

Testikuläre Teratome in AP-2 γ heterozygoten Mäusen

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn

Vorgelegt von

Sabine Schäfer

im Juli 2011

Die vorliegende Arbeit wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. H. Schorle

Zweitgutachter: Prof. Dr. D. Fürst

Tag der Promotion: 22.11.2011

Erscheinungsjahr 2011

Zusammenfassung

In der hier vorgelegten Arbeit wurde der Tumorphänotyp von AP-2 γ heterozygoten Mäusen untersucht. Darüber hinaus wurden weiterführende Experimente zum Keimzellverlust in AP-2 γ defizienter Mäuse durchgeführt.

AP-2 γ gehört zur Familie der AP-2-Transkriptionsfaktoren und ist von Tag E7.5-E12.5 in murinen primordialen Keimzellen (PGCs) exprimiert, für deren Entwicklung es essentiell ist. AP-2 γ -Defizienz führt zu Sterilität durch Keimzellverlust bei Männchen und Weibchen. Heterozygote Männchen entwickeln mit einer Wahrscheinlichkeit von >80% testikuläre Teratome. Diese Tumore enthalten charakteristischerweise Gewebe aus allen drei Keimblättern, was als „Tumorstammzelle“ einen pluripotenten Zelltyp voraussetzt. Auf Grund verschiedener Eigenschaften der frühen Tumorstadien wird angenommen, dass es sich dabei um transformierte PGCs handelt.

In dieser Arbeit wurde zunächst die Tumorzinzidenz in AP-2 γ heterozygoten Tieren ermittelt und die Tumoren morphologisch und immunhistologisch charakterisiert, sowie der Zeitpunkt der Tumorentstehung bestimmt. Untersuchungen des Markerprofils der Tumorumläuferläsionen ergaben, dass es in den PGCs zu einer aberranten Fortsetzung der Expression von Pluripotenzmarkern über den Tag E14.5 hinaus kommt, wohingegen Marker für reife Keimzellen nur schwach oder gar nicht exprimiert werden. Dies deutet daraufhin, dass die Differenzierung der AP-2 γ +/- PGCs blockiert ist. Die Tumorumläuferzellen gehen, im Gegensatz zu wt PGCs, ab Tag E12.5 nicht in G0-Arrest, sondern proliferieren ungehindert weiter. Um Veränderungen im Genexpressionsmuster von AP-2 γ +/- PGCs zu untersuchen, die für diesen Phänotyp verantwortlich sein könnten, wurde ein Expressions-Microarray und qRT-Analysen durchgeführt. Auf Basis der Ergebnisse dieser Untersuchungen konnten Hypothesen zur Tumorentstehung aufgestellt werden.

Weiterhin wurde festgestellt, dass der Keimzellverlust in AP-2 γ defizienten Mäusen, im Gegensatz zur Tumorentstehung in AP-2 γ heterozygoten Tieren, nicht vom genetischen Hintergrund abhängig ist. *In vivo* Lineage Tracing Versuche zeigten,

dass die Mehrzahl der PGCs in diesen Tieren zwischen Tag E10.5 und E11.5 verloren geht. Somatische Differenzierung konnte in diesem Experiment nicht nachgewiesen werden.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Die Familie der AP-2-Transkriptionsfaktoren	1
1.1.1 AP-2 γ	2
1.1.2. AP-2 γ Expression in Keimzellen und Keimzelltumoren	3
1.2 Keimzellentwicklung	5
1.2.1 Induktion der Keimzellkompetenz	5
1.2.2. Spezifizierung der Keimzellen	6
1.2.3. Migration primordialer Keimzellen	7
1.2.4. Die Differenzierung der postmigratorischen Keimzellen	9
1.3 Humane Keimzelltumore	10
1.3.1 Typ I Keimzelltumore	11
1.3.2. Typ II Keimzelltumore	12
1.3.3. Typ III Keimzelltumore	13
1.4 Mausmodelle für testikuläre Keimzelltumore	13
1.4.1 Modelle für Typ I Tumore	13
1.4.2. Mausmodelle für Typ II Tumore	16
1.4.3. Mausmodelle für Typ III Tumore	16
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit	17
2 Material	18
2.1 allgemeine Chemikalien	18
2.2 Verbrauchsmaterialien	20
2.3 Verwendete Enzyme	21

2.4 Laborgeräte	21
2.5 Puffer, Lösungen, Medien.....	23
2.6 Zellkulturlösungen	24
2.7 Zellkulturmedien	25
2.8 Bakterienkulturlösungen	25
2.9 Nukleinsäuren	25
2.10 Oligonukleotide zur Synthese von cDNA	27
2.12 Prokarioten	29
2.13 Eukaryoten	29
2.14 Mauslinien	30
2.15 Kits	30
3 Methoden	32
3.1 Tierhaltung	32
3.2 Mikrobiologische Methoden	32
3.2.1 Präparation kompetenter E.coli-Kulturen	32
3.2.2 Herstellung von LB-Amp-Agarplatten.....	33
3.2.3 Transformation kompetenter Bakterien.....	33
3.2.4 TA-Klonierung	33
3.2.5 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA ("Mini-Präp").....	33
3.2.6 Präparation großer Mengen Plasmid-DNA ("Maxi-Präp").....	34
3.3 Nukleinsäureanalytik	34
3.3.1 DNA-Isolation aus Geweben und Zellen	34
3.3.2 RNA-Isolation aus Geweben und Zellen mittels Trizol	35
3.3.3 RNA-Isolation aus Paraffinschnitten	35
3.3.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	35
3.3.5 Restriktionsverdau	36
3.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten	36
3.3.7 Agarose-Gelelektrophorese zur Größenfraktionierung nativer DNA.....	36

3.3.8 Elution von DNA aus Agarose-Gelen.....	37
3.3.9 cDNA-Synthese und RT-PCR.....	37
3.3.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
3.3.11 Quantitative RT-PCR.....	41
3.3.12 Natrium-Bisulfit-Behandlung genomischer DNA.....	42
3.3.13 Expressions-Microarray.....	43
3.4 Proteinanalytik.....	43
3.4.1 Proteinisolation aus Gewebe.....	43
3.4.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	44
3.4.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese.....	44
3.4.4 Immuno-Blot (Western-Blot).....	45
3.4.5 Entfernen von Antikörpern von der PVDF-Membran („strippen“).....	46
3.5 Histologische Analytik.....	47
3.5.1 Fixierung von Geweben.....	47
3.5.2 Einbetten von Geweben.....	47
3.5.3 Herstellung von Paraffin-Schnitten.....	47
3.5.4 Hämatoxylin/Eosin (H/E)-Färbung von Paraffinschnitten.....	47
3.5.5. Immunhistochemie.....	48
3.5.6 X-Gal-Färbung von Embryonen.....	48
3.6 Methoden für die Zellkultur.....	49
3.6.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen.....	49
3.6.2 Auftauen von Zellen.....	49
3.6.3 Splitten von Zellen.....	49
3.6.4 Einfrieren von Zellen.....	50
3.6.5 Bestimmung der Zellzahl.....	50
3.6.6 Transfektion von Zellen mittels Lipofectamin2000.....	50
3.6.7 Luziferaseassay.....	50
3.6.8 Keimzellkultur.....	51

3.6.9. Alkalische Phosphatase-Färbung von Keimzellen	52
4 Ergebnisse	53
4.1 Testikuläre Teratome bei AP-2 γ heterozygoten Mäusen.....	53
4.2 Analyse der Tumorstadiumen	56
4.3 Untersuchung des DNA-Methylierungs Status früher Teratome.....	60
4.4 Untersuchung des Proliferationsverhaltens von AP-2 γ +/- PGCs.....	63
4.5 Untersuchung der Regulation von Map2k1 durch AP-2 γ	65
4.6. Untersuchungen zur Änderung des globalen Expressionsmusters von AP-2 γ +/- Keimzellen mittels Microarray.....	70
4.7 Untersuchung von AP-2 γ -/- Tieren im 129/Sv Hintergrund	78
4.8 <i>In vivo</i> Lineage Tracing von AP-2 γ Knock-out-PGCs.....	80
5 Diskussion.....	85
5.1 Charakterisierung der Tumoren in AP-2 γ heterozygoten Mäusen und Ermittlung des Zeitpunkts der Tumorentstehung	85
5.2 Abhängigkeit des Tumorphänotyps von AP-2 γ -Zielgenen und dem genetischen Hintergrund	87
5.3 Keimzellphänotyp AP-2 γ defizienter Mäuse im 129/Sv Hintergrund.....	95
5.4 <i>In vivo</i> Lineage Tracing von AP-2 γ -/- PGCs.....	96
5.5 Ausblick.....	99
6 Literaturverzeichnis	101
7 Anhang.....	110
7.1 Regulierte Gene Microarray.....	110

Abkürzungsverzeichnis

5-mC	5-methyl-Cytidine
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
AEC	3-amino-9-ethylcarbazol
Amp	Ampicillin
AP-2	engl. "Activating Protein 2"
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	engl. „bovine serum albumin“
ca.	ungefähr
CIS	Carcinoma-in-situ
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
ct	engl. 2 "cycle threshold" = Zyklengrenzwert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECC	embryonal carcinoma cells
ERK1/2	engl. „extracellular-signal regulated kinase 1/2“
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
et al.	lat. „et altera“ = und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
g	Gramm
HE	Hämatoxylin- Eosin Färbung
HRP	engl. „horseradish peroxidase“ = Meerrettichperoxidase
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
IGCNU	engl. „intratubular germ cell neoplasia unclassified“
l	Liter
LacZ	β-Galactosidase
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
M	Molar
MAP-Kinase	engl. “mitogen activated kinase-kinase”
Mg	Milligramm

Min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	engl. „messenger RNA“ = Boten-RNS
MVH	murines VASA-Homolog
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	engl. “polymerase chain reaction” = Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PGC	Primordial germ cell
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration
pmol	picomol
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	engl. „round per minute“ = Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TGCT	Testicular germ cell tumor
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TSS	Transkriptionsstartstelle

U	engl. „unit“ = Enzymeinheit
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galactopyranosid

