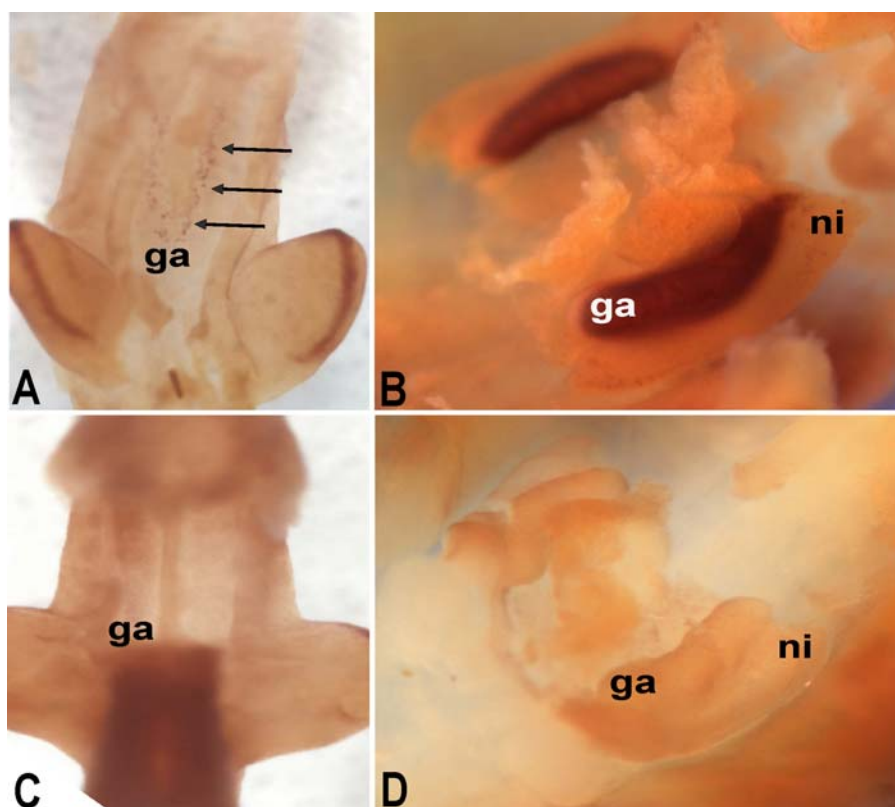


Abbildung 29: **Der Phänotyp in den Genitalanlagen**

Alkalische Phosphatase-Färbung am Totalpräparat; (A) $AP-2\gamma^{+/flox}$ Embryo am Tag 10,5 der Embryonalentwicklung; die schwarzen Pfeile markieren die gefärbten Keimzellen; (B) $AP-2\gamma^{+/flox}$ Embryo am Tag 12,5 der Embryonalentwicklung; (C) $AP-2\gamma \Delta/-:S$ Embryo am Tag 10,5 der Embryonalentwicklung; (D) $AP-2\gamma \Delta/-:S$ Embryo am Tag 12,5 der Embryonalentwicklung
ga: Genitalanlage; ni: Niere

Die Tatsache, dass sich ab dem Tag 7,5 der Embryonalentwicklung in den $AP-2\gamma \Delta/-:S$ Tieren keine Keimzellen mehr anfärben lassen, kann zwei Ursachen haben. Entweder verlieren die Tiere ihre Keimzellen aufgrund des Nicht-Vorhandenseins von $AP-2\gamma$ oder die Keimzellen stellen die Expression an Alkalischer Phosphatase ein und können deshalb nicht mehr angefärbt werden. Ein Hinweis dafür könnte sein, dass es im Promotor des Gens für Alkalische Phosphatase $AP-2$ -Bindestellen gibt und die Alkalische Phosphatase somit ein Zielgen von $AP-2\gamma$ sein könnte. Um dies auszuschließen, wurden $AP-2\gamma^{+/flox}$ und $AP-2\gamma \Delta/-:S$ Embryonen mit anderen Keimzellmarkern gefärbt. Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse der Färbungen mit den Keimzellmarkern Oct-4 (Abb. 30 A, B) und GCNA (Abb. 30C, D).

Embryonen am Tag 8,5 der Embryonalentwicklung wurden im Totalpräparat mit Oct-4 gefärbt. *Oct-4* wird ab E7,5 in den Keimzellen exprimiert. Betrachtet man den $AP-2\gamma^{+/flox}$ Embryo, so sieht man, dass die Keimzellen bereits mit ihrer Wanderung begonnen haben, allerdings ist diese noch nicht weit fortgeschritten (Abb. 30 A, Pfeil). Im Vergleich dazu sieht man bei dem $AP-2\gamma \Delta/-:S$ Embryo nur sehr vereinzelt Keimzellen an der Basis der Allantois (Abb. 30 B, Pfeil). Wandernde Keimzellen sind nicht detektierbar.

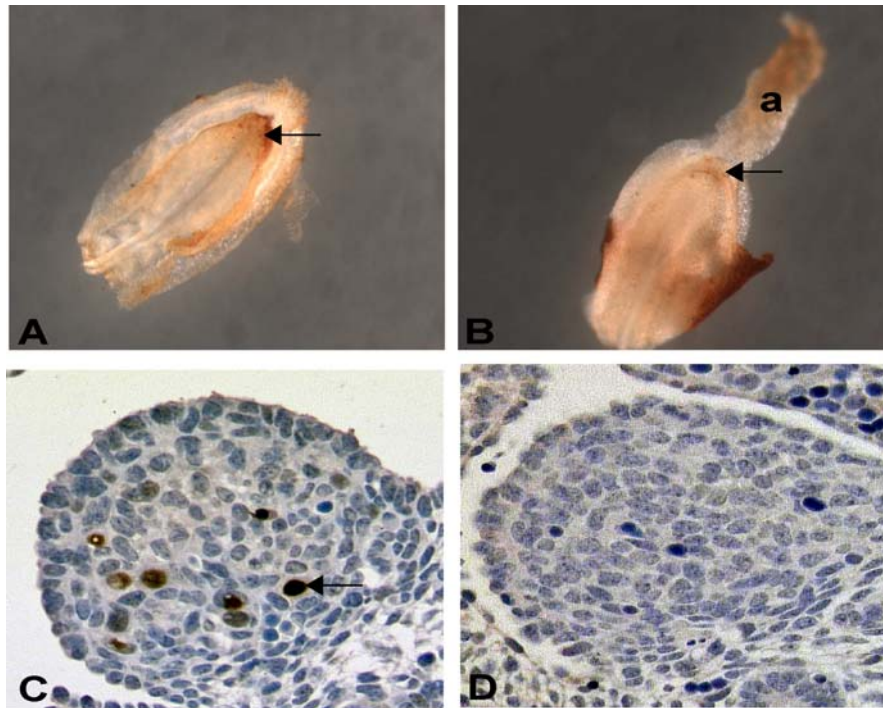


Abbildung 30: **Nachweis des Keimzellverlustes mit anderen Markern**

Oct-4-Totalpräparat-Färbung am Tag 8,5 der Embryonalentwicklung (A, B); (A) $AP-2\gamma^{+/flox}$; (B) $AP-2\gamma \Delta/-:S$; GCNA-Färbung von Schnitten durch die Genitalanlagen am Tag 11,5 der Embryonalentwicklung (C, D); (C) $AP-2\gamma^{+/flox}$; (D) $AP-2\gamma \Delta/-:S$; die schwarzen Pfeile markieren gefärbte Keimzellen; a: Allantois

Zusätzlich wurden Schnitte durch die Genitalanlagen von 11,5 Tage alten Embryonen beider Genotypen mit dem keimzell-spezifischen Marker GCNA gefärbt. Auch hier sieht man im Kontrolltier braun gefärbte Zellen in den Genitalanlagen (Abb. 30 C, Pfeil), in der Mutante dagegen sind keine Keimzellen vorhanden (Abb. 30 D).

Durch verschiedene Färbungen konnte gezeigt werden, dass die $AP-2\gamma \Delta/-:S$ Embryonen ihre Keimzellen zwischen Tag 7,5 und 8,5 der Embryonalentwicklung verlieren. Der Mechanismus, durch den dies geschieht, bleibt jedoch weiter unklar. Eine Möglichkeit wäre

das Differenzieren zu somatischen Zellen, die dadurch ihren Keimzellcharakter verlieren und als diese nicht mehr nachweisbar sind.

Andererseits könnten die Keimzellen durch den Verlust von AP-2 γ absterben. Sollte dies der Fall sein, ist es notwendig, Überlebensfaktoren zu untersuchen, die in dieser frühen Phase für die Keimzellentwicklung essentiell sind. Da AP-2 γ als Transkriptionsfaktor andere Gene regulieren kann, ist es interessant, die regulatorischen Mechanismen näher zu analysieren. Um dieser Frage nachzugehen, wurde ein Zellkultursystem gewählt, welches es erlaubt, AP-2-abhängige Transaktivierung zu untersuchen.

3.3 Untersuchungen zum Mechanismus

Die Rezeptortyrosinkinase *Kit* stellt einen wichtigen Überlebensfaktor für primordiale Keimzellen dar und wird in diesen ab dem Tag 7,5 der Embryonalentwicklung exprimiert (Manova und Bachvarova 1991). In Kapitel 3.1.2 konnte gezeigt werden, dass auch AP-2 γ zu diesem frühen Zeitpunkt in den Keimzellen exprimiert wird. Des Weiteren wurde bereits beschrieben, dass AP-2 γ und *Kit* in humanen Gonozyten co-exprimiert werden (Pauls et al. 2005). Außerdem wurde gezeigt, dass *Kit* durch AP-2 α in humanen Melanomzellen transaktiviert werden kann (Huang et al. 1998). Aufgrund dieser Hinweise auf das Zusammenspiel zwischen *Kit* und AP-2 im Menschen, sollte die Interaktion zwischen murinem AP-2 γ und *Kit* näher untersucht werden.

Durch Datenbankanalysen (<http://www.gene-regulation.com>) wurde eine 3,5 kb-umspannende Region stromaufwärts des Startcodons identifiziert, die sechs potentielle AP-2-Bindestellen enthält und im Weiteren als muriner *Kit*-Promotor bezeichnet wird. Um die mögliche Transaktivierung von AP-2 γ an diesem Promotor zu untersuchen, wurde ein Luziferasekonstrukt verwendet (pmkitLuc; Abb. 31). Dieses Konstrukt, welches in unserem Labor konstruiert wurde, unterscheidet sich von dem bereits publizierten (Huang et al. 1998). Zum einen handelt es sich bei unserem Konstrukt um die Sequenz des murinen *Kit*-Promotors, zum anderen wurden zwei weitere putative AP-2-Bindestellen miteinbezogen, die in dem Konstrukt von (Huang et al. 1998) nicht vorkommen. Dieses Konstrukt beinhaltet lediglich die vier, dem ATG am nächsten gelegenen, putativen Bindestellen.



Abbildung 31: **Schematischer Aufbau des Kit-Luziferase-Konstruktes (pmkitLuc)**

Der murine kit-Promotor beinhaltet sechs potentielle AP-2-Bindestellen (blau)

Als Zellsystem wurden HepG2 Zellen gewählt, da diese kein endogenes AP-2 besitzen und deshalb allgemein für Promotorstudien, die mit AP-2 zusammenhängen, benutzt werden (Braganca et al. 2002). HepG2-Zellen entstammen einem humanen hepatozellulären Karzinom.

Als Positivkontrolle wurde ein Luziferasekonstrukt verwendet, bei welchem Luziferase von einem künstlichen Promotor, der drei hintereinander geschaltete AP-2-Bindestellen besitzt, getrieben wird (p3xAP-2Bluc). Dieser künstliche Promotor kann durch AP-2 α transaktiviert werden (Braganca et al. 2002). Bei den verwendeten Luziferasekonstrukten handelte es sich um *firefly*-Luziferase.

Als interne Transfektionskontrolle wurde außer Reporter- und Expressionsplasmid *renilla*-Luziferase co-transfiziert, so dass die *firefly*-Luziferase-Werte auf einen internen Standard bezogen werden konnten.