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung der Proteinstruktur der AP-2 Proteine	Seite 1
Abbildung 2	Darstellung der Induktion der Keimzellkompetenz und der Keimzellspezifikation	Seite 7
Abbildung 3	Lokalisation der primordialen Keimzellen während der Embryonalentwicklung	Seite 9
Abbildung 4	Schematische Darstellung der Markerexpression während der Keimzellentwicklung	Seite 11
Abbildung 5	Darstellung der Abstammung weiblicher und männlicher Keimzelltumoren	Seite 14
Abbildung 6	Tumorinzidenz	Seite 54
Abbildung 7	Teratomentwicklung	Seite 55
Abbildung 8	HE-Färbungen von Gewebetypen in reifen Teratomen	Seite 56
Abbildung 9	Immunhistochemische Färbungen von E16.5 embryonalen Hoden	Seite 57
Abbildung 10	Immunhistochemische Färbungen von E18.5 embryonalen Hoden	Seite 58
Abbildung 11	RT-PCRs auf microdisseziertem Tumormaterial von Tag E16.5	Seite 60
Abbildung 12	Veränderungen des Imprintingmusters während der Keimzellentwicklung	Seite 62
Abbildung 13	Analyse des Imprintingmusters in Tumoren	Seite 62
Abbildung 14	Proliferationsverhalten von AP-2 γ +/- PGCs in vitro	Seite 64
Abbildung 15	Map2K1 Reporterkonstrukt	Seite 66
Abbildung 16	Regulation des Map2K1-Promotors durch AP-2 γ in HCT116 Zellen	Seite 67
Abbildung 17	AP-2 γ Knock-down in Tcam-2 Seminomzellen	Seite 69
Abbildung 18	AP-2 γ -Expression in E12.5 Genitalfalten	Seite 71
Abbildung 19	Custeranalyse der für den Microarray verwendeten RNA-Proben	Seite 72
Abbildung 20	„Heat map“ der im Microarray gefundenen deregulierten Gene	Seite 75
Abbildung 21	Validierung der Microarray-Daten durch Real-Time-PCR	Seite 77
Abbildung 22	Real-Time-PCR	Seite 77
Abbildung 23	Funktionszuordnung der AP-2 γ -Zielgene	Seite 78
Abbildung 24	Deletion von AP-2 γ im 129Sv Hintergrund	Seite 80
Abbildung 25	Verpaarungsschema für die in vivo Lineage Tracing Experimente	Seite 81
Abbildung 26	In vivo Lineage Tracing von PGCs	Seite 84

1 Einleitung

1.1 Die Familie der AP-2-Transkriptionsfaktoren

Die Familie der AP-2-Transkriptionsfaktoren (Aktivator-Protein 2) umfasst bei Mensch und Maus fünf Mitglieder: AP-2 α (Williams; 1988), AP-2 β (Moser et al; 1995), AP-2 γ (Oulad-Abdelghani et al; 1996), AP-2 δ (Zhao et al; 2001) and AP-2 ϵ (Feng & Williams; 2003, Tummala, et al.; 2003). Alternativ werden die humanen Isoformen auch als TFAP2A; TFAP2B, TFAP2C, TFAP2D und TFAP2E bezeichnet.

Bei Säugern bestehen alle AP-2-Gene aus sieben Exons und sechs Introns, mit Ausnahme von AP-2 δ , welches über ein zusätzliches siebtes Intron verfügt. Die 46-52kD großen Proteine der AP-2-Familie haben einen charakteristischen strukturellen Aufbau aus drei Proteindomänen (Abb.1). Sie besitzen einen konservierten C-terminalen Bereich, welcher essentiell für die Dimerisierung und DNA-Bindung ist. Die Dimerisierung wird durch eine Region vermittelt, welche ein „Helix-Span-Helix“-Motiv enthält, in dem zwei amphiphatische α -Helices durch eine nicht helikale Sequenz von 80 Aminosäuren getrennt sind (Williams & Tjian; 1991). Die Bildung von Homo- und Heterodimeren wird allein von dieser Region vermittelt, weder die Fähigkeit zur DNA-Bindung noch zur Transaktivierung sind dazu notwendig (Feng & Williams; 2003; Boshier et al.; 1995).

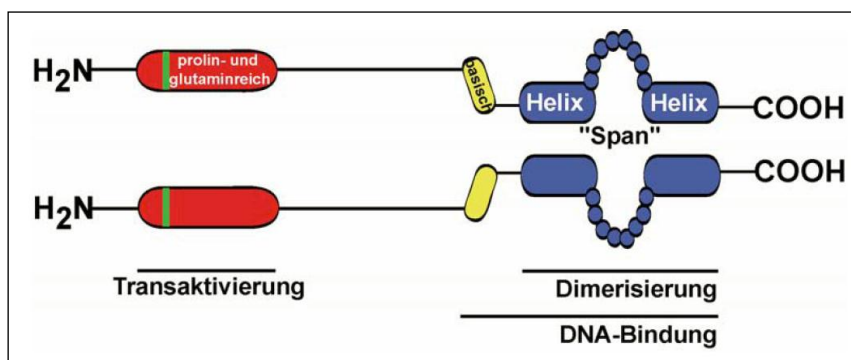


Abb.1: Schematische Darstellung der Proteinstruktur der AP-2 Proteine (modifiziert aus Eckert et al.; 2005). Die Transaktivierungsdomäne ist in Rot dargestellt (89 AS), das darin enthaltene P/Y-Motiv in Grün (5 AS). Die zentrale basische Region (20 AS, gelb) vermittelt zusammen mit der Dimerisierungsdomäne (131 AS, blau) die DNA-Bindung.

Die Fähigkeit zur Dimerisierung ist gleichzeitig Voraussetzung für die DNA-Bindung der AP-2-Transkriptionsfaktoren, jedoch nicht alleine ausreichend. Um an die DNA binden zu können muss eine ca. 200 Aminosäuren umfassende C-terminal gelegene Region im Protein enthalten sein, welche das „Helix-Span-Helix“-Motiv, sowie eine N-terminal davon gelegene, basische Region enthält. Die basische Region vermittelt hierbei den direkten Kontakt zur DNA (Garcia et al.; 2000). Als Bindemotiv der AP-2-Transkriptionsfaktoren wurde die palindromische Sequenz 5'-GCCN3GGC-3' identifiziert (Williams & Tjian; 1991). Mittlerweile sind aber auch weitere Bindemotive wie 5'-GCCN4GGC-3' und 5'-GccN3/4GGC-3' bekannt (Mohibullah et al.; 1999).

Die für die Transaktivierungsaktivität essentielle Region wurde bestimmt, indem systematisch Anteile des humanen AP-2 α N-Terminus deletiert und mit der GAL4-DNA-Bindedomäne fusioniert wurden. Durch Messung der Aktivierung des GAL4-Reporterkonstrukts G5E1bCAT konnte ermittelt werden, dass die 57 Aminosäuren zwischen Aminosäure 52 und 108 das zentrale Aktivierungsmotiv enthalten (Williams & Tjian; 1991). Die für die Transaktivierungsaktivität verantwortliche Sequenz stellt in AP-2 α , β , γ und ϵ ein konserviertes PY-Motiv dar (Wankhade et al., 2000; Tummala et al., 2003). In AP-2 δ ist dieses Motiv nicht vorhanden und auch andere funktionell kritische Aminosäurereste, die in den anderen AP-2-Isoformen konserviert sind, zeigen Abweichungen, was die Vermutung nahe legt, dass AP-2 δ mit einem anderen Koaktivatoren-pool interagiert als AP-2 α , β , γ und ϵ (Zhao et al.; 2001).

Die Transaktivierungsaktivität der AP-2-Transkriptionsfaktoren kann durch verschiedene Mechanismen reguliert werden. So kommt es zu einer post-translationalen Kontrolle, beispielsweise durch Phosphorylierung (Popa et al.; 2004) und Protein/Protein-Interaktion, für die diverse Interaktionspartner beschrieben sind, wie beispielsweise p53, WWOX, APC, c-myc und Rb-Protein (Eckert, et al.; 2005).

1.1.1 AP-2 γ

AP-2 γ wurde erstmals bei einem Experiment zur Identifizierung retinsäureinduzierbarer Gene in der murinen embryonalen Karzinomzelllinie P19 beschrieben (Oulad-Abdelghani M. et al.; 1996). In der Maus beginnt die Expression

von AP-2 γ bereits im Achtzellstadium, wo es wie auch in der Morula in allen Zellen nachweisbar ist. In der Blastozyste ist AP-2 γ hauptsächlich in den Trophoblastzellen lokalisiert, wohingegen die Expression in der inneren Zellmasse nur sehr schwach ist. Nach der Implantation wird AP-2 γ in allen Zellen des Trophektoderms exprimiert, und ab E11.5 im Spongiotrophoblasten, den Trophoblastriesenzellen, sowie in wenigen kleinen Zellen der Labyrinthenschicht detektiert (Winger et al.; 2006 & Kuckenberger et al.; 2010). Wie Zellkulturexperimente gezeigt haben ist AP-2 γ ausreichend, um trophoblastische Differenzierung in embryonalen Stammzellen auszulösen, jedoch kann seine Funktion alternativ auch von Cdx2 übernommen werden. Für die Erhaltung von Trophoblaststammzellen jedoch ist die Expression von AP-2 γ essentielle Voraussetzung (Kuckenberger et al.; 2010). Die prominente Stellung die AP-2 γ bei der Entwicklung des extraembryonalen Gewebes einnimmt wird auch im Mausmodell deutlich. AP-2 γ defiziente Embryonen können auf Grund einer verminderten Anzahl von Riesenzellen in der Labyrinthenschicht der Plazenta nicht im Uterus implantieren und werden am Tag E9.5 resorbiert (Auman et al.; 2002, Werling und Schorle; 2002b). Im eigentlichen Embryo wird AP-2 γ zunächst in der Region zwischen Ektoderm und Neuralplatte (E7.5), dann in der dorsalen Neuralfurche und dem angrenzenden Mesenchym (E8.0) und in der weiteren Entwicklung im Neuralrohr, dem frontalen Mesenchym (E8.5), sowie im Gesicht, im Gehirn und den Gliedmaßenknospen (E9.5-E11.5) exprimiert (Chazaud et al.; 1996). Im adulten Tier findet man AP-2 γ in der Haut, wo es zusammen mit AP-2 α bei der terminalen Differenzierung der Epidermis eine tragende Rolle spielt (Wang et al.; 2008). Auch im adulten Brustepithel ist AP-2 γ differentiell exprimiert, wobei seine Deletion zu einer starken Einschränkung der Verästelung der Milchgänge im sich entwickelnden Brustgewebe führt (Jäger et al.; 2010).