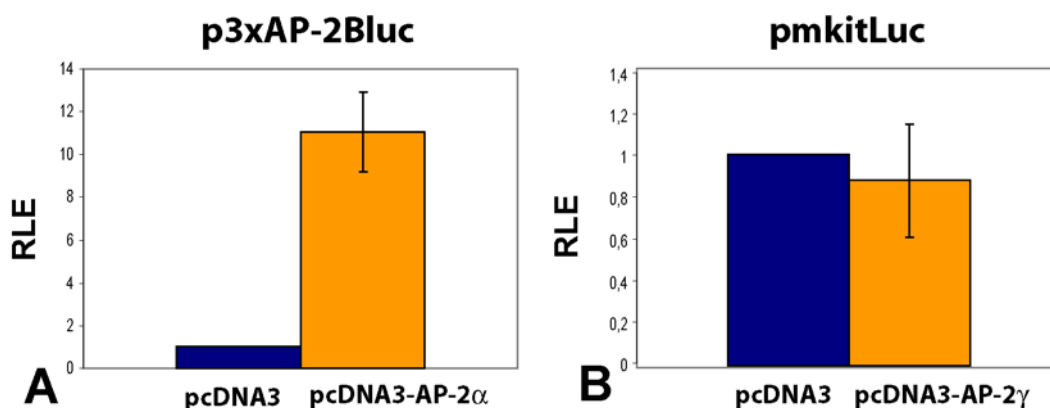


Abbildung 32: **HepG2-Transfektionsexperimente**

Ergebnisse der Luziferase-Assays; (A) Co-Transfektion von p3xAP-2Bluc und einem AP-2 α -Expressionsplasmid (orange) und p3xAP-2Bluc und einem Leerplasmid (blau); (B) Co-Transfektion von pmkitLuc und einem AP-2 γ -Expressionsplasmid (orange) und pmkitLuc und einem Leerplasmid (blau); RLE: relative Luziferase-Einheiten

Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse der Transfektionen. Man sieht, dass es im HepG2-Kultursystem möglich ist, p3xAP-2Bluc durch AP-2 α zu transaktivieren. Bei Co-Transfektion von p3xAP-2Bluc und einem AP-2 α -Expressionsplasmid ist die gemessene Luziferase-Aktivität ca. 11x höher als bei Co-Transfektion von p3xAP-2Bluc mit einem leeren Expressionsplasmid (Abb. 32 A).

Transfiziert man allerdings pmkitLuc und ein AP-2 γ -Expressionsplasmid und vergleicht hier die Luziferase-Werte mit der Leerplasmidkontrolle, sieht man, dass es nicht möglich ist, kit mit AP-2 γ zu transaktivieren; der hohe Fehlerbalken zeigt an, dass man weder von einer Aktivierung noch von einer Repression sprechen kann.

3.4 Teratomentstehung in AP-2 γ -heterozygoten Tieren

Da AP-2 γ für die Keimzellentwicklung von essentieller Bedeutung ist, stellte sich die Frage, welche Auffälligkeiten Tiere mit einer reduzierten AP-2 γ -Gen dosis zeigen. Dazu wurden AP-2 γ heterozygote Tiere, die ein gesundes und ein mutiertes AP-2 γ -Allel besitzen, in den 129/SV-Hintergrund eingekreuzt. Dieser genetische Hintergrund besitzt eine erhöhte Anfälligkeit für die Bildung von Teratomen, die zur Gruppe der Keimzelltumore gehören (s. Kap. 1.1.5.1). Spontane Teratome treten im 129/SV-Hintergrund mit einer Wahrscheinlichkeit von 1-10% im Alter von 3 Wochen auf (Stevens und Hummel 1957).

3.4.1 Verpaarungsschema

Heterozygote AP-2 γ -Tiere wurden mit Wildtyp-Mäusen der 129/SV-Linie verpaart, so dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% heterozygote Nachkommen entstehen (Abb. 33).

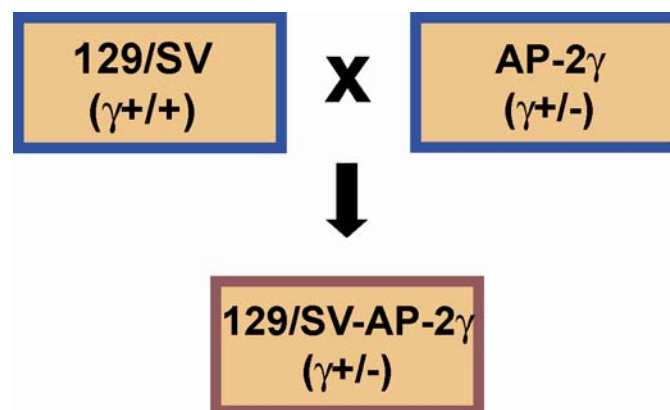


Abbildung 33: Verpaarungsschema für AP-2 γ heterozygote Tiere

Heterozygote AP-2 γ Tiere entstammen ursprünglich aus dem genetisch gemischten Hintergrund 129/SVxC57Bl6. Durch Rückkreuzung in den Hintergrund 129/SV erhält man mit jeder Generation einen höheren Anteil an 129/SV. So ist es möglich, genetisch gemischte Linien über mehrere Generationen in einen genetisch reinen Hintergrund zu kreuzen. Von einem reinen Hintergrund spricht man nach 10 Generationen Rückkreuzung.

3.4.2 Makroskopie der Teratome

In der 7. Generation im Hintergrund 129/SV entwickelten 95% der männlichen Tiere Teratome. Diese Teratome traten sowohl uni- (einen Hoden betreffend; 44%), als auch bilateral (beide Hoden betreffend; 56%) auf. Bilaterale Teratome führten zur Infertilität der Tiere. Alle Teratome traten intragonadal auf. Abbildung 34 zeigt die Makroskopie bilateraler Tumore. Die Teratome lagen im Abdomen der Tiere (Abb. 34 A). Dort konnten sie eine Größe von mehreren Zentimetern Durchmesser erreichen. Im Vergleich mit einem Wildtyp-Hoden (Abb. 34 B) sieht man, dass die Teratome deutlich größer als dieser sind.

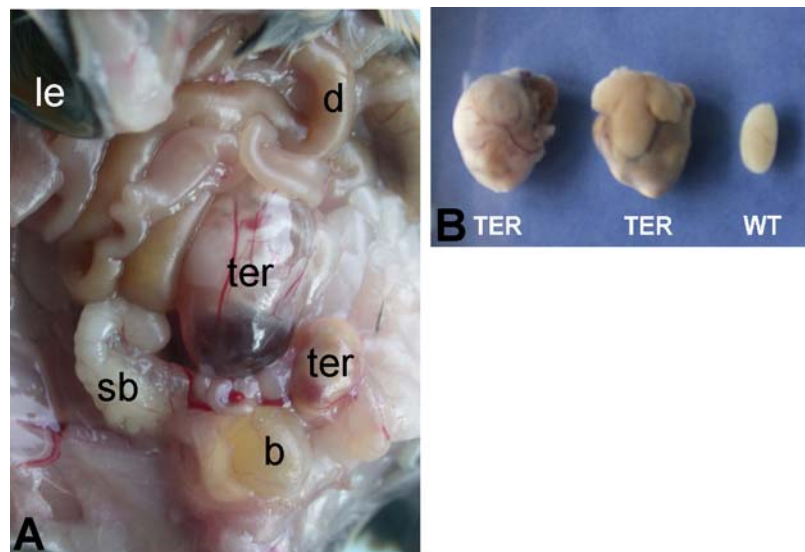


Abbildung 34: **Makroskopie der Teratome im adulten Tier**

(A) Ein bilaterales Teratom im Abdomen einer AP-2 γ heterozygoten Maus; (B) Herauspräpariertes bilaterales Teratom einer AP-2 γ heterozygoten Maus im Vergleich zu einem Wildtyp-Hoden; b: Blase; d: Darm; le: Leber; sb: Samenblase; ter: Teratom

3.4.3 Histologie der Teratome

Histologisch weisen die Teratome eine Vielzahl von Geweben auf. Sie enthalten vor allem ausdifferenzierte Gewebe wie Knorpel, reife Drüsen, Muskulatur und Glia-Zellen, es können aber auch unreife Drüsen auftreten (Abb. 35 A, B). In Abbildung 35 C ist ein Teil eines PAS (Periodsäure-Schiff)-gefärbten Teratoms zu sehen. PAS färbt glykogenhaltige Bestandteile wie in diesem Fall Schleim, der von reifen Drüsen produziert wird. Das Vorhandensein schleimproduzierender Drüsen ist neben den differenzierten Geweben eine Bestätigung, dass es sich bei diesem Tumor um ein Teratom handelt.

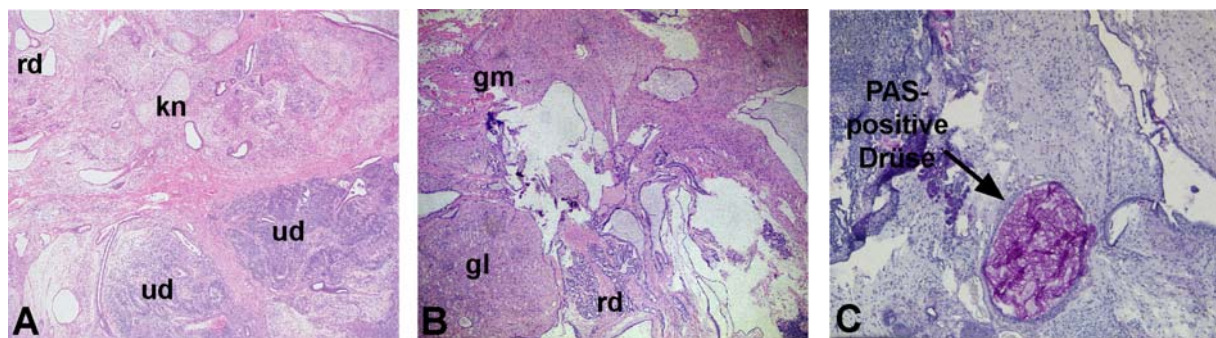


Abbildung 35: **Histologie der adulten Teratome**

H/E-Färbung adulter Teratome (A, B), die aus reifen und unreifen Anteilen bestehen; (C) PAS-Färbung eines adulter Teratoms, gl: Glia; gm: glatte Muskulatur; kn: Knorpel; rd: reife Drüsen; ud: Unreife Drüsen

Die Teratome entstehen bereits kurz nach Geburt, bei einem 2 Tage alten Tier konnte in einem Hoden ein so genannter „Focus“, eine Ansammlung von Zellen, gefunden werden (Abb. 36 A). Die Färbung mit Ki-67, einem Proliferationsmarker, zeigt, dass diese Zellen proliferieren (Abb. 36 A, roter Kreis). Daraus entsteht zunächst ein unreifes Teratom, welches bereits 7 Tage nach der Geburt auftritt (Abb. 36 B, roter Kreis).

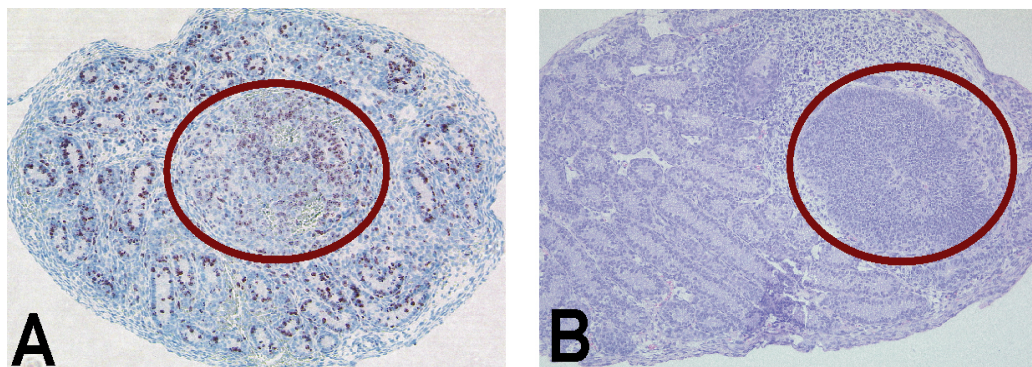


Abbildung 36: **Teratomentstehung**

(A) Ki-67-Färbung eines Hodens eines AP-2 γ heterozygoten Tieres 2 Tage nach der Geburt; der rote Kreis markiert einen „Focus“; (B) H/E-Färbung eines Hodens eines AP-2 γ heterozygoten Tieres 7 Tage nach der Geburt; der rote Kreis markiert das entstehende Teratom

3.4.4 Proliferationsverhalten AP-2 γ heterozygoter Keimzellen

Um die Ursache der Teratomentstehung der AP-2 γ heterozygoten Tiere zu untersuchen, sollte das Proliferationsverhalten der primordialen Keimzellen in Kultur analysiert werden.