1.1.2. AP-2 γ Expression in Keimzellen und Keimzelltumoren

Neben den schon beschriebenen Geweben ist AP-2 γ auch in den embryonalen Keimzellen exprimiert. Das Protein konnte hier bereits am Tag E7.25 in den prämitotischen primordialen Keimzellen nachgewiesen werden, wo es auch während der Migration der Keimzellen zu den Genitalanlagen zu finden ist. In den

postmigratorischen Keimzellen endet die AP-2 γ Expression nach Tag E12.5 und wird auch später nicht wieder aufgenommen (Weber et al.; 2010). Die Rolle von AP-2 γ für die Keimzellspezifikation und Entwicklung wurde bereits in AP-2 γ Knockout-Mäusen untersucht. Trotz der 1.1.1 diskutierten Expressionsmuster von AP-2 γ während der Embryonalentwicklung und im adulten Tier beschränkt sich der Phänotyp in AP-2 γ defizienten Tieren auf die Keimzellen, vorausgesetzt es wird ein konditionales Knock-out-System verwendet, um die korrekte Ausbildung der Plazenta zu gewährleisten. Es zeigt sich, dass AP-2 γ defiziente Tiere auf Grund eines kompletten Keimzellverlusts steril sind (Weber et al.; 2010). Nähere Untersuchungen zeigten, dass AP-2 γ für die Spezifikation der PGCs nicht erforderlich ist, da an Tag E7.5 Keimzellen in den Knock-out-Embryonen durch alkalische Phosphatasefärbung nachgewiesen werden konnten. AP-2 γ scheint jedoch für die Erhaltung der Keimzellpopulation essentiell zu sein, da die Anzahl alkalische Phosphatase positiver Zellen im Vergleich zum Wildtyp am Tag E8.5 stark reduziert ist und die Zellen kurze Zeit später nicht mehr nachweisbar sind. Da keine Apoptose nachgewiesen werden konnte, kommt die Differenzierung der Keimzellen in somatische Zellen als Mechanismus für den Keimzellverlust in Frage. Hierfür wurden im Zellkulturmodell Hinweise gefunden (Weber et al.; 2010).

Wie in der Maus kommt es auch in humanen embryonalen Keimzellen zur Expression von AP-2 γ . Das Protein konnte zwischen den Schwangerschaftswochen 12 und 20 nachgewiesen werden, wobei die Expression in der 19. Schwangerschaftswoche am stärksten ist und von diesem Zeitpunkt. AP-2 γ ist dabei differentiell in Gonozyten exprimiert und wird bei der Differenzierung zu Pro-Spermatogonien herunterreguliert. Wie auch in der Maus wird AP-2 γ in den Keimzellen des adulten Menschen nicht gefunden (Hoei-Hansen et al.; 2004, Pauls et al.; 2005, Pauls et al.; 2006). Im Gegensatz dazu kommt AP-2 γ in Keimzelltumoren des Typs II vor. Hierzu gehören die embryonalen Karzinome, Seminomen und deren Vorläuferläsionen, den *Carcinoma in situ*. Zu einem schwächeren Grad wird AP-2 γ auch in den epithelialen und stromalen Bestandteilen von Teratomen exprimiert (Hoei-Hansen et al.; 2004, Pauls et al.; 2005, Pauls et al.; 2006). Darüber hinaus wird AP-2 γ auch zur differentiellen Diagnose von Keimzelltumoren des Ovars benutzt, da es mit Dysgerminomen assoziiert wird

(Salonen et al.; 2008). Die Expression von AP-2 γ in Keimzelltumoren des Typs II wird als Beleg dafür gewertet, dass diese aus entarteten Gonozyten hervorgehen (Pauls et al.; 2005).

1.2 Keimzellentwicklung

Die Weitergabe des genetischen Materials eines Individuums an die nächste Generation ist fundamental für das Fortbestehen jeder Spezies und zudem der Mechanismus, welcher der Evolution zu Grunde liegt. Diese wichtige Funktion wird in mehrzelligen Organismen von den Keimzellen übernommen. Grundsätzlich sind zwei Wege der Keimzellbildung bekannt, einerseits die Präformation und andererseits die Epigenese. Bei der Präformation, wie sie z.B. bei *Drosophila melanogaster* vorkommt, erhalten einige Blastomere maternale Determinanten aus der Oozyte und sind dadurch befähigt die Keimzellen zu bilden. Säuger bilden ihre Keimzellen durch Epigenese, das heißt, während der Embryonalentwicklung wird durch Signale von angrenzenden Geweben die Keimzellidentität induziert. Im Folgenden wird die Keimzellentwicklung der Maus beschrieben (Extavour und Akam, 2007).

1.2.1 Induktion der Keimzellkompetenz

Wie gezeigt werden konnte, haben zwischen den Tagen E5.5- E6.5 alle Zellen des Epiblasten die Fähigkeit auf Bmp4-Signale aus den extraembryonalen Ektoderm, sowie Bmp2-Signale aus dem viszeralem Endoderm zu reagieren und Keimzellvorläufer zu werden. Die BMP-Signaltransduktion wird in den Epiblastzellen durch die Rezeptoren Alk3 und Alk6 vermittelt, welche die Smads 1 und 5 aktivieren. Als Folge der BMP4-, und zu einem geringeren Maße BMP2 induzierten Aktivierung von Smad1 und 5 kommt es in den Epiblastzellen zunächst zur Expression des Transmembranproteins Fragilis. Doch nur die Zellen des proximalen Epiblasten erhalten eine BMP4/BMP2-Dosis, die zur Expression der PR-Domäne-enthaltenden transkriptionellen Regulatoren Blimp1 und Prdm14 führt (Abb.2). Diese

Blimp1/Prdm14 positiven Epiblastzellen stellen die Keimzellvorläufer dar. Die Bmp8b-Signaltransduktion spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Keimzellkompetenz. Die Keimzellvorläufer erhalten vom anterioren vizeralen Endoderm Signale, die der Induktion der Keimzellkompetenz entgegenwirken. Da Bmp8b die Entwicklung des anterioren vizeralen Endoderms reguliert, beeinflusst es indirekt die Stärke dieser antagonistischen Signale (Ohinata et al.; 2009).

1.2.2. Spezifizierung der Keimzellen

Wie durch aufwendige Einzelzellanalysen gezeigt werden konnte, ist das für die Keimzellspezifizierung entscheidende Ereignis die an Tag E6.25 einsetzende Expression von Blimp1 in einigen Zellen des proximalen Epiblasten (Abb.2) (Ohinata et al.; 2005). Ab Tag E6.75 wird in diesen Zellen Prdm14 hochreguliert (Yamaji et al.; 2008), welches zusammen mit Blimp1 ein keimzellspezifisches Genexpressionsmuster induziert. Dieses Expressionsmuster beinhaltet die Induktion von ca. 500 keimzellspezifischen Markern, wie Stella, cKit, AP-2 γ und Dnd1, sowie die Herabregulation von ca. 330 somatischen Markern. Dies schließt Gene ein, die mit Musterbildung und Zellzykluskontrolle assoziiert sind. Die Blimp1 positiven Zellen exprimieren zunächst Hoxb1, welches jedoch ab Tag E6.75 herunterreguliert wird. Dies ist ein Hinweis darauf, dass in diesen Zellen das Zellschicksal noch nicht festgelegt ist, sondern sowohl somatische, wie auch keimzellspezifische Differenzierung möglich ist. In diesen Zellen werden die Pluripotenzmarker Sox2 und Nanog reaktiviert (Kurimoto et al.; 2008, Yamaji et al.; 2008). Auf Grund der Daten aus Versuchen mit tetrachimären Mäusen wird die Anzahl der initial spezifizierten PGCs auf 4 geschätzt (Ueno et al; 2009).

Neben der direkten transkriptionellen Regulation vieler Gene nimmt Blimp1 auch durch Histonmodifikationen Einfluss auf die Genexpression. So kommt es im Nukleus der PGCs zwischen Tag E8.5-E10.5 zu einer Interaktion von Blimp1 mit der Methyl-Arginin-Transferase Prmt5. Dadurch ist Prmt5 in der Lage an Arginin3 der Histonen H2a und H4 eine symmetrischen Dimethylierung zu etablieren (Ancelin et al; 2006). Diese Histon-Methylierung fungiert als Erkennungssignal für DNA-

Methyltransferasen, was letztlich zur Methylierung bestimmter DNA- Abschnitte, und somit zur Repression von Genen führt (Zhao et al.; 2009). Ab E11.5 transloziert der Blimp1/Prmt5, Komplex aus dem Nukleus ins Zytoplasma, welches mit einer Reduktion von H4R3me2 einhergeht (Ancelin et al; 2006).

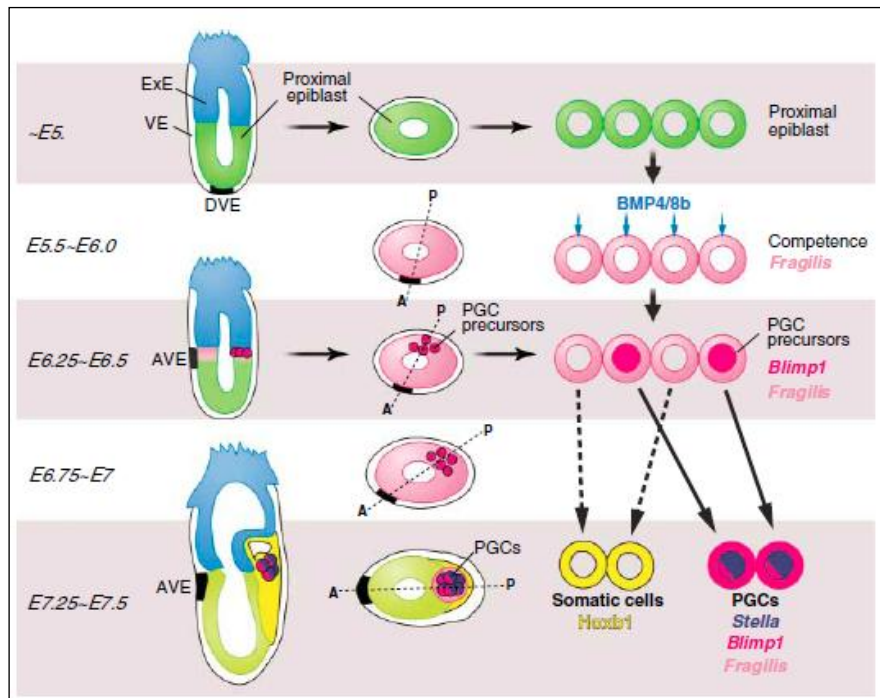


Abb.2: Darstellung der Induktion der Keimzellkompetenz und der Keimzellspezifikation. Vermittelt durch BMP4/8b Signalling kommt es am Tag E6.0 zunächst in allen Zellen des Epiblasten zur Expression von Fragilis (rosa), doch nur vier Zellen des proximalen Epiblasten werden durch die Hochregulation von Blimp1 zu Keimzellvorläufern (pink). Zellen die kein Blimp1 exprimieren differenzieren zu somatischen Zellen (gelb) und in den Keimzellvorläufern kommt es zur Expression von keimzellspezifischen Markern wie z.B. Stella (lila), wodurch diese zu primordialen Keimzellen differenzieren. (aus Katsuhiko et al; 2007)

1.2.3. Migration primordialer Keimzellen

Die spezifizierten PGCs sind am Tag E7.5 als Gruppe von ca. 40 tissue non specific phosphatase-positive (TNAP) Zellen an der Basis der Allantois nachweisbar (Ginsburg et al; 1990) (Abb.3). Vom posterioren Ende des Primitivstreifens wandern

sie in das Endoderm (E7.5- 8.5) (Abb.3), entlang des sich entwickelnden Darms (E9.5- 10.5) in Richtung der embryonalen Genitalfalten, wo sie zwischen E11.5- 12.5 ankommen (Abb.3). Während dieser Zeit sind sie in zweifacher Weise auf die Interaktion des von ihnen exprimierten Kit-Rezeptors und den von somatischen Zellen des umliegenden Gewebes exprimierten Kit-Liganden (auch „Steel-Factor“ oder „Stem Cell-Factor“ genannt) abhängig. In Zell- und Embryokulturversuchen konnte gezeigt werden, dass Kit- Ligand als einziger der getesteten Zytokine die PGC-Migration stimuliert und entscheidend für die zielgerichtete Motilität der PGCs ist. Durch die Bindung des Kit- Liganden kommt es zur Phosphorylierung der Rezeptor-Tyrosinkinase cKit, welche wiederum PI3K aktiviert, was letztlich zur Phosphorylierung von AKT führt. Wie genau AKT-Aktivierung zu den für die Migration entscheidenden Modifikationen des Zytoskeletts führt ist noch nicht geklärt. Während der PGC-Migration kommt es zu Veränderungen im Expressionsmuster von Kit-Ligand durch die somatischen Zellen, so dass ein Gradient entsteht, der die Keimzellen durch Chemotaxis zu ihrem Bestimmungsort leitet (Farini et al.; 2007, Gu et al; 2009).

Neben der Bedeutung für die Keimzellmigration ist die Interaktion von cKit und Steel-Factor auch entscheidend für das Überleben der Keimzellen während der Migration. An Tag E10.5 kann beobachtet werden, dass ektopische PGCs, die sich noch im Bereich der Körpermittellinie befinden verschwinden (Runyan et al.; 2006). Da Steel-Factor am Tag E10.5 nur noch im Bereich der Genitalfalten, lateral der Körpermittellinie, exprimiert wird, kommt es in ektopischen PGCs nicht mehr zur Unterdrückung des intrinsischen Apoptosemechanismus. In Folge der Abwesenheit von Kit-Ligand werden die pro-apoptotischen Proteine Bax, Bak, Bad und Bim sowie Caspase3 heraufreguliert, was letztlich zum Zelltod führt. Es konnte gezeigt werden dass der Bax-abhängige Apoptoseweg der einzige ist, der direkt vom Steel/cKit-Signalweg kontrolliert wird (Runyan et al.; 2006).

Während der migratorischen Phase der Keimzellentwicklung kommt es zu einer umfassenden epigenetischen Reprogrammierung. Zum Zeitpunkt ihrer Spezifizierung sind die PGCs im Hinblick auf DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen nicht von den umliegenden somatischen Zellen zu unterscheiden. Etwa an E7.75 arretieren die PGCs in der G2-Phase des Zellzyklus und verlieren kurz darauf die

Histonmarkierungen H3K9me1 und H3K9me2 als Folge der Herunterregulation der Histonmethyltransferase GLP. Zur gleichen Zeit kommt es in den Zellen zur Ezh2 vermittelten Etablierung der Histonmarkierung H3K27me3. Kurz vor Ankunft in den Genitalfalten an E10.5 verlassen die PGCs den G2-Arrest und beginnen wieder zu proliferieren (Seki et al.; 2007, Hajkova et al.; 2008).

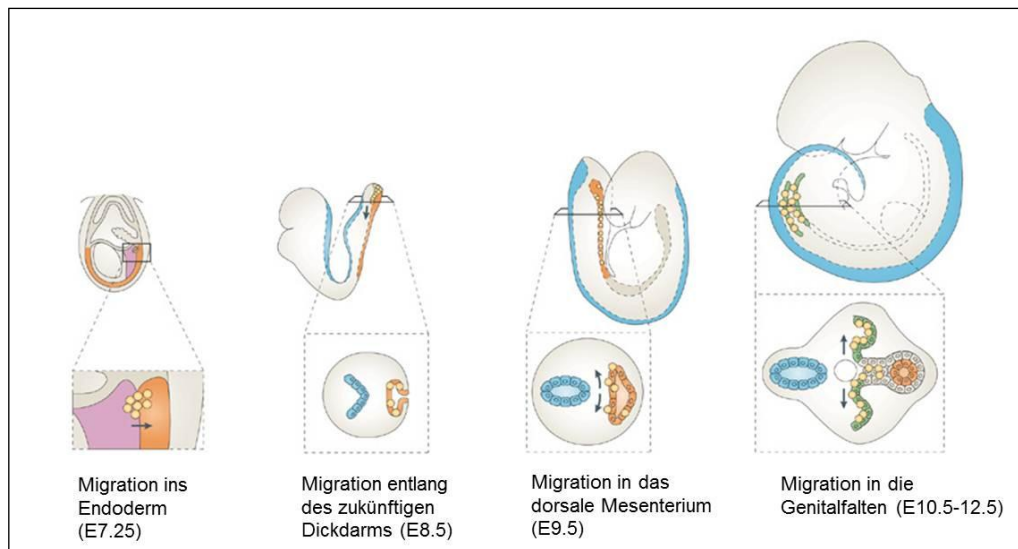


Abb.3: Lokalisation der primordialen Keimzellen während der Embryonalentwicklung (modifiziert aus Brian E. Richardson & Ruth Lehmann Nature Reviews Molecular Cell Biology 11, 37-49 (January 2010)). Am Tag E7.25 migrieren die PGCs (gelb) vom Primitivstreifen (lila) ins Endoderm (orange). Die Wanderung erfolgt bis zum Tag E9.5 entlang des sich aus dem Endoderm entwickelnden Darms, bis zum Eintritt der PGCs in das dorsale Mesenterium. Ab Tag E10.5 besiedeln die PGCs die Genitalfalten (grün).

1.2.4. Die Differenzierung der postmigratorischen Keimzellen

Nach der Ankunft in den Genitalfalten kommt es in den Keimzellen zu weiteren epigenetischen Veränderungen. So beginnt an Tag E12.5 die Löschung des biparentalen Imprintingmusters, welches ab Tag E14.5 graduell durch das paternale bzw. maternale Imprintingmuster ersetzt wird (Verona et al.; 2008).

Am Tag E13.5 kommt es in den weiblichen Keimzellen zur retinsäureinduzierten Expression von Stra8, was zum Eintritt in die Meiose führt. Im Gegensatz dazu wird in männlichen Keimzellen durch Cyp26B1 Retinsäure abgebaut und die Stra8 Expression unterdrückt (Koubova et al.; 2006). Der Übergang von Mitose zu Meiose wird zudem vom DMRT1 blockiert, welches die Stra8- Expression auf transkriptioneller Ebene inhibiert und zudem die Akkumulation von Retinsäure in den Keimzellen verhindert. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass Differenzierung und Proliferation in den Spermatogonien korrekt ablaufen können bevor diese in die Meiose eintreten (Matson et al.; 2010). In männlichen Keimzellen wird zwischen Tag E12.5 und E13.5 ein mitotischer Arrest initiiert, wodurch der Zellzyklus der Keimzellen bis einige Tage nach der Geburt in der G0-Phase angehalten wird (Western et al.; 2008).