Aufgrund der Tatsache, dass alle Teratome intragonadal auftraten, kann man davon ausgehen, dass die Keimzellen ihre Migration korrekt beenden und es erst nach Erreichen der Genitalanlagen zu einem Ereignis kommt, welches die Teratomentstehung hervorruft. Deshalb wurde Tag 12,5 der Embryonalentwicklung für die Keimzellisolation gewählt, da die Migration der Keimzellen in die Genitalanlagen zu diesem Zeitpunkt bereits abgeschlossen ist.

Um das Proliferationsverhalten der Keimzellen zu untersuchen, wurden die Genitalanlagen der Embryonen präpariert und daraus die Keimzellen isoliert. Die Keimzellen wurden in Kultur genommen und auf einer Schicht SI/SI4*mSCF220*-Zellen in Anwesenheit verschiedener Wachstumsfaktoren gehalten. SI/SI4*mSCF220*-Zellen exprimieren die membran-gebundene Form des Stammzellsfaktors, der für das Überleben der Keimzellen von entscheidender Bedeutung ist. Als Wachstumsfaktoren wurden dem Medium LIF, bFGF und löslicher Stammzellsfaktor zugegeben, da diese als essentiell für Keimzellen in Kultur beschrieben wurden (Matsui et al. 1992).

Die Keimzellen wurden in gleicher Anzahl in zwei verschiedene Platten ausgesät. Acht Stunden danach wurden die Zellen als abgesetzt betrachtet, Alkalische-Phosphatase gefärbt und gezählt. Dieser Zeitpunkt wurde als Tag 0 betrachtet. 72 Stunden später wurde die zweite Platte gefärbt und die Zellen gezählt (Tag 3). Der Quotient aus der Anzahl der Zellen am Tag 3 und der Anzahl der Zellen am Tag 0 gibt an, wie stark die Zellen der unterschiedlichen Genotypen proliferieren. In Abbildung 37 ist zu sehen, daß die Wildtyp-Zellen nach 3 Tagen etwa das Dreifache ihrer Ausgangszahl erreicht haben (blauer Balken). Die Zellen der AP-2 γ heterozygoten Tiere dagegen proliferieren deutlich mehr, ihre Zahl ist auf die fünffache Menge angestiegen (gelber Balken).

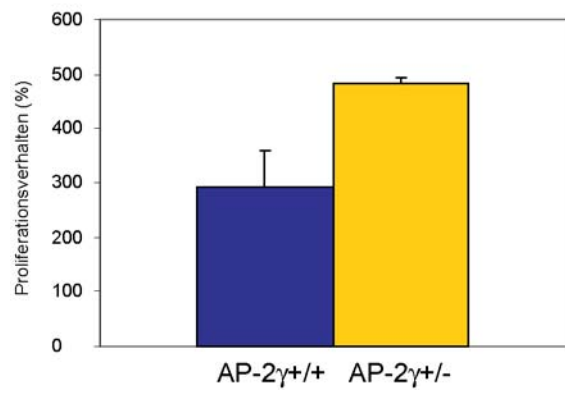


Abbildung 37: **Proliferationsverhalten der Keimzellen in Kultur**
Blau: Wildtyp-Zellen; gelb: AP-2 γ heterozygote Zellen

4. Diskussion

4.1 Die Expression von AP-2 γ

In dieser Arbeit wurde zunächst das murine Expressionsmuster von AP-2 γ während der Embryogenese und im adulten Tier untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass AP-2 γ bereits kurz nach der Spezifizierung der primordialen Keimzellen in diesen exprimiert wird. Die Expression hält während der Wanderung der Keimzellen an und lässt sich auch noch nach Erreichen der Genitalanlagen sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene nachweisen. Diese stetige Expression während der Embryonalentwicklung deutet darauf hin, dass AP-2 γ in den Keimzellen eine allgemein wichtige Funktion erfüllt.

Die Entwicklung der primordialen Keimzellen lässt sich grob in drei Phasen einteilen: Die Spezifizierung der Keimzellen, ihre Migration entlang des Enddarms und das Erreichen der Genitalanlagen mit anschließender Differenzierung. Während dieser verschiedenen Phasen müssen sich die Keimzellen an unterschiedliche Bedingungen anpassen.

Mit der sexuellen Differenzierung nach Erreichen der Genitalanlagen wird gleichzeitig der prämeiotische Arrest eingeleitet. In den männlichen Genitalanlagen wird außerdem ein mitotischer Arrest eingeleitet, die Keimzellen verbleiben bis zur Geburt im G0/G1-Arrest und es finden keine weiteren Mitosen statt. Die weiblichen Keimzellen hingegen durchlaufen die Stadien der Meiose und arretieren im Diplotän-Stadium um den Zeitpunkt der Geburt.

Eine zwischen den Geschlechtern unterschiedliche Expression eines Gens deutet darauf hin, dass es sich um ein Meiose-abhängiges Gen handelt. Dies ist zum Beispiel bei *stra8* (= „stimulated by retinoic acid“ 8) der Fall (Koubova et al. 2006). *Stra8* wird in den embryonalen Ovarien bereits am Tag 13,5, in den Hoden allerdings erst am Tag der Geburt exprimiert. Dabei beginnt die Expression genau zu dem Zeitpunkt, zu dem die Meiose eingeleitet wird.

Auch AP-2 γ lässt sich durch Retinsäure stimulieren (Sapin et al. 2000) und beide Gene wurden in einer Subtraktions-Hybridisierung identifiziert, bei der Retinsäure-abhängige Gene untersucht wurden (Bouillet et al. 1995). Außerdem konnte bereits ein Zusammenhang zwischen AP-2 α und *stra13* gezeigt werden (Pfisterer et al. 2002). Deshalb wurde untersucht, ob AP-2 γ -analog zu *stra8* ein Meiose-relevantes Gen sein könnte. Da AP-2 γ

aber sowohl in den männlichen und weiblichen Genitalanlagen am Tag 13,5 der Embryonalentwicklung als auch in den Hoden und Ovarien am Tag 16,5 der Embryonalentwicklung exprimiert wird, konnte ein Zusammenhang zwischen AP-2 γ und der Meiose nicht bestätigt werden.

Auch im Menschen wird AP-2 γ während der Embryonalentwicklung in den Keimzellen exprimiert (Hoei-Hansen et al. 2004; Pauls et al. 2005). Hierbei wurde allerdings lediglich die Expression in den männlichen Genitalanlagen untersucht. Im Menschen verläuft die Keimzellentwicklung, zeitlich gesehen, früher als in der Maus. Bereits in der dritten Schwangerschaftswoche befinden sich die primordialen Keimzellen an der Basis der Allantois. Dieses Stadium entspricht in der Maus etwa E8,5. Die Wanderung der primordialen Keimzellen beginnt im Menschen ca. in der 4. Schwangerschaftswoche, die Besiedlung der Genitalanlagen ist etwa in der 12. Schwangerschaftswoche abgeschlossen (De Felici et al. 2004).

Im Menschen wird AP-2 γ von der 12. bis zur 37. Schwangerschaftswoche exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt haben die Keimzellen ihre Wanderung bereits beendet und befinden sich in den Genitalanlagen. Wann die Expression genau beginnt, konnte nicht gezeigt werden, da von frühen humanen Embryonalstadien kein Material vorlag. Die Expression hält bis zur 37. Schwangerschaftswoche an, wobei sie mit zunehmender Keimzeldifferenzierung immer schwächer wird.

Betrachtet man die immunhistochemische AP-2 γ -Färbung der murinen Genitalanlagen am Tag 16,5 der Embryonalentwicklung, so scheint es hier so, als wären die randständigen Keimzellen im Vergleich zu den zentralen Keimzellen im jeweiligen Samenkanälchen weniger stark gefärbt. Das würde bedeuten, dass AP-2 γ auch in der Maus mit fortschreitender Differenzierung in den Keimzellen herunterreguliert wird, da sich die Keimzellen mit fortschreitender Differenzierung von der Mitte der Tubuli zum Rand hin anordnen.

In adulten murinen Gonaden ließ sich -analog zum Menschen- kein AP-2 γ nachweisen. Das ist in sofern interessant, als eine AP-2 γ -Expression im adulten Tier in Hoden, Ovar und Lunge beschrieben ist (Oulad-Abdelghani et al. 1996). Allerdings handelt es sich hierbei um Ergebnisse einer hybridisierten RT-PCR, einer sehr sensitiven Methode, die anfällig für falsch-positive Signale ist.

Aus diesen Ergebnissen kann man den Schluss ziehen, dass AP-2 γ mit fortschreitender Differenzierung der Keimzelle herunterreguliert wird.

4.2 AP-2 γ -konditional defiziente Tiere

Um einen genaueren Aufschluss über die Funktion von AP-2 γ im Tier zu bekommen, wurde ein Mausmodell etabliert, dass die gewebs- und zelltypspezifische Ablation des AP-2 γ -Gens unter Verwendung des Cre/LoxP-Systems, erlaubt (Werling und Schorle 2002).

Um den resultierenden Phänotyp genau zu untersuchen, wurden verschiedene Cre-Linien in die konditionale AP-2 γ -Linie eingekreuzt.

4.2.1 Der Epiblast-spezifische Phänotyp

Erste Analysen wurden mit Mox2Cre Tieren durchgeführt, die Cre ubiquitär im Embryo, nicht aber in extraembryonalen Geweben exprimieren (Tallquist und Soriano 2000). Dadurch wurde der Implantationsdefekt der AP-2 γ -konstitutiv-defizienten Tiere verhindert und eine Funktionsanalyse von AP-2 γ im Tier wurde ermöglicht.

Der Verlust von AP-2 γ resultiert in Infertilität der Tiere. Schon makroskopisch fällt auf, dass die Gonaden stark größenretardiert sind. In beiden Geschlechtern wurde ein Verlust des Keimepithels festgestellt. Solche Phänotypen treten häufig auf, wenn Gene mutiert werden, die in den Keimzellen exprimiert werden (Cooke und Saunders 2002).

Beispiele für Gene, die -analog zu AP-2 γ - in der frühen Embryogenese exprimiert werden und zu einem ähnlichen Phänotyp führen, sind *Kit* (Buehr et al. 1993), *Blimp1* (Ohinata et al. 2005), *Nanos3* (Tsuda et al. 2003) und *Oct-4* (Kehler et al. 2004). Eine direkte Verbindung von AP-2 γ und diesen Genen konnte -bis auf Oct-4 (s. Kap. 4.3)- noch nicht gezeigt werden.

Allerdings gibt es auch zwei Beispiele für Nullmutanten keimzell-spezifischer Gene, bei denen keine Defekte im Keimepithel festgestellt werden konnten. Zum einen handelt es sich dabei um *Alkalische-Phosphatase*-defiziente Tiere, die keinen Keimzellverlust zeigen (MacGregor et al. 1995). Das ist besonders interessant, da primordiale Keimzellen eine hohe Aktivität an Alkalischer Phosphatase aufweisen (Chiquoine 1954; Anderson et al. 2000). Ein weiteres Gen, was durch seine starke Expression am Tag 6,5 der Embryonalentwicklung mit der Spezifizierung der Keimzellen in Verbindung gebracht wurde, ist *Stella*. Doch auch

Stella-defiziente Tiere zeigen keinen Keimzellverlust. Diese Tiere entwickeln sich normal und sind fertil. Allerdings ist *Stella* als maternaler Faktor wichtig für die weitere Fortpflanzung, da Embryonen, die aus *Stella*-negativen Oozyten hervorgehen im Blastozysten-Stadium absterben (Bortvin et al. 2004).