Sowohl in männlichen, wie auch in weiblichen Keimzellen kommt es kurz nach Erreichen der Genitalfalten zur Herunterregulation der Pluripotenzmarker Nanog, Sox2 und Oct3/4, sowie zur Heraufregulation von keimzellspezifischen Markern wie Mvh (Abb.4). In männlichen, jedoch nicht in weiblichen Keimzellen, ist dies mit der Hypermethylierung der Promotoren dieser Gene verbunden (Western et al.; 2010)

1.3 Humane Keimzelltumore

Als Keimzelltumore wird beim Mensch eine heterogene Gruppe von Tumoren bezeichnet, deren Gemeinsamkeit darin besteht, dass sie aus Keimzellen verschiedener Reifegrade bzw. Differenzierungszustände hervorgehen. Zu finden sind diese Neoplasien in den Gonaden beider Geschlechter, sowie entlang der Körpermittelachse bis hin zum Gehirn. Diese Verteilung wird gemeinhin mit dem Migrationsweg der primordialen Keimzellen während der Embryonalentwicklung erklärt. Der folgende Teil wird sich auf die Beschreibung der testikulären Keimzelltumore beschränken, welche laut offizieller Definition der World Health Organisation aus den Gruppen der Tumore des Typs I, II und III besteht (Woodward et al.; 2004) (Übersicht in Abb. 5).

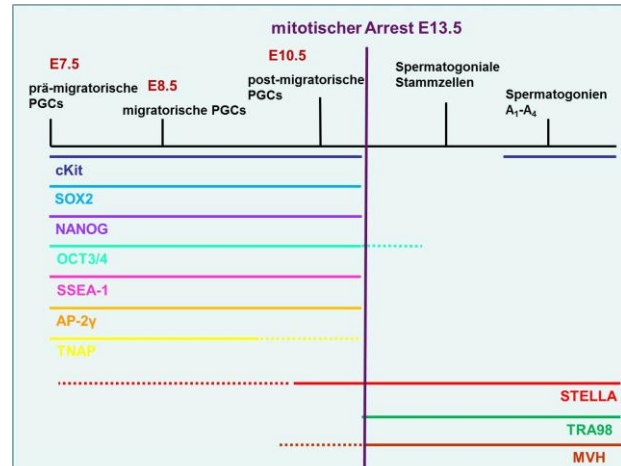


Abb.4: Schematische Darstellung der Markerexpression während der Keimzellentwicklung. Unreife primordiale Keimzellen exprimieren neben typischen frühen Keimzellmarkern wie cKit und AP-2 γ auch Marker, die mit pluripotenten Zelltypen assoziiert werden, wie SOX2, NANOG, OCT3/4, SSEA1 und TNAP. Die Expression dieser Gene wird zeitgleich zum Eintritt in den mitotischen Arrest am Tag E13.5 herunterreguliert. Marker für reife, differenziertere Keimzellen werden zwischen E10.5 und E13.5 hochreguliert, bzw. stärker exprimiert (z.B. MVH, TRA98, STELLA).

1.3.1 Typ I Keimzelltumore

Diese Gruppe umfasst die Teratome und Dottersacktumore bei Säuglingen, Kindern und präpubertären Jugendlichen, welche 3,2 % aller Tumore bei Kindern unter 15 Jahren ausmachen (Kaatsch et al.; 2004). Dies entspricht einer Gesamtinzidenz von 0,4 pro 100.000 Kinder. Teratome treten bei beiden Geschlechtern auf und können überall entlang der Migrationsroute der primordialen Keimzellen lokalisiert sein, jedoch sind sie bei Säuglingen meist in der sakrokokzygealen Region (Kreuz-/Steißbein) lokalisiert, während bei Jugendlichen Teratome der Gonaden prädominieren (Schneider et al.; 2004). Teratome enthalten charakteristischerweise Derivate aller drei Keimblätter und werden entsprechend ihres Differenzierungsgrades in reife und unreife Teratome eingeteilt. Unreife Teratome enthalten embryonale, oder nicht komplett ausdifferenzierte Gewebe, wobei primitives neuroektodermales Gewebe besonders häufig anzutreffen ist. Allgemein ist

die Gesamtstruktur von unreifen Teratomen eher fest, wohingegen reife Teratome oftmals zystisch aufgebaut sind und unterschiedliche Grade von Nekrose aufweisen können. Präpubertäre Teratome sind generell gutartig, jedoch kann es zu einer malignen Transformation in Dottersacktumoren, oder selten in nicht-Keimzelltumoren (wie Leukämien, Karzinome oder Sarkome) kommen (Motzer et al.; 1998). Es wird angenommen, dass präpubertäre Teratome direkt aus gutartigen Keimzellen hervorgehen, wohingegen die Vorläuferzellen der Typ II Teratome das maligne Zwischenstadium der *Carcinoma in situ* durchlaufen (Ulbright et al.; 2005). Das teilweise oder völlig gelöschte genomische Imprinting-Muster der Typ I Tumore entspricht dem von frühen post-migratorischen PGCs von Tag E10.5-E13.5 (Hajkova et al.; 2002), was für diese Zellen als Vorläufer von Typ I Tumore spricht.

1.3.2. Typ II Keimzelltumore

Keimzelltumore des Typs II werden hauptsächlich bei weißen Männern im Alter zwischen 20-40 Jahren diagnostiziert und machen ca. 60% der bösartigen Tumore bei Männern dieser Altersgruppe aus. Alle Tumortypen, die dieser Gruppe zugeordnet werden haben eine gemeinsame Vorläuferläsion, das „intratubular germ cell neoplasia unclassified“ (ITGCNU), auch *Carcinoma in situ* (CIS) (Mostofi et al.; 1987). Diese Läsionen sind in den Samenkanälchen der Hoden lokalisiert und bestehen aus einer einheitlichen Zellpopulation, deren Genexpressionsmuster, Telomeraseaktivität und Imprintingmuster dem von postmigratorischen PGCs entsprechen. So exprimieren diese Zellen Gene, die mit pluripotenten, unreifen Keimzellen assoziiert sind, wie OCT3/4, NANOG, AP-2 γ und cKit (Hoei-Hansen et al.; 2004, Pauls et al.; 2005, Rajpert-De Meyts & Skakkebaek, 1994). Diese während der Embryonalentwicklung in ihrer Differenzierung blockierten Zellen persistieren über Jahre hinweg in der adulten Spermatogonien-Nische, bis es während der Pubertät zur malignen Transformation in Seminome oder embryonale Karzinome kommt. Die Seminomzellen ähneln morphologisch und in der Markerexpression den CIS- Zellen und unterscheiden sich von ihnen hauptsächlich durch die Expression von Sox17. CIS-Zellen und embryonale Karzinomzellen exprimieren im Gegensatz zu Seminomzellen Sox2. Embryonale Karzinome zeigen eine stärkere Neigung zum

invasiven Wachstum und zur Metastasierung und sind in der Lage in alle drei Keimblätter zu differenzieren. Embryonalen Karzinomen können in Teratome, Dottersacktumore oder Chorionkarzinome differenzieren. Die Typ II Teratome sind im Gegensatz zu Typ I Teratomen in der Regel invasiv. In seltenen Fällen kann es durch Reprogrammierung von Seminomzellen zur Entstehung von Nicht- Seminomen kommen (Oosterhuis & Looijenga; 2003).

1.3.3. Typ III Keimzelltumore

Diese Gruppe der humanen Keimzelltumore besteht aus den spermatozystischen Seminomen, die mit einer Inzidenz von 0,2 in 100.000 hauptsächlich bei Männern über 50 Jahren auftreten (Chung et al.; 2004). Es handelt sich dabei um gutartige Tumore, die ausschließlich testikulär lokalisiert sind. Morphologische Gesichtspunkte, Expressionsmuster und das paternale Imprintingmuster belegen, dass spermatozystische Seminome aus einer Spermatozyte hervorgehen (Abb.5).

1.4 Mausmodelle für testikuläre Keimzelltumore

1.4.1 Modelle für Typ I Tumore

1.4.1.1. Spontane testikuläre Teratome im 129/Sv Mausstamm

Testikuläre Tumore sind bei Mäusen sehr selten zu finden, eine Ausnahme bildet der Inzuchtstamm 129/Sv. 129/Sv Mäuse entwickeln mit einer Inzidenz von 1-5% testikuläre Teratome (Stevens & Hummel; 1957). Für diesen Phänotyp sind verschiedene „Modifier-Gene“ bekannt, die die Tumorzinzidenz entweder erheblich erhöhen oder vermindern. Zunächst wurden spontan aufgetretene Mutationen in den 129/Sv Hintergrund eingekreuzt, um ihren Einfluss auf die Tumorentstehung zu untersuchen. Die erste in dieser Weise charakterisierte Mutation war Steel-J (St^J), welche bei heterozygoten Individuen zu einer 10%igen Erhöhung der Tumorraten und einer Verringerung der Anzahl primordialer Keimzellen führt (Stevens; 1967a). St^J ist

eine 650kb große Deletion, die das Gen für den Kit-Liganden komplett umfasst (Heaney et al; 2008). Die Auswirkungen einer homozygoten Mutation konnten nicht untersucht werden, da diese letal ist.

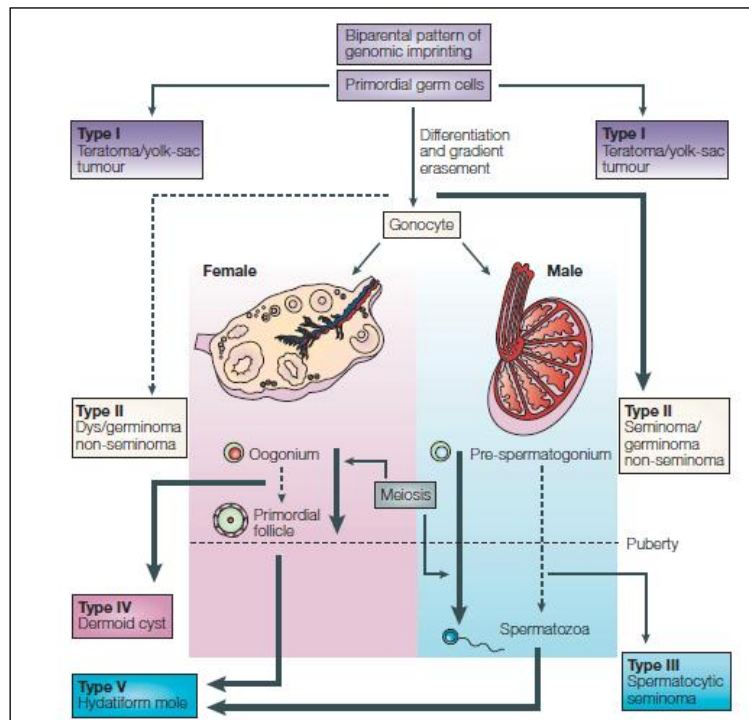


Abb.5: Darstellung der Abstammung weiblicher und männlicher Keimzelltumoren (modifiziert aus Oosterhuis & Looijenga; 2005). Die prä-pubertären Typ I Keimzelltumore (Teratome und Dottersacktumore) gehen bei beiden Geschlechtern auf primordiales Keimzellen zurück. Die Typ II Keimzelltumore (bei Frauen Dysgerminome, bei Männern Seminome und nicht-Seminome) gehen vermutlich ebenfalls auf primordiales Keimzellen zurück, jedoch sind diese in der Differenzierung wahrscheinlich weiter fortgeschritten. Die Vorläuferzellen der männlichen Typ III Keimzelltumore (spermatozystische Seminome) sind Spermatozyten.