Der Verlust des Keimepithels in den *AP-2 γ Δ /-:M* Tieren war jedoch nicht immer vollständig, teilweise traten sog. Mosaikphänotypen auf. Dabei konnte man in den Hoden der betroffenen Tiere sowohl Samenkanälchen mit normaler Spermatogenese, als auch atrophierte Samenkanälchen erkennen. Diese Mosaikphänotypen konnten auch bei anderen Nullmutanten, wie z. B. den *Integrin- β 1*-defizienten (Anderson et al. 1999)- oder den *W^e/W^e* (Buehr et al. 1993)-Mäusen beobachtet werden. In den *AP-2 γ - Δ /-:M* Tieren ist dieses Phänomen allerdings nicht auf die Ablation des *AP-2 γ* -Gens, sondern auf eine unvollständige Cre-Exzision zurückzuführen, wie durch Lasermikrodissektion und anschließende PCR gezeigt werden konnte. Bei den ausgeschnittenen gesunden Kanälchen hatte die Cre-Reaktion nicht stattgefunden, da außer dem „-“ Allel auch das „flox“-Allel detektiert werden konnte. Eine unvollständige Cre-Exzision der *Mox2Cre* ist für diese auch beschrieben (Hayashi et al. 2002).

Trotzdem bieten diese Tiere die Möglichkeit, den Phänotyp der *AP-2 γ* -defizienten Tiere näher zu untersuchen. Da *AP-2 γ* hier im gesamten Tier ausgeschaltet ist, können die beobachteten gonadalen Defekte auch durch ein Ungleichgewicht im Hormonhaushalt aufgrund einer Hypophysen- oder Hypothalamusunterfunktion verursacht werden, wie es bei *hpg*-Mäusen der Fall ist (Cattanach et al. 1977).

Zwar konnte bei den in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen im adulten Tier keine *AP-2 γ* -Expression im Gehirn (und somit in der Hypophyse) nachgewiesen werden, allerdings wurde *AP-2 γ* in radialen Gliazellen gefunden (unveröffentlichte Daten). Ein weiterer Hinweis auf eine Funktion von *AP-2 γ* im Gehirn ist die Tatsache, dass die *Drosophila-AP-2*-Mutante zerebrale Schäden aufweist (Bauer et al. 1998). Des Weiteren steht *AP-2 α* im Zusammenhang mit dem LH-Releasing Hormon, da es bei *AP-2 α* -Nullmutanten in der Embryogenese zu einer Verminderung der LH-Releasing Hormon-Expression im Vorderhirn kommt (Kramer et al. 2000).

Um den Zusammenhang zwischen dem gonadalen Phänotyp und eventuellen Hypothalamus- oder Hypophysendysfunktionen näher zu untersuchen, wurden Serumproben gewonnen und verschiedene Hormonwerte bestimmt. Durch die Bestimmung der Konzentrationen von LH, FSH und Testosteron in männlichen Tieren und FSH in weiblichen Tieren lässt sich aussagen, ob der Defekt durch eine Fehlfunktion der Gonaden oder durch

eine Fehlfunktion eines übergeordneten Steuerungsorgans (Hypothalamus/Hypophyse) verursacht wird. Bei einem gonadalen Defekt kommt es zu einer vermehrten FSH- und LH-Produktion seitens der Hypophyse. Ist hingegen die Hypophyse direkt betroffen, werden LH und FSH nicht mehr ausgeschüttet und es kommt zu einer Erniedrigung des FSH- und LH-Spiegels im Blut.

Die Tatsache, dass bei den *AP-2 γ* -defizienten Tieren die FSH- und LH-Spiegel im Vergleich zu den Kontrolltieren stark erhöht sind, schließt eine Rolle der Hormonachse bei der Entstehung des Phänotyps klar aus und beschränkt gleichzeitig die Funktion von *AP-2 γ* auf die Gonaden selbst.

4.2.2 Der Keimzell-spezifische Phänotyp

Um den in den *AP-2 γ* Δ /-:M-Tieren beobachteten Phänotyp weiter zu untersuchen, wurde die keimzell-spezifische TNAP-Cre-Linie (Lomeli et al. 2000) in die *AP-2 γ ^{flox}*-Linie eingekreuzt. Durch Verpaarung mit diesen Tieren findet die Cre-Exzision nur in den Keimzellen statt.

Der aus dieser Verpaarung resultierende Phänotyp ist mit dem der *AP-2 γ* Δ /-:M Tiere vergleichbar. Das Keimepithel ist verloren und es sind lediglich somatische Zellen vorhanden, was durch Färbung mit Markern für Sertoli- und Leydigzellen untersucht wurde. Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem in den *AP-2 γ* Δ /-Tieren tatsächlich um einen keimzell-intrinsischen Defekt handelt.

Auch bei Verpaarung mit der TNAP-Cre-Linie konnten Mosaikphänotypen vornehmlich in den Weibchen beobachtet werden. Bei keinem Weibchen des Genotyps *AP-2 γ* Δ /-:T konnte ein vollständiger Verlust der Keimzellen festgestellt werden. Auch für diese Cre-Linie ist eine unvollständige Cre-Exzision beschrieben (Lomeli et al. 2000). So findet die Cre-Reaktion in ca. 60% der Keimzellen statt, was den Mosaikphänotyp erklärt.

Neben der unvollständigen Cre-Exzision konnte bei den Verpaarungen mit dieser Linie noch ein weiteres Phänomen beobachtet werden. Von 564 analysierten Tieren wiesen nur 37 den Genotyp *AP-2 γ* Δ /-:T auf, was einer Frequenz von 6.6% entspricht. Nach den Mendelschen Regeln sollten die *AP-2 γ* Δ /-:T Tiere allerdings mit einer Frequenz von 25% auftreten. Dass dies nicht der Fall war, ist auf eine ektopische Cre-Expression in anderen Geweben zurückzuführen. TNAP-Cre-Tiere exprimieren Cre neben den Keimzellen auch zu geringen Anteilen in der Labyrinthregion der Plazenta (Lomeli et al. 2000). Dadurch wird *AP-2 γ* hier inaktiviert, und es kommt zum Tod der Tiere aufgrund der von Werling beschriebenen *AP-2 γ* -abhängigen Plazentaunterfunktion (Werling und Schorle 2002).

4.3 Der Keimzellverlust in der frühen Embryogenese

Durch Verpaarung mit einer dritten Cre-Linie, der Sox2Cre-Linie (Hayashi et al. 2002), wurde der Phänotyp der *AP-2 γ* -defizienten Tiere während der Embryogenese untersucht. Sox2Cre exprimieren Cre im Sox2-Lokus, was zu einer ubiquitären Expression im Embryo, nicht aber in den extraembryonalen Geweben führt. Hier startet die Cre-Exzision am Tag 6,5 der Embryonalentwicklung, was durch Verpaarung mit R26-Reportermausen gezeigt werden konnte (Hayashi et al. 2002).

Diese Tiere wurden in die *AP-2 γ ^{flox}*-Linie eingekreuzt, da für sie eine effizientere Cre-Exzision als für die Mox2Cre-Linie beschrieben wurde (Hayashi et al. 2002). *AP-2 γ Δ :-TNAP-Cre* wurden, aufgrund der in Kapitel 4.2.2 erwähnten niedrigen Ausbeute der gewünschten Genotypen, nicht weiter analysiert.

Durch Verpaarung der *AP-2 γ ^{flox}* mit den Sox2Cre konnte gezeigt werden, dass die *AP-2 γ* -defizienten Tiere ihre Keimzellen sehr früh in der Embryonalentwicklung, zwischen E7,5 und E8,5 verlieren. Die Spezifizierung der Keimzellen findet statt, da am Tag 7,5 der Embryonalentwicklung sowohl in der Kontrolle als auch in der Mutante Keimzellen vorhanden sind. Damit ist *AP-2 γ* nicht in die Spezifizierung der Keimzellen involviert.

Die Keimzellmigration wird allerdings nicht eingeleitet. Am Tag 8,5 der Embryonalentwicklung befindet sich im mutanten Tier nur eine sehr geringe Anzahl von Keimzellen an der Basis der Allantois. Wandernde Keimzellen sind nicht vorhanden. Konsequenterweise finden sich auch an den folgenden Tagen der Embryonalentwicklung keine Keimzellen in den *AP-2 γ* -defizienten Tieren.

Der Nachweis der Keimzellen während der Embryogenese erfolgte zunächst mit dem Keimzellmarker Alkalische Phosphatase. Alkalische Phosphatase eignet sich besonders als Marker für Keimzellen, da dieser während der Embryogenese vom Zeitpunkt der Spezifizierung bis ca. E13,5 exprimiert wird und ein Nachweis durch eine Farbumschlagsreaktion technisch relativ leicht erfolgen kann. Allerdings befinden sich im Promotor des Gens für Alkalische Phosphatase Bindestellen für AP-2 (Wada und Chou 1993), weswegen die Möglichkeit besteht, dass es sich um ein Zielgen von *AP-2 γ* handelt. Damit würden die Keimzellen bei Verlust von *AP-2 γ* nicht verloren gehen, sie würden lediglich den Marker nicht mehr exprimieren und könnten so nicht mehr nachgewiesen werden. Die Keimzellen würden nicht absterben, da gezeigt wurde, dass die Alkalische Phosphatase für die Keimzellen nicht essentiell ist (MacGregor et al. 1995).

Um dies zu untersuchen, wurden die Embryonen mit anderen Keimzellmarkern gefärbt. Färbungen mit den Keimzellmarkern Oct-4 und GCNA zeigen, dass die Keimzellen tatsächlich zwischen E7,5 und E8,5 verloren gehen, folglich sind am Tag E11,5 keine Keimzellen in den Genitalanlagen detektierbar. Damit konnte gezeigt werden, dass die primordialen Keimzellen der AP-2 γ -defizienten Tiere nicht migrieren. Sie gehen nach der Spezifizierung und vor der Migration verloren.

Während der Phase um den Tag 8,0 der Embryonalentwicklung werden in den Keimzellen verschiedenste Gene exprimiert (Yabuta et al. 2006). Untersucht wurde dies in einer Studie, in der quantitative RT-PCRs aus einzelnen Keimzellen und somatischen Zellen durchgeführt wurden.

Es wurden unter anderem die Pluripotenz-assoziierten Gene *Sox2*, *Oct-4* und *Nanog* untersucht. Es konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass diese Gene dafür verantwortlich sind, embryonale Stammzellen in einem pluripotenten Zustand zu halten und Differenzierung zu unterdrücken. Dabei binden sie als Komplex an die Promotoren verschiedener Zielgene und beeinflussen so deren Expression (Boyer et al. 2005). Interessanterweise wurde bei dieser Analyse auch AP-2 γ gefunden. Demnach binden Sox2, Oct-4 und Nanog an den AP-2 γ -Promotor und unterdrücken so die Expression in Embryonalen Stammzellen. Das geht mit Untersuchungen im eigenen Labor einher, wonach AP-2 γ in murinen embryonalen Stammzellen nicht exprimiert wird. Eine Expression von AP-2 γ findet sich erst, wenn die Stammzellen differenzieren.

Da es sich bei primordialen Keimzellen auch um Zellen mit einem hohen Differenzierungspotential handelt, ist es nicht verwunderlich, dass auch hier die Gene *Sox2*, *Oct-4* und *Nanog* zwischen Tag 7,0 und 8,25 exprimiert werden (Yabuta et al. 2006). Ein Unterschied zu Embryonalen Stammzellen besteht hier allerdings in der Expression von AP-2 γ , da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass AP-2 γ in den primordialen Keimzellen ab Tag 7,5 der Embryonalentwicklung exprimiert wird. Entweder handelt es sich bei der Pluripotenzerhaltung der Keimzellen um einen anderen Mechanismus als in Embryonalen Stammzellen, oder aber primordiale Keimzellen exprimieren AP-2 γ neben den erwähnten Pluripotenz-assoziierten Genen, da es sich um Zellen handelt, die die Stammzellnische bereits verlassen haben. Man kann hier davon ausgehen, dass AP-2 γ benötigt wird, um die weitere Differenzierung zu unterdrücken. Dies konnte bereits für AP-2 α gezeigt werden, wobei ein Modell aufgestellt wurde, nachdem AP-2-Gene die Differenzierung unterdrücken und Apoptose verhindern (Pfisterer et al. 2002). Eine weitere Parallele zwischen AP-2 γ und

AP-2 α besteht in der Tatsache, dass *AP-2 α* in migrierenden Neuralleistenstammzellen exprimiert wird (Mitchell et al. 1991), so dass man spekulieren kann, dass *AP-2 γ* bei der Wanderung der Keimzellen ähnliche Funktionen erfüllt wie *AP-2 α* bei der Migration der Neuralleistenzellen.

Für den Verlust der Keimzellen in den *AP-2 γ* -defizienten Tieren gibt es zwei Möglichkeiten. Einerseits könnten die Keimzellen durch Apoptose sterben, andererseits könnten sie zu somatischen Zellen differenzieren und somit ihren Keimzellcharakter verlieren. Beide Phänomene sind in Keimzellen bereits beschrieben.

Apoptose in den Keimzellen ist ein Prozess, der nicht nur durch Gendefekte ausgelöst werden kann, sondern auch natürlicherweise vorkommt. So sterben Keimzellen, die entlang des Migrationsweges verbleiben oder in andere Gewebe als die Genitalanlagen fehlmigrieren durch das pro-apoptotische Gen *bax* (Stallock et al. 2003). Außerdem kommt es in den Genitalanlagen zu zwei Apoptosewellen, bei denen ungefähr die Hälfte der Keimzellen verloren geht (Borum 1961; Beaumont und Mandl 1963; Roosen-Runge und Leik 1968; Bakken und McClanahan 1978; Coucouvanis et al. 1993).

Apoptose in Keimzellen von Tieren, die einen Gendefekt tragen, ist für die keimzellspezifische Ablation von *Oct-4* beschrieben. In diesen Tieren migrieren die Keimzellen zu den Genitalanlagen und weisen eine mit Wildtyptieren vergleichbare Anzahl an Keimzellen auf. Nach der Ankunft in den Genitalanlagen um den Tag 10,5 der Embryonalentwicklung sterben die Keimzellen allerdings durch Apoptose. Interessanterweise verläuft die Keimzellentwicklung vorher völlig normal, obwohl *Oct-4* bereits ab Tag 7,0 der Embryonalentwicklung in den Keimzellen exprimiert wird (Kehler et al. 2004).

Ein anderes Beispiel für einen Gendefekt, der zur Apoptose von Keimzellen führt, ist die *Connexin43*-Nullmutante (Francis und Lo 2006). Hier sterben die Keimzellen am Tag 11,5 der Embryonalentwicklung. Verantwortlich für die hohe Apoptoserate ist eine erhöhte Aktivität von p53. Außerdem zeigen die Keimzellen eine verminderte Aktivität an β 1-Integrin. Dies führt vermutlich dazu, dass die Keimzellen in den Genitalanlagen nicht mit den somatischen Zellen in Kontakt treten können und deshalb absterben (Francis und Lo 2006).

Einen Hinweis auf den Zusammenhang von AP-2 und vermehrter Apoptoserate geben die Nullmutanten von *AP-2 α* und *AP-2 β* . In beiden Fällen wurden in den betroffenen Geweben vermehrt Apoptosen gefunden (Schorle et al. 1996; Zhang et al. 1996; Moser et al. 1997)

Bei der Spezifizierung der Keimzellen spielt vor allem die Repression von *Hox* Genen eine Rolle, da diese Repression die Keimzellen von den somatischen Zellen unterscheidet (Saitou et al. 2002).

Die Differenzierung von Keimzellen zu somatischen Zellen konnte für *Blimp-1*-defiziente Mäuse gezeigt werden. Bei *Blimp1* handelt es sich um einen transkriptionellen Repressor, der bereits ab Tag 6,25 der Embryonalentwicklung in den Vorläufern der primordialen Keimzellen exprimiert wird (Ohinata et al. 2005). *Blimp1*-defiziente Tiere zeigen einen Keimzellverlust um den Tag 8,5 der Embryonalentwicklung. Es befinden sich zu diesem Zeitpunkt nur wenige Keimzellen an der Basis der Allantois, die Keimzellmigration wird nicht eingeleitet.

Aufgrund dieser frühen Expression und der Tatsache, dass primordiale Keimzellen, denen *Blimp1* fehlt, *Hox*-Gene nicht mehr reprimieren können, geht man davon aus, dass diese Zellen zu somatischen Zellen differenzieren und ihren Keimzellcharakter verlieren (Ohinata et al. 2005).

Ferner existiert ein Zusammenhang zwischen AP-2 und *Hoxa2*. So ist AP-2 α in der Lage, *Hox2a* in Neuralleistenzellen zu regulieren, was durch Promotorstudien gezeigt werden konnte (Maconochie et al. 1999).

Damit gibt es sowohl Hinweise, dass AP-2 γ -defiziente Keimzellen durch Apoptose sterben könnten, oder dass sie zu somatischen Zellen differenzieren.

4.4 *Kit*, ein Zielgen von AP-2 γ ?

Als potentielles Zielgen von AP-2 γ wurde *Kit* ausgewählt. Dafür gibt es mehrere Gründe: Zum einen wird *Kit* -analog zu AP-2 γ - bereits am Tag 7,5 der Embryonalentwicklung in den murinen Keimzellen exprimiert (Manova und Bachvarova 1991). Die Expression bleibt während der weiteren Keimzellentwicklung bestehen und ist sogar in adulten Gonaden zu finden (Dym et al. 1995). *Kit*-defiziente Mäuse zeigen einen Keimzellverlust um Tag 9,0 der Embryonalentwicklung (Buehr et al. 1993). Obwohl die Expression von *Kit* nicht ganz analog zur Expression von AP-2 γ verläuft, gibt es noch weitere Gründe, die für eine AP-2 γ -abhängige Regulierung von *Kit* sprechen. In humanen Keimzellen konnte gezeigt werden, dass beide Gene co-exprimiert werden (Pauls et al. 2005). Außerdem gibt es Promotorstudien, die eine AP-2 α -vermittelte Transaktivierung von *Kit* in humanen Melanomzellen zeigen (Huang et al. 1998).

Hier konnte keine AP-2 γ -abhängige Transaktivierung von *Kit* gezeigt werden, dies kann mehrere Ursachen haben. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass AP-2 α *Kit*

transaktivieren kann (Huang et al. 1998), allerdings haben die AP-2-Proteine unterschiedliche Bindungsaffinitäten für ihre Zielgene (Bosher et al. 1996). So existieren AP-2-Bindestellen in den Promotoren der basalen Keratine *K5* und *K14*, an die AP-2 α und AP-2 β stärker binden als AP-2 γ . Allerdings zeigt AP-2 γ die höchste Transaktivierung der Keratine im Vergleich zu AP-2 α und AP-2 β (persönliche Kommunikation).

Des Weiteren handelt es sich bei den HepG2-Zellen um ein artifizielles System, welches keine Verbindung zu Keimzellen aufweist. Die Zellen entstammen einem hepatozellulären Karzinom, es handelt sich also um eine humane Lebertumorzelllinie. Deshalb könnte es sein, dass Co-Faktoren, die für die AP-2 γ -abhängige Regulation von *Kit* in den murinen Keimzellen wichtig sind, in diesem System fehlen. Solche Co-Faktoren sind z.B. Mitglieder der Cited-Familie, die die AP-2-abhängige Transaktivierung von Genen verstärken. Es konnte gezeigt werden, dass Cited2 AP-2 γ stärker co-aktiviert als AP-2 α und AP-2 β . Cited2-defiziente Fibroblasten zeigen einen allgemeinen Defekt in AP-2-abhängiger Transaktivierung. Auch Cited4, ein weiteres Mitglied dieser Familie, co-aktiviert AP-2-Isoformen, wobei hier keine Spezifität gegenüber den einzelnen AP-2s beobachtet werden konnte (Braganca et al. 2002).

Ein besseres System würde eine murine Keimzellkultur darstellen. Allerdings gibt es keine Keimzelllinie, die sich für solche Versuche eignet. Es ist zwar technisch möglich, primordiale Keimzellen aus den Genitalanlagen von Mäusen zu isolieren und in Kultur zu nehmen (Matsui et al. 1991), allerdings handelt es sich dabei um eine Primärkultur. Primordiale Keimzellen in Kultur wandeln sich außerdem zu sog. Embryonalen Keimzellen, die eher mit Embryonalen Stammzellen als mit Keimzellen zu vergleichen sind (Surani 2001; Donovan und de Miguel 2003). Außerdem lassen sich diese Zellen nur sehr schwer transfizieren, die Transfektionseffizienzen sind so gering, dass sie sich nicht für Promotorstudien eignen (eigene Beobachtung).

Ein weiterer Ansatzpunkt wäre die Verwendung einer Keimzelltumorzelllinie, wie z. B. den JKT-1. Diese Zellen sind als Seminomzelllinie beschrieben (Kinugawa et al. 1998), allerdings konnte u.a. in unserem Labor gezeigt werden, dass es sich nicht um eine Seminomzelllinie handelt (unveröffentlichte Daten).

4.5 Keimzelltumore in AP-2 γ heterozygoten Tieren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem der Effekt der Gendosis auf die Entwicklung der murinen Keimzellen untersucht. Dazu wurden AP-2 γ heterozygote Tiere in den genetischen Hintergrund 129/SV eingekreuzt.

Männliche AP-2 γ heterozygote Tiere entwickeln im 129/SV-Hintergrund mit einer Inzidenz von 95% Teratome. In Wildtyptieren dieses Hintergrundes treten Teratome mit einer Wahrscheinlichkeit von 1-10% im Alter von ca. 3 Wochen auf (Stevens und Hummel 1957). Deshalb eignet sich dieser genetische Hintergrund besonders gut für die Analyse von Keimzelltumoren, da hier eine gewisse Anfälligkeit für diese Art von Tumoren besteht.

Die Teratome traten immer intragonadal auf, was bedeutet, dass eine Kopie von AP-2 γ ausreicht, die Migration der Keimzellen einzuleiten und ein Einwandern in die Genitalanlagen zu gewährleisten. Erst in den Genitalanlagen kommt es zu einem Ereignis, was zur Bildung des Tumors führt.

Bis heute sind nur wenige Mausmodelle bekannt, die zu einer Teratombildung im Tier führen. Mäuse, denen das Tumorsuppressorgen *Pten* in den Keimzellen fehlt, entwickeln bilaterale Teratome bereits in der Embryonalentwicklung. Hier wurde erhöhte Anzahl an mitotischen Keimzellen beobachtet. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *Pten*-defiziente Keimzellen in Kultur verstärkt proliferieren (Kimura et al. 2003).

Ein weiteres Beispiel für ein Mausteratommodell ist die TER-Mutation im *Dnd1*-Gen (Youngren et al. 2005). Durch diese Punktmutation wird im *Dnd1*-Gen ein Stop-Codon inseriert, was zum Abbruch der Transkription führt. Dadurch kann das Dnd1-Protein nicht gebildet werden. Mäuse, die diese Mutation homozygot tragen, entwickeln Teratome mit einer Inzidenz von 100% im 129/SV-Hintergrund. Im genetisch gemischten Hintergrund aus 129/SV und C57Bl6 kommt es zum Keimzellverlust und zur Ausprägung eines Sertoli-Cell-Only-Syndroms, wie es auch bei den AP-2 γ -defizienten Mäusen zu beobachten ist. Dnd1 besitzt ein RNA-Erkennungsmotiv und hat große Ähnlichkeit mit dem Apobec Komplementationsfaktor (ACF), einer Komponente des „Cytidin zu Uridin-RNA-Edierungskomplexes“, weswegen man vermutet, dass die Tumorentstehung in Verbindung mit abweichender Nukleinsäure-Edierung steht (Youngren et al. 2005).

Obwohl Mutationen in *Pten*, *Dnd1* und AP-2 γ zu einer verstärkten Teratombildung führen, gibt es bis heute keine Hinweise darauf, dass diese Gene in einem molekularen Zusammenhang stehen. Die Möglichkeit, dass *PTEN* ein Zielgen von AP-2 γ sein könnte,

wurde ausgeschlossen, da es im *Pten*-Promotor keine Bindestellen für AP-2 gibt. Auch im *Dnd1*-Promotor konnten keine AP-2-Bindestellen gefunden werden.