Die *Ter* Mutation ist eine weitere spontan aufgetretene Mutation, die sich verstärkend auf die Tumorentstehung im 129/Sv Stamm auswirkt. So entwickeln 17% der heterozygoten Tiere und 94% der homozygoten Tiere testikuläre Teratome (Noguchi & Stevens; 1982). Später konnte gezeigt werden, dass *Ter* eine Punktmutation im *dead-end (Dnd1)* Gen ist, bei dem ein Stopp-Codon in die Sequenz eingefügt ist. Diese

Mutation führt zur Bildung eines trunkierten und nicht-funktionalen Proteins (Youngren et al.: 2005). Die Deletion von Dnd1 führt in allen getesteten genetischen Hintergründen zur Sterilität, eine Erhöhung der TGCT-Inzidenz ist allerdings nur im genetischen Hintergrund des 129/Sv Stamms zu beobachten (Stevens; 1973). Auch die gezielte Deletion von keimzellentwicklungs- relevanten Genen hat bereits zu einem vergleichbaren Phänotyp geführt. So kommt es bei Deletion von *double sex and mab-3 related transcription factor 1 (Dmrt1)* zur Entwicklung von testikulären Teratomen. Dabei werden 4% der heterozygoten und 90% der homozygoten Mäuse mit Teratomen diagnostiziert, wenn die Mutation in den 129/Sv Hintergrund zurückgekreuzt wird (Krentz et al.; 2009). Der einzige bekannte Modifier der zu einer Verringerung der TGCT-Inzidenz in 129/Sv Männchen führt ist die *Ay* Mutation. Es handelt sich dabei um eine 10kb umfassende Deletion im Agouti Fellfarbenloкус auf Chromosom 2, welche zur Deletion von *Raly* und *Eif2s2*, sowie zur ektopischen Expression von Agouti führt (Michaud et al., 1994). Für den Effekt auf die TGCT-Entwicklung ist jedoch einzig die Deletion von *Eif2s2*, einer Untereinheit des Translationsinitiationsfaktors eIF2, ausschlaggebend (Heaney et al., 2009b).

1.4.1.2. Spontane testikuläre Teratome in PTEN Knock-out Mäusen

Einen besonders drastischen Phänotyp zeigen *Pten* defiziente Mäuse. 100% der Männchen entwickeln bilaterale testikuläre Teratome, wobei der Phänotyp unabhängig vom genetischen Hintergrund ist und auf einer verstärkten Aktivierung des PI3K/Akt Signalwegs beruht (Kimura et al.; 2003).

1.4.1.3. Experimentelle Induktion von testikulären Teratomen durch Genitalfaltentransplantation

L.C. Stevens hat 1964 embryonale Genitalfalten in das Interstitium adulter Mäusehoden transplantiert. Die resultierenden Teratome gleichen in Entwicklung und Aufbau dem von spontan entstandenen (Sundström et al.; 1999). Als Donor-Stamm wurde zunächst die 129/Sv *SL^J* - Linie verwendet zudem wurden verschiedene Empfänger Stämme getestet. Dabei stellte sich heraus, dass der Genotyp der Maus, in die die Genitalfalte transplantiert wird nicht entscheidend für die Tumorinduktion

ist. Wurden jedoch Genitalfalten aus DBA/1, C3H/Hu oder AL/Ks Mäusen verwendet konnte kein Tumorwachstum beobachtet werden, unabhängig vom genetischen Hintergrund der Empfängermaus (Stevens; 1964). Wie bei humanen Typ I Teratomen gehen spontane und experimentell induzierte murine Teratome nicht aus Karzinoma *in situ* hervor. Die Vorläufer dieser Tumore sind embryonale Karzinom Zellen (Walt et al.; 1993), welche undifferenzierte Zellen mit großen, stark kondensierten Zellkernen darstellen, die PGCs morphologisch ähneln (Pierce et al.; 1967).

1.4.2. Mausmodelle für Typ II Tumore

Bisher ist es weder durch ungerichtete, noch durch gezielte Mutagenese gelungen Typ II Keimzelltumoren in der Maus zu erzeugen. Erste Erfolge konnten jedoch mit einem Transplantationsmodell erzielt werden. Bei dieser Technik werden TCam2-Zellen in die Tubuli Seminiferi von Nacktmäusen injiziert. TCam2 ist eine humane Seminomzelllinie, die auf Grund ihrer Eigenschaften als Keimzellmodell in der Zellkultur verwendet wird (Eckert et al.; 2008). Die injizierten Zellen bilden in den Tubuli Seminiferi *Carcinoma in situ* und können diesen Zustand mindestens drei Monate aufrechterhalten. Die anschließende Differenzierung der Zellen in verschiedene Keimzelltumorarten bedarf noch weiterer Charakterisierung (Dissertation Daniel Nettersheim 2010).

1.4.3. Mausmodelle für Typ III Tumore

Es sind keine Mausmodelle für Typ III Keimzelltumore bekannt.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Deletion von AP-2 γ in murinen primordialen Keimzellen führt zu Sterilität in weiblichen und männlichen Tieren in Folge des Verlusts der Keimzellen nach Tag E8.5. Um den Effekt einer Reduktion der AP-2 γ -Dosis zu studieren wurden AP-2 γ heterozygote Tiere untersucht. Solange die Tiere im genetischen C57BL/6-Hintergrund gehalten wurden, zeigten sie keinen offensichtlichen Phänotyp. Daher wurde eine Rückkreuzung in den 129/Sv-Stamm durchgeführt, welcher anfällig für testikuläre Teratome ist. Ab der 7. Generation der Rückkreuzung in den 129/Sv-Hintergrund entwickelten ca. 90% der männlichen AP-2 γ heterozygoten Tiere testikuläre Teratome, wohingegen die weiblichen Tiere weiterhin keinen Phänotyp zeigten.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Tumorzinzidenz zunächst statistisch zu erfassen. Die Tumore sollen morphologisch und histologisch charakterisiert werden und des Weiteren der Zeitpunkt der Tumorentstehung ermittelt werden. Weiterhin sollen in dieser Arbeit die molekularen Mechanismen analysiert werden, die der Tumorzinzidenz und Tumorentwicklung zu Grunde liegen. Hierzu soll untersucht werden, welche AP-2 γ -Zielgene in den heterozygoten Keimzellen dereguliert sind.

2 Material

2.1 allgemeine Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/Vertreiber	Firmensitz
2-Propanol	Merck	Darmstadt
Acrylamid Mix (Rotiphorese Gel 30)	Roth	Karlsruhe
Adenosin-5'- triphosphat	AppliChem	Darmstadt
AEC chromogenes Substrat	Dako	Hamburg
Agar	Merck	Darmstadt
Agarose	Sigma-Aldrich	München
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich	München
Ampicilin	Roth	Karlsruhe
Aquatex	Merck	Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	München
Bromphenolblau	Serva	Heidelberg
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	München
Calciumchlorid	Merck	Darmstadt
Chloroform	Merck	Darmstadt
Coenzym A	AppliChem	Darmstadt
Desoxiribonukleotidtriphosphate (dNTPs)	Invitrogen	Karlsbad
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich	München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	München
Dithiotreitol 0,1M (DTT)	Invitrogen	Karlsbad
Eisessig	Merck	Darmstadt
Ethanol	Merck	Darmstadt

Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck	Darmstadt
Eukitt	Fluka	Steinheim
Formaldehyd-Lösung (37%)	Merck	Darmstadt
Formamid	Sigma-Aldrich	München
Glutaraldehyd	SERVA	Heidelberg
Glycerin	KMF	Lohmar
Glycerol	Sigma-Aldrich	München
Hefe-Extrakt	Merck	Darmstadt
Isofluran	DeltaSelect	Dreieich
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich	München
Lämmli-Probenpuffer	Roth	Karlsruhe
Luciferin	AppliChem	Darmstadt
Magermilchpulver	Merck	Darmstadt
Methanol	Merck	Darmstadt
MOPS	Sigma-Aldrich	München
Natriumacetat, 3M, pH4,6	Applied Biosystems	Warrington
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich	München
Natrium-Dodecylsulfat	Sigma-Aldrich	München
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	BioRad	München
Natronlauge (5M)	Merck	Darmstadt
NP-40	Sigma-Aldrich	München
Oligonukleotide (Primer)	Sigma-Aldrich	München
Paraformaldehyd (PFA)	Merck	Darmstadt
Phenol/ Chloroform	Roth	Karlsruhe

(PBS)-Tabletten	Sigma-Aldrich	München
Salzsäure (HCl)	Merck	Darmstadt
SYBR®GreenER	Invitrogen	Karlsbad
Tris	Merck	Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich	München
TRIzol	Invitrogen	Karlsbad
TWEEN 20	Sigma-Aldrich	München
X-gal	Fermentas	St.Leon-Rot