Die Teratome in den heterozygoten *AP-2 γ* Männchen traten erst in der 7. Generation im 129/SV-Hintergrund auf. In einem gemischten Hintergrund aus 129/SV und C57Bl6 konnten keine Teratome gefunden werden, die Hoden entwickelten sich normal und die Tiere zeigten keinerlei Defekte. Es scheint also, als würde der Verlust eines *AP-2 γ* -Allels nur mit der genetischen Disposition des 129/SV-Hintergrundes zusammen zur Tumorentstehung führen. Dies wird auch in *p53*-defizienten Mäusen beobachtet. Neben anderen Tumoren entwickeln *p53*-defiziente Mäuse Teratome, wenn man sie in den 129/SV-Hintergrund einkreuzt, nicht aber in einem gemischten Hintergrund aus 129/SV und C57Bl6. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine direkte Interaktion zwischen *p53* und *AP-2 α* besteht, die zu einer Zunahme der durch *p53* vermittelten transkriptionellen Aktivierung führt (McPherson et al. 2002). Des Weiteren handelt es sich bei *AP-2 α* und *AP-2 γ* um Zielgene von *p53*, wie durch Promotorstudien gezeigt werden konnte (Li et al. 2006).

Der Mechanismus, der in den heterozygoten *AP-2 γ* Männchen zur Teratombildung führt, ist nicht geklärt. Allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass embryonale Keimzellen heterozygoter Tiere in Kultur verstärkt proliferieren. Diese verstärkte Proliferation wird auch bei *PTEN*-defizienten Keimzellen, im Vergleich zu Wildtypzellen, beobachtet (Kimura et al. 2003). Damit ist der Mechanismus der Tumorentstehung zwar nicht geklärt, allerdings bietet diese erhöhte Proliferationsaktivität einen Hinweis zur Entstehung der Teratome.

Die Tatsache, dass ein gesundes Allel nicht ausreicht, um die Teratomentstehung zu verhindern, deutet darauf hin, dass beide Kopien von *AP-2 γ* für eine korrekte Keimzellentwicklung benötigt werden.

Außerdem existiert ein weiterer Zusammenhang zwischen *AP-2 γ* und Keimzelltumoren. So wird *AP-2 γ* in Seminomen exprimiert (Hoei-Hansen et al. 2004; Pauls et al. 2005). Diese Expression, die im Gegensatz zum Normalgewebe steht, da *AP-2 γ* nicht in adulten Hoden exprimiert wird, gibt einen weiteren Hinweis auf die zentrale Rolle von *AP-2 γ* bei der Keimzelltumorentstehung. Obwohl bis heute nicht gezeigt werden konnte, dass *AP-2 γ* ein direkter Auslöser der Seminomentstehung ist, kann aber spekuliert werden, dass die fehlende Herunterregulierung von *AP-2 γ* mit fortschreitender Differenzierung der Keimzellen für die Tumorentstehung von entscheidender Bedeutung ist.

4.6 Modell zur Rolle von AP-2 γ in Keimzellentwicklung und Keimzelltumorentstehung

Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen und bereits bekannten Ergebnissen lässt sich ein Modell ableiten, welches die Rolle von AP-2 γ in Keimzellentwicklung und Keimzelltumorentstehung widerspiegelt (Abb. 38).

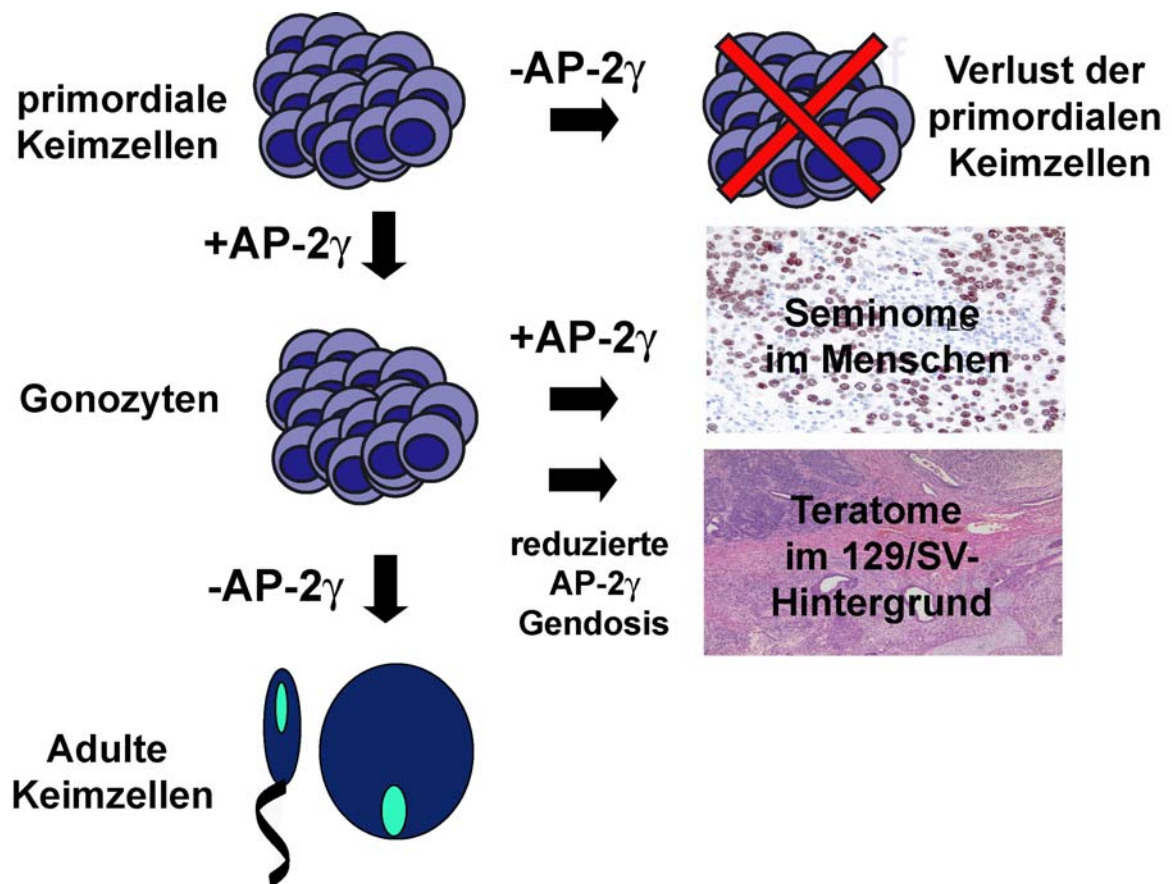


Abbildung 38: **Modell zur Rolle von AP-2 γ in Keimzellentwicklung und Keimzelltumorentstehung**

AP-2 γ unterdrückt die Differenzierung in den primordiale Keimzellen. Durch eine korrekte Gendosis kommt es zur Migration der Keimzellen in die Genitalanlagen und anschließender Differenzierung zu Präspmatogonien und Oogonien. Zu diesem Zeitpunkt nimmt die AP-2 γ -Expression ab und AP-2 γ kann mit fortschreitender Keimzeldifferenzierung nicht mehr nachgewiesen werden.

Die Spezifizierung der primordialen Keimzellen wird von AP-2 γ nicht beeinflusst, da sich am Tag 7,5 der Embryonalentwicklung Keimzellen an der Basis der Allantois nachweisen lassen. Ein Verlust von AP-2 γ führt zu einem Verlust der primordialen Keimzellen in der frühen Embryogenese, die Keimzellmigration wird nicht eingeleitet.

Fehlt ein AP-2 γ -Allel migrieren die primordialen Keimzellen in die Genitalanlagen, dort kommt es in den Hoden stochastisch zu einer „Aktivierung“ der Pluripotenz und damit zum Teratom (analog zu embryonalen Stammzellen).

Wird AP-2 γ mit fortschreitender Differenzierung nicht herunterreguliert oder wird die weitere Differenzierung der Keimzellen nicht eingeleitet, kommt es zur Entartung der Zelle, die in einer intratubulären Keimzellneoplasie und einem Seminom endet. Inwieweit AP-2 γ an der Seminomentstehung direkt beteiligt ist, ist bis heute nicht bekannt.

Dieses Modell wird durch ein Modell unterstützt, wonach Gene, die in der Embryonalentwicklung in Keimzellen exprimiert werden und mit fortschreitender Differenzierung nicht herunterreguliert werden, in intratubulären Keimzellneoplasien und Seminomen wieder zu finden sind. Verantwortlich für die Tumorentstehung ist wahrscheinlich die fehlende Differenzierung, die aufgrund der Persistenz der Genexpression nicht eingeleitet wird (Rajpert-De Meyts et al. 1998).

Zusammengefasst deuten all diese Ergebnisse darauf hin, dass AP-2 γ Zellen in einem proliferativen Zustand hält und die terminale Differenzierung verhindert. Wird AP-2 γ während der Differenzierung nicht herunterreguliert, kann es zu einer Fehlprogrammierung der Zelle kommen, die schließlich zu einer Tumorzelle führt.

4.7 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit ebnen den Weg für die weitere Untersuchung der Rolle von AP-2 γ in der Keimzellentwicklung und der Entstehung von Keimzelltumoren.

Durch die Analyse konditional-defizienter AP-2 γ -Tiere konnte gezeigt werden, dass AP-2 γ in der frühen Keimzellentwicklung eine entscheidende Rolle spielt. Der Verlust von AP-2 γ führt zum Verlust der Keimzellen.

Um den Verlust der Keimzellen genauer zu untersuchen, wäre es hilfreich, die Keimzellen zu markieren, um so ihre Entwicklung näher betrachten zu können. Dies könnte durch Einkreuzen der Oct-4-GFP-Mäuse (Anderson et al. 2000) in die AP-2 γ^{flox} -Linie geschehen. Diese Mäuse exprimieren das grün-fluoreszierende Protein (GFP) unter der Kontrolle des Oct-4-Promotors. Dadurch kommt es zu einer Fluoreszenz in den Keimzellen. Durch Verpaarung der Oct4-GFP-Mäuse mit AP-2 γ^{flox} -Mäusen und Cre-Mäusen könnte die Keimzellentwicklung in den AP-2 γ -defizienten Tieren genauer studiert werden.

Durch Isolierung von Keimzellen aus Embryonen, die sowohl Oct4-GFP, als auch AP-2 γ^{flox} tragen, könnte ein Zellkultursystem entwickelt werden, in welchem man AP-2 γ nachträglich durch Cre-Transduktion ausschalten könnte. Dadurch könnte das Verhalten der AP-2 γ -defizienten Keimzellen näher untersucht werden. Eine Analyse der Zielgene von AP-2 γ mittels Microarray-Technologie würde sich anbieten.

Die Rolle von AP-2 γ bei der Entstehung von Keimzelltumoren lässt sich mit Hilfe der 129/SV-AP-2 γ heterozygoten Tiere näher charakterisieren. Hier wäre es interessant, den Entstehungszeitpunkt der Tumoren eingehender zu untersuchen und die teratombildenden Zellen näher zu studieren. Dabei könnten sowohl immunhistochemische Analysen mit verschiedenen Markern für frühe Keimzelltumoren als auch molekularbiologische Analysen des Expressionsmusters dieser Zellen durchgeführt werden.

Um einen genaueren Aufschluss über den Zusammenhang von AP-2 γ bei der Seminomentstehung zu bekommen, könnte ein Mausmodell etabliert werden, welches AP-2 γ unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors überexprimiert. Dieser Promotor sollte keimzell-spezifisch sein und keine Gene in anderen Geweben regulieren. Der Zeitpunkt der Expression müsste um den Zeitpunkt der Differenzierung von Gonozyten zu

Präpermatogonien in der späten Embryogenese liegen. Würde die Expression von AP-2 γ unter der Kontrolle eines solchen Promotors zur Seminomentstehung führen, könnte diese genau analysiert werden. Außerdem wäre es möglich, in der frühen Phase der Tumorentstehung nach weiteren Genen zu suchen, die an der Seminomentstehung beteiligt sind.