2.2 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller/Vertreiber	Firmensitz
1,5ml Reaktionsgefäße	Sarstedt	Nümbrecht
2,0ml Reaktionsgefäße	Sarstedt	Nümbrecht
96-Loch-Mikrotiterplatten	TPP	Trasadingen
24-Well-Zellkulturschalen	TPP	Trasadingen
6-Well-Zellkulturschalen	TPP	Trasadingen
AdhesiveCap200 clear	Zeiss	München
Einbettkassetten	neoLab	Heidelberg
Foam Biopsy Pads	Labonord	Templemars
FrameSlide PET	Zeiss	München
Frame Star 384	4titude	Surrey, UK
Affymetrix Mouse Gene ST 1.0 Arrays	Affymetrix	High Wycombe, UK
HistoBond Objektträger	Marienzfeld	Lauda-Königshofen

PCR-Reaktionsgefäße 100µl	Axygen	Winsen, Luhe
Petrischalen 10cm	Greiner	Solingen
Roti-PVDF-Membran	Roth	Karlsruhe
Röntgenfilme (Biomax)	Kodak	Rochester
Sterilfilter	Millipore	Schwalbach
Zellkulturschalen 10cm ²	TPP	Trasadingen

2.3 Verwendete Enzyme

Enzyme	Hersteller/Vertreiber	Firmensitz
Dream-Taq	Fermentas	St.Leon-Rot
Platinum Taq-Polymerase	Invitrogen	Karlsbad
Proteinase K	Merck	Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	Fermentas	St.Leon-Rot
RNAseA	Boehringer	Mannheim
RNaseOUT	Invitrogen	Karlsbad
SuperScript III Reverse Tr.	Invitrogen	Karlsbad
Trypsin	PAN Biotech	Wien, Österreich

2.4 Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller/Vertreiber	Firmensitz
7900HT Fast Real-Time PCR	Applied Biosystems	Darmstadt
Bakterienschüttler Innova 4000	New Brunswick Scientific	Wesseling
Einbettautomat Tissue-TEK VIP	Miles Scientific	
Galaxy Mini Zentrifuge	VWR	Darmstadt

Gelsysteme 50ml, 100ml, 250ml	Peqlab	Erlangen
GeneChip Fluidics Station 40	Affymetrix	High Wycombe
GeneChip Scanner 3000 7G	Affymetrix	High Wycombe
Homogenisator Micra D-8	Labortechnik	Müllheim
Kaltlichtquelle	Leica	Solms
Luminometer Centro LB960	Berthold	Bad Wildbad
Mikroskop Leica DMLB	Leica	Solms
Mikroskop Leica MS5	Leica	Solms
Nassblot-Kammer Trans-Blot-Cell	BioRad	München
Netzgerät E143	Consort	Turnhout
PALM MicroBeam	Zeiss	München
Pipetten 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf	Hamburg
Pipettierhilfe Accu-Jet	Brand	Wertheim
Photometer NanoDrop	Peqlab	Erlangen
Sterilbank Hera Safe	Kendro	Langenselbold
Thermocycler 2720	AppliedBiosystems	Warrington
Thermoschüttler Thermomixer c.	Eppendorf	Hamburg
UV-System/ Kamera Classic Uno	Intas	Göttingen
Vortex-Genie 2	Scientific Industries/Roth	Karlsruhe
Vakuumkonzentrator Concentrator 5301	Eppendorf	Hamburg
Wasserbad	GFL	Dülmen
Zellkulturinkubator	Heraeus	Hanau
Zentrifugen 5417, 5415D	Heraeus	Hanau

2.5 Puffer, Lösungen, Medien

Puffer, Lösung, Medium	Zusammensetzung
10x Ladepuffer	49% Glycerol, 49% H ₂ O, 2% 50x TAE, 1 Spatelspitze Bromphenolblau,
Laufpuffer Western Blot	1 Spatelspitze Xylencyanol 50mM Tris , 384mM Glycin, 0,1% SDS, 1M Tris-Puffer in
20xMOPS	400mM MOPS, 100mM Nac, 10mM EDTA, Wasser, pH-Wert mit HCl oder NaOH einstellen
50xTAE	2M Tris, 1M NaOAc, 50 mM EDTA
EtBr-Stammlösung	10mg/ml Ethidiumbromid, PBT 0,1% Triton-X100, 2,0% BSA in PBS
Fixierungslösung	2% Formaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd in PBS
Luciferase-Assay Puffer	20mM Tricine, 1,07mM (MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ *5H ₂ O, 2,67mM MgSO ₄ , 0,1mM EDTA, 33,3mM DTT, 270µM Coenzym A, 530µM ATP, 470µM Luciferin
Luciferase Lysepuffer	5x: 125mM Tris pH 7,8, 10mM EDTA, 100mM DTT, 50% Glycerol, 5% Triton X-100
PBST	0,1% Tween-20 in PBS
Plasmid-Puffer P1	50mM Tris-HCl pH8, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase
Plasmid-Puffer P2	200mM NaOH, 1% SDS
Plasmid-Puffer P3	3,0M KAc pH 5,5
RIPA-Puffer	10 mM Phosphatpuffer, 0,1 % SDS, 1 % Triton-X100, 0,1 %, Natriumdesoxycholat, vor Verwendung Protease-Inhibitor hinzugeben
RNA-Denat.-puffer	6,5% Formaldehyd, 0,5% Ethidiumbromid, 4x MOPS, 50% Formamid (rekristallisiert)

Stripping-Puffer WB	100mM Mecaptoethanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris pH 6,6
TBS	50mM Tris, 10mM NaCl, pH 8
Transferpuffer WB	25mM Tris , 192mM Glycin , 20% Methanol
X-Gal-Färbelösung	5mM K ₄ Fe(CN) ₆ , 5mM K ₃ Fe(CN) ₆ , 2mM MgCl ₂ , 0,01% NaDesoxycholat, 0,02% NP-40, 1mg/ml X-Gal
Zellysepuffer	10mM Tris, 10mM NaCl, 20mM EDTA, 1% SDS, 1% DTT, 100µg/ml Proteinase K

2.6 Zellkulturlösungen

Lösung	Hersteller/Vertreiber	Firmensitz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	München
Dulbecco`s MEM mit Glutamax	Invitrogen	Karlsbad
Fetales Kälberserum (FCS)	Hyclone	Logan
L-Glutamin	Invitrogen	Karlsbad
Leukemia Inhibiting Factor (LIF)	Millipore	Schwalbach
Lipofectamin 2000	Invitrogen	Karlsbad
Nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen	Karlsbad
B-Mercaptoethanol	Invitrogen	Karlsbad
Penicilin/Streptomycin	Invitrogen	Karlsbad
Phosphat-gepufferte Salzlösung	Invitrogen	Karlsbad
Trypsin	PAN Biotech	Wien
β-Mercaptoethanol	Invitrogen	Karlsbad

2.7 Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
Keimzellmedium	DMEM, 15% FCS, 50 U/ml P/S, 200nM L-Glutamin, 1X non-essential amino acids, 100 nM β -Mercaptoethanol, 1000 U/ml LIF, 20ng/ml bFGF, 60 ng/ml SCF
HCT Medium	DMEM, 10% FCS, 50 U/ml P/S, 200nM L-Glutamin
Tcam-2 Medium	RPMI, 10%FCS, 200nM L-Glutamin, 50U/ml P/S

2.8 Bakterienkulturlösungen

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

2.9 Nukleinsäuren

Oligonukleotide zur Detektion muriner Sequenzen

In4down 5' - AACAGGTTATCATTTGGTTGGGATT -3'

Ex5up 5' - CAATTTTGTCCAACCTTCTCCCTCAA -3'

Ex6up 5' - AATAGTCAGCCACCGCTTTACTAGG -3'

wt1s 5' - CTCCCAAAGTCGCTCTGAGTTGTTA -3'

wt1as 5' - CCCATTTTCCTTATTTGCCCTATT -3'

SA1as 5' - GACATCATCAAGGAAACCCTGGACT -3'

Cre-F 5' - CCACGACCAAGTGACAGCAATG -3'

Cre-R 5'- CAGAGACGGAAATCCATCGCTC -3'
 Nanos1 5'- GGGATCGATAGATGGCAC
 Nanos2 5'- CAGCGGCCACTTGTGTAGCG
 Nanos3 5'- CCAGCCATGGGGACTTTC
 mAct-F 5'- GGTCAGAAGGACTCCTATGT -3'
 mAct-R 5'- ATGAGGTAGTCTGTCAGGTC -3'
 mAP-2g-F 5'- ATTTTCGATGACCAAGAACCCTTTG -3'
 mAP-2g-R 5'- ACGAGAGACGTGAGGAGAGTGAC-3'
 mBlimp-F 5'-CACACAGGAGAGAAGCCACA -3'
 mBlimp-R 5'- TCGAAGGTGGGTCTTGAGAT-3'
 mDmrt1-F 5'- AAGGCCCTCCTACTCAGAA- 3'
 mDmrt1-R 5'- GAGGGAGACCAAGCCAGAAT- 3'
 mGAPDH-F 5'- GGTGCTGAGTATGTCGTGGA- 3'
 mGAPDH-R 5'- TTGGCTCCACCCTTCAAGT- 3'
 mH19-F 5'- AAGGAGATTATGTTTTATTTTTGGA -3'
 mH19-R 5'- AAAAAAATCAATCAATTACAATCC -3'
 mKit-F 5'- AAGATGAACCCTCAGCCTCA -3'
 mKit-R 5'- CGTCTCCTGGCGTTCATAAT-3'
 mNanog-F 5'- GGTGGCAGAAAAACCAAGTG- 3'
 mNanog-R 5'- GCAATGGATGCTGGGATACT- 3'
 mNanos3-F 5'- CCTGACAAGGCAAAGACACA- 3'
 mNanos3-R 5'- CTTCTGCCACTTTTGGAAC- 3'
 mSox2-F 5'- GAACGXXTTCATGGTATGGT-3'
 mSox2-R 5'- TTGCTGATCTCCGAGTTGT- 3'
 Dppa5a-F 5'- CAACAAGATTCGGGCTAAATGG- 3'
 Dppa5a-R 5' -CTTCATGGATTCCTCCAGCTTC- 3'

Dppa4-F 5' –CAATGCTAAGAAGTACGAGGCAGT- 3'

Dppa4-R 5'-CTGGTCCCATGAACCACACA- 3'

Asz1-F 5' –GTTGAAGATTTGAATGAAGAGGTCTG- 3'