5. Literaturverzeichnis

- Adami HO, Bergstrom R, Mohnher M, Zatonski W, Storm H, Ekbohm A, Tretli S, Teppo L, Ziegler H, Rahu M, et al. (1994) Testicular cancer in nine northern European countries. *Int J Cancer* 59(1): 33-38.
- Anderson R, Copeland TK, Scholer H, Heasman J, Wylie C (2000) The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech Dev* 91(1-2): 61-68.
- Anderson R, Fassler R, Georges-Labouesse E, Hynes RO, Bader BL, Kreidberg JA, Schaible K, Heasman J, Wylie C (1999) Mouse primordial germ cells lacking beta1 integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development* 126(8): 1655-1664.
- Auman HJ, Nottoli T, Lakiza O, Winger Q, Donaldson S, Williams T (2002) Transcription factor AP-2gamma is essential in the extra-embryonic lineages for early postimplantation development. *Development* 129(11): 2733-2747.
- Bakken AH, McClanahan M (1978) Patterns of RNA synthesis in early meiotic prophase oocytes from fetal mouse ovaries. *Chromosoma* 67(1): 21-40.
- Bauer R, McGuffin ME, Mattox W, Tainsky MA (1998) Cloning and characterization of the Drosophila homologue of the AP-2 transcription factor. *Oncogene* 17(15): 1911-1922.
- Beaumont HM, Mandl AM (1963) A Quantitative Study Of Primordial Germ Cells In The Male Rat. *J Embryol Exp Morphol* 11: 715-740.
- Besmer P, Manova K, Duttlinger R, Huang EJ, Packer A, Gyssler C, Bachvarova RF (1993) The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev Suppl*: 125-137.
- Bortvin A, Goodheart M, Liao M, Page DC (2004) Dppa3 / Pgc7 / stella is a maternal factor and is not required for germ cell specification in mice. *BMC Dev Biol* 4: 2.
- Borum K (1961) Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Exp Cell Res* 24: 495-507.
- Bosher JM, Totty NF, Hsuan JJ, Williams T, Hurst HC (1996) A family of AP-2 proteins regulates c-erbB-2 expression in mammary carcinoma. *Oncogene* 13(8): 1701-1707.
- Bouillet P, Oulad-Abdelghani M, Vicaire S, Garnier JM, Schuhbauer B, Dolle P, Chambon P (1995) Efficient cloning of cDNAs of retinoic acid-responsive genes in P19 embryonal carcinoma cells and characterization of a novel mouse gene, Stra1 (mouse LERK-2/Eplg2). *Dev Biol* 170(2): 420-433.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA (2005) Core

- transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122(6): 947-956.
- Braganca J, Swingler T, Marques FI, Jones T, Eloranta JJ, Hurst HC, Shioda T, Bhattacharya S (2002) Human CREB-binding protein/p300-interacting transactivator with ED-rich tail (CITED) 4, a new member of the CITED family, functions as a co-activator for transcription factor AP-2. *J Biol Chem* 277(10): 8559-8565.
- Buehr M, McLaren A, Bartley A, Darling S (1993) Proliferation and migration of primordial germ cells in *We/We* mouse embryos. *Dev Dyn* 198(3): 182-189.
- Capecchi MR (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244(4910): 1288-1292.
- Cattanach BM, Iddon CA, Charlton HM, Chiappa SA, Fink G (1977) Gonadotrophin-releasing hormone deficiency in a mutant mouse with hypogonadism. *Nature* 269(5626): 338-340.
- Chazaud C, Oulad-Abdelghani M, Bouillet P, Decimo D, Chambon P, Dolle P (1996) AP-2.2, a novel gene related to AP-2, is expressed in the forebrain, limbs and face during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 54(1): 83-94.
- Chiquoine AD (1954) The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat Rec* 118(2): 135-146.
- Cooke HJ, Saunders PT (2002) Mouse models of male infertility. *Nat Rev Genet* 3(10): 790-801.
- Coucouvani EC, Sherwood SW, Carswell-Crumpton C, Spack EG, Jones PP (1993) Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. *Exp Cell Res* 209(2): 238-247.
- De Felici M, Scaldaferrri ML, Lobascio M, Iona S, Nazzicone V, Klinger FG, Farini D (2004) Experimental approaches to the study of primordial germ cell lineage and proliferation. *Hum Reprod Update* 10(3): 197-206.
- de Sousa Lopes SM, Roelen BA, Monteiro RM, Emmens R, Lin HY, Li E, Lawson KA, Mummery CL (2004) BMP signaling mediated by ALK2 in the visceral endoderm is necessary for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 18(15): 1838-1849.
- Donovan PJ, de Miguel MP (2003) Turning germ cells into stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 13(5): 463-471.
- Duan C, Plisetskaya EM, Dickhoff WW (1995) Expression of insulin-like growth factor I in normally and abnormally developing coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Endocrinology* 136(2): 446-452.

- Dym M, Jia MC, Dirami G, Price JM, Rabin SJ, Mocchetti I, Ravindranath N (1995) Expression of c-kit receptor and its autophosphorylation in immature rat type A spermatogonia. *Biol Reprod* 52(1): 8-19.
- Dymecki SM (1996) Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(12): 6191-6196.
- Eckert D, Buhl S, Weber S, Jager R, Schorle H (2005) The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol* 6(13): 246.
- Enders GC, May JJ, 2nd (1994) Developmentally regulated expression of a mouse germ cell nuclear antigen examined from embryonic day 11 to adult in male and female mice. *Dev Biol* 163(2): 331-340.
- Feng W, Williams T (2003) Cloning and characterization of the mouse AP-2 epsilon gene: a novel family member expressed in the developing olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci* 24(2): 460-475.
- Fotovati A, Nakayama K, Nakayama KI (2006) Impaired germ cell development due to compromised cell cycle progression in Skp2-deficient mice. *Cell Div* 1: 4.
- Francis RJ, Lo CW (2006) Primordial germ cell deficiency in the connexin 43 knockout mouse arises from apoptosis associated with abnormal p53 activation. *Development* 133(17): 3451-3460.
- Fuchs E, Byrne C (1994) The epidermis: rising to the surface. *Curr Opin Genet Dev* 4(5): 725-736.
- Ginsburg M, Snow MH, McLaren A (1990) Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110(2): 521-528.
- Gobel U, Schneider DT, Calaminus G, Haas RJ, Schmidt P, Harms D (2000) Germ-cell tumors in childhood and adolescence. GPOH MAKEI and the MAHO study groups. *Ann Oncol* 11(3): 263-271.
- Gu W, Tekur S, Reinbold R, Eppig JJ, Choi YC, Zheng JZ, Murray MT, Hecht NB (1998) Mammalian male and female germ cells express a germ cell-specific Y-Box protein, MSY2. *Biol Reprod* 59(5): 1266-1274.
- Hayashi S, Lewis P, Pevny L, McMahon AP (2002) Efficient gene modulation in mouse epiblast using a Sox2Cre transgenic mouse strain. *Mech Dev* 119 Suppl 1: S97-S101.
- Hilger-Eversheim K, Moser M, Schorle H, Buettner R (2000) Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene* 260(1-2): 1-12.
- Hoei-Hansen CE, Rajpert-De Meyts E, Carlsen E, Almstrup K, Leffers H, Skakkebaek NE (2005) A subfertile patient diagnosed with testicular carcinoma in situ by

- immunocytological staining for AP-2gamma in semen samples: case report. *Hum Reprod* 20(3): 579-582.
- Hoei-Hansen CE, Nielsen JE, Almstrup K, Sonne SB, Graem N, Skakkebaek NE, Leffers H, Rajpert-De Meyts E (2004) Transcription factor AP-2gamma is a developmentally regulated marker of testicular carcinoma in situ and germ cell tumors. *Clin Cancer Res* 10(24): 8521-8530.
- Holm M, Rajpert-De Meyts E, Andersson AM, Skakkebaek NE (2003) Leydig cell micronodules are a common finding in testicular biopsies from men with impaired spermatogenesis and are associated with decreased testosterone/LH ratio. *J Pathol* 199(3): 378-386.
- Huang S, Jean D, Luca M, Tainsky MA, Bar-Eli M (1998) Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. *Embo J* 17(15): 4358-4369.
- Jager R, Werling U, Rimpf S, Jacob A, Schorle H (2003) Transcription factor AP-2gamma stimulates proliferation and apoptosis and impairs differentiation in a transgenic model. *Mol Cancer Res* 1(12): 921-929.
- Jaruzelska J, Kotecki M, Kusz K, Spik A, Firpo M, Reijo Pera RA (2003) Conservation of a Pumilio-Nanos complex from Drosophila germ plasm to human germ cells. *Dev Genes Evol* 213(3): 120-126.
- Jean D, Gershenwald JE, Huang S, Luca M, Hudson MJ, Tainsky MA, Bar-Eli M (1998) Loss of AP-2 results in up-regulation of MCAM/MUC18 and an increase in tumor growth and metastasis of human melanoma cells. *J Biol Chem* 273(26): 16501-16508.
- Jeppsson A, Wahren B, Brehmer-Andersson E, Silfversward C, Stigbrand T, Millan JL (1984) Eutopic expression of placental-like alkaline phosphatase in testicular tumors. *Int J Cancer* 34(6): 757-761.
- Jorgensen N, Giwercman A, Muller J, Skakkebaek NE (1993) Immunohistochemical markers of carcinoma in situ of the testis also expressed in normal infantile germ cells. *Histopathology* 22(4): 373-378.
- Kehler J, Tolkunova E, Koschorz B, Pesce M, Gentile L, Boiani M, Lomeli H, Nagy A, McLaughlin KJ, Scholer HR, Tomilin A (2004) Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep* 5(11): 1078-1083.
- Keshet E, Lyman SD, Williams DE, Anderson DM, Jenkins NA, Copeland NG, Parada LF (1991) Embryonic RNA expression patterns of the c-kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *Embo J* 10(9): 2425-2435.

- Kimura T, Suzuki A, Fujita Y, Yomogida K, Lomeli H, Asada N, Ikeuchi M, Nagy A, Mak TW, Nakano T (2003) Conditional loss of PTEN leads to testicular teratoma and enhances embryonic germ cell production. *Development* 130(8): 1691-1700.
- Kinugawa K, Hyodo F, Matsuki T, Jo Y, Furukawa Y, Ueki A, Tanaka H (1998) Establishment and characterization of a new human testicular seminoma cell line, JKT-1. *Int J Urol* 5(3): 282-287.
- Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC (2006) Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(8): 2474-2479.
- Kramer PR, Krishnamurthy R, Mitchell PJ, Wray S (2000) Transcription factor activator protein-2 is required for continued luteinizing hormone-releasing hormone expression in the forebrain of developing mice. *Endocrinology* 141(5): 1823-1838.
- Kwan KM (2002) Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis* 32(2): 49-62.
- Lakso M, Sauer B, Mosinger B, Jr., Lee EJ, Manning RW, Yu SH, Mulder KL, Westphal H (1992) Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(14): 6232-6236.
- Lawson KA, Hage WJ (1994) Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found Symp* 182: 68-84; discussion 84-91.
- Li H, Watts GS, Oshiro MM, Futscher BW, Domann FE (2006) AP-2alpha and AP-2gamma are transcriptional targets of p53 in human breast carcinoma cells. *Oncogene* 25(39): 5405-5415.
- Lomeli H, Ramos-Mejia V, Gertsenstein M, Lobe CG, Nagy A (2000) Targeted insertion of Cre recombinase into the TNAP gene: excision in primordial germ cells. *Genesis* 26(2): 116-117.
- Looijenga LH, Stoop H, de Leeuw HP, de Gouveia Brazao CA, Gillis AJ, van Roozendaal KE, van Zoelen EJ, Weber RF, Wolffenbuttel KP, van Dekken H, Honecker F, Bokemeyer C, Perlman EJ, Schneider DT, Kononen J, Sauter G, Oosterhuis JW (2003) POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res* 63(9): 2244-2250.
- Lüllmann-Rauch Histologie.
- MacGregor GR, Zambrowicz BP, Soriano P (1995) Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells. *Development* 121(5): 1487-1496.

- Maconochie M, Krishnamurthy R, Nonchev S, Meier P, Manzanares M, Mitchell PJ, Krumlauf R (1999) Regulation of *Hoxa2* in cranial neural crest cells involves members of the AP-2 family. *Development* 126(7): 1483-1494.
- Manova K, Bachvarova RF (1991) Expression of *c-kit* encoded at the *W* locus of mice in developing embryonic germ cells and presumptive melanoblasts. *Dev Biol* 146(2): 312-324.
- Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL (1992) Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70(5): 841-847.
- Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, Williams D, Zsebo K, Hogan BL (1991) Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* 353(6346): 750-752.
- McLaren A (1984) Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symp Soc Exp Biol* 38: 7-23.
- McLaren A (2003) Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol* 262(1): 1-15.
- McPherson LA, Baichwal VR, Weigel RJ (1997) Identification of ERF-1 as a member of the AP2 transcription factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9): 4342-4347.
- McPherson LA, Loktev AV, Weigel RJ (2002) Tumor suppressor activity of AP2alpha mediated through a direct interaction with p53. *J Biol Chem* 277(47): 45028-45033.
- Mitchell PJ, Wang C, Tjian R (1987) Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen. *Cell* 50(6): 847-861.
- Mitchell PJ, Timmons PM, Hebert JM, Rigby PW, Tjian R (1991) Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev* 5(1): 105-119.
- Mohibullah N, Donner A, Ippolito JA, Williams T (1999) SELEX and missing phosphate contact analyses reveal flexibility within the AP-2[alpha] protein: DNA binding complex. *Nucleic Acids Res* 27(13): 2760-2769.
- Moser M, Imhof A, Pscherer A, Bauer R, Amselgruber W, Sinowatz F, Hofstadter F, Schule R, Buettner R (1995) Cloning and characterization of a second AP-2 transcription factor: AP-2 beta. *Development* 121(9): 2779-2788.
- Moser M, Pscherer A, Roth C, Becker J, Mucher G, Zerres K, Dixkens C, Weis J, Guay-Woodford L, Buettner R, Fassler R (1997) Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2beta. *Genes Dev* 11(15): 1938-1948.
- Noguchi T, Noguchi M (1985) A recessive mutation (*ter*) causing germ cell deficiency and a high incidence of congenital testicular teratomas in 129/Sv-*ter* mice. *J Natl Cancer Inst* 75(2): 385-392.

- Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, Barton SC, Obukhanych T, Nussenzweig M, Tarakhovsky A, Saitou M, Surani MA (2005) Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 436(7048): 207-213.
- Oosterhuis JW, Looijenga LH (2005) Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* 5(3): 210-222.
- Orban PC, Chui D, Marth JD (1992) Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(15): 6861-6865.
- Oulad-Abdelghani M, Bouillet P, Chazaud C, Dolle P, Chambon P (1996) AP-2.2: a novel AP-2-related transcription factor induced by retinoic acid during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res* 225(2): 338-347.
- Pauls K, Jager R, Weber S, Wardelmann E, Koch A, Buttner R, Schorle H (2005) Transcription factor AP-2gamma, a novel marker of gonocytes and seminomatous germ cell tumors. *Int J Cancer* 115(3): 470-477.
- Pfisterer P, Ehlermann J, Hegen M, Schorle H (2002) A subtractive gene expression screen suggests a role of transcription factor AP-2 alpha in control of proliferation and differentiation. *J Biol Chem* 277(8): 6637-6644.
- Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Brondum-Nielsen K, Muller J, Skakkebaek NE (1998) Developmental arrest of germ cells in the pathogenesis of germ cell neoplasia. *Apmis* 106(1): 198-204; discussion 204-196.
- Riede, Schäfer, Wehner Allgemeine und Spezielle Pathologie.
- Roosen-Runge EC, Leik J (1968) Gonocyte degeneration in the postnatal male rat. *Am J Anat* 122(2): 275-299.
- Runyan C, Schaible K, Molyneaux K, Wang Z, Levin L, Wylie C (2006) Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. *Development* 133(24): 4861-4869.
- Saitou M, Barton SC, Surani MA (2002) A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 418(6895): 293-300.
- Sakurai T, Katoh H, Moriwaki K, Noguchi T, Noguchi M (1994) The ter primordial germ cell deficiency mutation maps near Grl-1 on mouse chromosome 18. *Mamm Genome* 5(6): 333-336.
- Sapin V, Bouillet P, Oulad-Abdelghani M, Dastugue B, Chambon P, Dolle P (2000) Differential expression of retinoic acid-inducible (Stra) genes during mouse placentation. *Mech Dev* 92(2): 295-299.
- Schiebler, Peiper, Schneider Histologie.
- Schneider DT, Schuster AE, Fritsch MK, Hu J, Olson T, Lauer S, Gobel U, Perlman EJ (2001) Multipoint imprinting analysis indicates a common precursor cell for gonadal and nongonadal pediatric germ cell tumors. *Cancer Res* 61(19): 7268-7276.

- Schorle H, Meier P, Buchert M, Jaenisch R, Mitchell PJ (1996) Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature* 381(6579): 235-238.
- Shi D, Kellems RE (1998) Transcription factor AP-2gamma regulates murine adenosine deaminase gene expression during placental development. *J Biol Chem* 273(42): 27331-27338.
- Shields JM, Christy RJ, Yang VW (1996) Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem* 271(33): 20009-20017.
- Stallock J, Molyneaux K, Schaible K, Knudson CM, Wylie C (2003) The pro-apoptotic gene Bax is required for the death of ectopic primordial germ cells during their migration in the mouse embryo. *Development* 130(26): 6589-6597.
- Stevens LC, Hummel KP (1957) A description of spontaneous congenital testicular teratomas in strain 129 mice. *J Natl Cancer Inst* 18(5): 719-747.
- Strohmeyer T, Peter S, Hartmann M, Munemitsu S, Ackermann R, Ullrich A, Slamon DJ (1991) Expression of the hst-1 and c-kit protooncogenes in human testicular germ cell tumors. *Cancer Res* 51(7): 1811-1816.
- Subramaniam K, Seydoux G (1999) nos-1 and nos-2, two genes related to *Drosophila* nanos, regulate primordial germ cell development and survival in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 126(21): 4861-4871.
- Surani MA (2001) Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 414(6859): 122-128.
- Tallquist MD, Soriano P (2000) Epiblast-restricted Cre expression in MORE mice: a tool to distinguish embryonic vs. extra-embryonic gene function. *Genesis* 26(2): 113-115.
- Tam PP, Snow MH (1981) Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 64: 133-147.
- Toyoda-Ohno H, Obinata M, Matsui Y (1999) Members of the ErbB receptor tyrosine kinases are involved in germ cell development in fetal mouse gonads. *Dev Biol* 215(2): 399-406.
- Tres LL, Rosselot C, Kierszenbaum AL (2004) Primordial germ cells: what does it take to be alive? *Mol Reprod Dev* 68(1): 1-4.
- Tsuda M, Sasaoka Y, Kiso M, Abe K, Haraguchi S, Kobayashi S, Saga Y (2003) Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science* 301(5637): 1239-1241.
- Tummala R, Romano RA, Fuchs E, Sinha S (2003) Molecular cloning and characterization of AP-2 epsilon, a fifth member of the AP-2 family. *Gene* 321: 93-102.

- Wada N, Chou JY (1993) Characterization of upstream activation elements essential for the expression of germ cell alkaline phosphatase in human choriocarcinoma cells. *J Biol Chem* 268(19): 14003-14010.
- Wang W, Johansson HE, Bergholm UI, Westermark KM, Grimelius LE (1997) Expression of c-Myc, TGF-alpha and EGF-receptor in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Acta Oncol* 36(4): 407-411.
- Wang Y, Newton DC, Miller TL, Teichert AM, Phillips MJ, Davidoff MS, Marsden PA (2002) An alternative promoter of the human neuronal nitric oxide synthase gene is expressed specifically in Leydig cells. *Am J Pathol* 160(1): 369-380.
- Werling U, Schorle H (2002) Conditional inactivation of transcription factor AP-2gamma by using the Cre/loxP recombination system. *Genesis* 32(2): 127-129.
- Werling U, Schorle H (2002) Transcription factor gene AP-2 gamma essential for early murine development. *Mol Cell Biol* 22(9): 3149-3156.
- Williams T, Tjian R (1991) Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev* 5(4): 670-682.
- Williams T, Admon A, Luscher B, Tjian R (1988) Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes Dev* 2(12A): 1557-1569.
- Yabuta Y, Kurimoto K, Ohinata Y, Seki Y, Saitou M (2006) Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biol Reprod* 75(5): 705-716.
- Yamamoto K, Tojo A, Aoki N, Shibuya M (1993) Characterization of the promoter region of the human c-kit proto-oncogene. *Jpn J Cancer Res* 84(11): 1136-1144.
- Yasuda H, Galli SJ, Geissler EN (1993) Cloning and functional analysis of the mouse c-kit promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 191(3): 893-901.
- Ying Y, Qi X, Zhao GQ (2001) Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(14): 7858-7862.
- Ying Y, Liu XM, Marble A, Lawson KA, Zhao GQ (2000) Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol* 14(7): 1053-1063.
- Yomogida K, Ohtani H, Harigae H, Ito E, Nishimune Y, Engel JD, Yamamoto M (1994) Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor GATA-1 in mouse Sertoli cells. *Development* 120(7): 1759-1766.
- Youngren KK, Coveney D, Peng X, Bhattacharya C, Schmidt LS, Nickerson ML, Lamb BT, Deng JM, Behringer RR, Capel B, Rubin EM, Nadeau JH, Martin A (2005) The Ter mutation in the dead end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours. *Nature* 435(7040): 360-364.

- Zeng YX, Somasundaram K, el-Deiry WS (1997) AP2 inhibits cancer cell growth and activates p21WAF1/CIP1 expression. *Nat Genet* 15(1): 78-82.
- Zhang J, Hagopian-Donaldson S, Serbedzija G, Elsemore J, Plehn-Dujowich D, McMahon AP, Flavell RA, Williams T (1996) Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature* 381(6579): 238-241.
- Zhao F, Satoda M, Licht JD, Hayashizaki Y, Gelb BD (2001) Cloning and characterization of a novel mouse AP-2 transcription factor, AP-2delta, with unique DNA binding and transactivation properties. *J Biol Chem* 276(44): 40755-40760.

6. Anhang

6.1 Publikationen

Eckert D, Buhl S, Weber S, Jäger R, Schorle H.

The AP-2 family of transcription factors
Genome Biol. 2005 Dec 6(13): 246.

Pauls K, Jäger R, Weber S, Wardelmann E, Koch A, Büttner R, Schorle H.

Transcription factor AP-2gamma, a novel marker of gonocytes and seminomatous germ cell tumors
Int J Cancer. 2005 Jun 20;115(3):470-7.

Hermann R, Poppe L, Pilbak S, Boden C, Maurer J, Weber S, Lerchl A.

Predicted 3D-structure of melanopsin, the non-rod, non-cone photopigment of the mammalian circadian clock, from Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*).
Neurosci Lett. 2005 Mar 11;376(2):76-80. Epub 2004 Dec 16.

Ehlermann J, Weber S, Pfisterer P, Schorle H.

Cloning, expression and characterization of the murine Efemp1, a gene mutated in Doyme-Honeycomb retinal dystrophy.
Gene Expr Patterns. 2003 Aug;3(4):441-7.

Senderek J, Bergmann C, Weber S, Ketelsen UP, Schorle H, Rudnik-Schoneborn S, Büttner R, Buchheim E, Zerres K.

Mutation of the SBF2 gene, encoding a novel member of the myotubularin family, in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 4B2/11p15.
Hum Mol Genet. 2003 Feb 1;12(3):349-56. Erratum in: Hum Mol Genet. 2004 Feb 1;13(3):363.

6.2 Buchbeiträge

Weber S.

Molekulare Mechanismen in Embryogenese und Krankheitsentstehung.
Gesundheit fördern - Krankheit heilen. Neue Wege im Zusammenwirken von Naturwissenschaft-Medizin-Technik, Ein Almanach junger Wissenschaftler, Hanns Martin Schleyer Stiftung, Technische Universität München, 2003: 196–197.

6.3 Poster-Präsentationen

Susanne Weber, Julia Ehlermann and Hubert Schorle

Cloning, expression and characterization of murine EFEMP-1
Bonner Forum Biomedizin Semester-Meeting 22.-23.03.2003

Susanne Weber, Katharina Pauls, Reinhard Büttner and Hubert Schorle

Transcription factor AP-2 γ involved in germ cell development and tumor formation
Bonner Forum Biomedizin, Semester-Meeting 12.-13.02.2004

Susanne Weber, Katharina Biermann and Hubert Schorle

Transcription factor AP-2 γ involved in germ cell development and tumor formation
Stem Cell Network North-Rhine-Westphalia, 3rd Interantional Meeting 15.-16. Mai 2006

6.5 Vorträge

Transcription factor AP-2 γ involved in germ cell development and tumor formation
Bonner Forum Biomedizin, Semester-Meeting 03.-04.03.2006