Asz1-R 5'-TGGGATATGAGTTGGGTCATTTT- 3'

Lefty2-F 5' –CACGCTGGACCTCAAGGACT- 3'

Lefty2-R 5'-TGCAGGTCCAGGTACATCTCC- 3'

Dnd1-F 5'- GTTCAGTACGCACCGAGCTG- 3'

Dnd1-R 5'- GCTGCTTTAGGTCTGGCTTGAG- 3'

Esr1TaqManF- 5'-GCCTAGCTCAGCTCCTTCTCATT- 3'

Esr1TaqManR- 5'-GCACAACGTTCTTGCATTTTCAT- 3'

Esr2TaqManF- 5'-CCTTGGTGTGAAGCAAGATCA- 3'

Esr2TaqManR- 5'-GACTAGTAACAGGGCTGGCACA:-3'

Oligonukleotide zur Detektion humaner Sequenzen

p21-F-5'-CGAAGTCAGTTCCTTGTGGAG.-3'

p21-R-5'- CATGGGTTCTGACGGACAT-3'

Map2K1-F-5'- GTTCAAGGTCTCCCACAAGC- 3'

Map2K1-F-5'- AACCTGCAGCTCCCTTATGA- 3'

AP-2γ-F-5'-CCCAGTGGTCTTCTGCTC- 3'

AP-2γ-R-5'-AGAGTCAC ATGAGCGGCTTT- 3'

2.10 Oligonukleotide zur Synthese von cDNA

Oligonukleotid	Hersteller/Vertreiber	Firmensitz
Oligo-d(T)20-Primer	Fermentas	St.Leon-Rot
Random Hexamere	Fermentas	St.Leon-Rot

2.11.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Klon/Code	Firma	Ursprung	WB	IHC
5-methyl-Cytidin	ab10805	Abcam	Maus	-	1:100
aktive Caspase-3	ab13847	Abcam	Kaninchen	-	1:150
AP-2 γ	6E4/4	SantaCruz	Maus	1:600	1:300
E-Cadherin	36/E-Cad.	BD	Maus	-	1:50
Ki67		Dako	Ratte		1:500
Mek1	9124	Cell Signalling	Kaninchen		1:1000
MVH	Ab13840	Abcam	Kaninchen	-	1:400
OCT3/4	C-10	Santa Cruz	Maus	1:500	1:100
pERK1/2	197G2	Cell Signalling	Kaninchen	1:1000	-
SSEA1	MC-480	R&D Systems	Maus	-	1:100
TRA98			Ratte	-	1:250
β -Actin	AC-15	Sigma Aldrich	Maus	1:10000	-

2.11.2. Sekundäre Antikörper

Antikörper	Klon/Code	Firma	Ursprung	WB	IF
Anti-Maus HRP	61-0120	Invitrogen	Kaninchen	1:1000	-

Anti-Maus Biotin	E0433	Dako	Ziege	-	1:500
Anti-Kaninchen HRP	65-6120	Invitrogen	Ziege	1:2000	-
Anti-Kaninchen Biotin	E0432	Dako	Ziege	-	1:500
Anti-Ratte Biotin					1:200
Anti-Ziege HRP	61-1620	Invitrogen	Kaninchen	1:2000	-
Anti-Ziege Biotin	E0466	Dako	Kaninchen	-	1:500

2.12 Prokarioten

Prokariot	Genotyp
TOP10F ⁻ <i>E. coli</i> -Stamm	F ['] { <i>lacIq</i> Tn 10 (TetR)} <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>araleu</i>) 7697 <i>galJ</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>endA1</i> <i>nupG</i>

2.13 Eukaryoten

Eukaryoten	Beschreibung
HCT 116	humane Hepatocarcinom- Zelllinie
TCam2	humane Seminom- Zelllinie
SI/SI4mSCF220	murine embryonale Feederzellen, die membrangebundenen Stem Cell Factor exprimieren

2.14 Mauslinien

Mauslinie	Genotyp
129S2/SvHsd	wt
129/Sv-AP-2 γ +/-	heterozygote AP-2 γ - Linie, genetischer Hintergrund: 129/Sv
Nanos3Cre	Cre-Expression unter der Kontrolle des endogenen Nanos3-Promotors, gemischter genetischer Hintergrund
129/Sv-Sox2Cre	Cre-Expression unter der Kontrolle des Sox2-Promotors, genetischer Hintergrund: 129/Sv (N6)
B6-R26R+/-	Reporterlinie, mit LacZ-Kassette unter Kontrolle des endogenen Rosa26-Promotors, welche nach Cre- Rekombination aktiviert wird, genetischer Hintergrund: C57BL/6
129/Sv- AP-2 γ fl/fl	homozygot konditionale AP-2 γ -Linie, genetischer Hintergrund: 129/Sv

2.15 Kits

Kit	Hersteller/Vertreiber	Firmensitz
Affymetrix Whole-Transcript Sense Target Kit	Affymerix	High Wycombe
BCA Protein Assay Kit	Pierce	Rockford
DNA Clean&Concentrator Kit	HISS	Freiburg
EZ DNA Methylation-Direct Kit	Hiss	Freiburg
NucleoBond ExtraMaxi plus Kit	Macherey-Nagel	Düren

Nucleo Spin FFPE RNA	Macherey-Nagel	Düren
QiaAmp DNA Micro Kit	Qiagen	Hilden
QiaEXII Gel Extraction Kit	Qiagen	Hilden
SuperSignal West Substrate	Thermo Scientific	Rockford
TA-Cloning Kit pCR2.1	Invitrogen	Karlsbad
Vectastain ABC-Kit	Vector Laboratories	Burlingame
Alkalische Phosphatase Substrat Kit I	Vector Laboratories	Burlingame
Vectastain Alkaline Phosphatase Substrate KitIII	Vector Laboratories	Burlingame
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	HISS	Freiburg

3 Methoden

3.1 Tierhaltung

Die Mäuse wurden auf Streu in Plastik Käfigen gehalten und erhielten Trockenfutter und Wasser ad libitum. Der Tag-/ Nachtzyklus betrug jeweils 12h. Zur Identifizierung wurden die Tiere im Alter von drei Wochen mit nummerierten Ohrmarken versehen, zudem wurde eine Schwanzbiopsie zur DNS-Gewinnung durchgeführt. Das Töten der Tiere 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).

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Präparation kompetenter E.coli-Kulturen

Eine Escherichia coli- Bakterienkultur wurde in 50ml LB-Medium ü/N bei 37°C und 250rpm in einem Bakterienrüttler inkubiert (Vorkultur). 1ml der Vorkultur wurde anschließend 1:100 in LB-Medium verdünnt und noch einmal bis zu einer OD650 von 0,2 weiter wachsen gelassen (37°C, 250rpm). Anschließend wurde die Kultur auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (5min, 2500rpm, 4°C). Das Pellet wurde in 50ml kalten CaCl₂ (50mM) vorsichtig resuspendiert und für 20min auf Eis inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation (5min, 2500rpm, 4°C). Das Bakterienpellet wurde in 10ml kalten CaCl₂ (50mM) + 15% Glycerol resuspendiert und schließlich in 100µl Aliquots in Reaktionsgefäßen portioniert. Vor der Lagerung bei -80°C wurde in die Deckel der Reaktionsgefäße mit einer Kanüle ein Loch gestochen und Aliquots in flüssigen N₂ schockgefroren.

3.2.2 Herstellung von LB-Amp-Agarplatten

1l LB-Agar wurde in der Mikrowelle geschmolzen und nach Abkühlen auf ca. 55°C mit 100µg/ml Ampicillin Stock versetzt. Danach wurde der LB-Amp-Agar in Petrischalen (9cm) gegossen und bis zum Erstarren bei Raumtemperatur belassen. Die fertigen Agarplatten wurden bei 4°C gelagert.

3.2.3 Transformation kompetenter Bakterien

Ein 100µl Aliquot kompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden dem Aliquot 5µl des Ligationsansatzes oder 10ng Plasmid-DNA zugegeben und der Ansatz dann für 20min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock (42°C für 30sek). Nach anschließender zweiminütiger Abkühlung auf Eis wurden 500µl 1x LB-Medium ohne Ampicilin zugegeben und für 45min unter Schütteln (700rpm) bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend auf LB-Amp-Agarplatten ausgestrichen (50µl, 200µl).

3.2.4 TA-Klonierung

Taq-Polymerase hat die Eigenschaft an das 3'-Ende eines PCR-Produkts ein Deoxyadenosin-Molekül anzuhängen. Bei der TA-Klonierung werden PCR-Fragmente in einen Vektor mit Desoxythymidin-Überhängen kloniert. Die Ligation erfolgte in einem molekularen Verhältnis von 3:1 (Insert : Vektor) bei 14°C über Nacht.

3.2.5 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA ("Mini-Präp")

Für die Mini-Präp wurden 2ml Selektionsmedium (LB + Ampicillin) mit einer Bakterienkolonie von einer LB-Amp-Agarplatte beimpft und ü/N bei 37°C unter Schütteln (225rpm) inkubiert.

1,5ml der Übernachtskultur wurden anschließend pelletiert (20sek, 13000rpm), der Überstand abgesaugt und das Pellet in 150µl Plasmid Puffer 1 resuspendiert. Durch Zugabe von 300µl Qiagen-Puffer P2 wurden die Bakterien lysiert (alkalische Lyse). Das Lysat wurde anschließend mit 150µl Qiagen-Puffer P3 neutralisiert. Die

Zelltrümmer und Proteine wurde durch Zentrifugation (5min, 13200rpm) pelletiert und 500µl des Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine Extraktion und Präzipitation der DNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und EtOH. Die aufgereinigte DNA wurde in 40µl H₂O aufgenommen.

3.2.6 Präparation großer Mengen Plasmid-DNA ("Maxi-Präp")

Es wurde das „NucleoBond ExtraMaxi plus“ Kit zur Aufreinigung der Plasmid-DNA verwendet, dabei wurde streng nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Zunächst wurden 200ml einer Übernachtskultur zentrifugiert (15min, 5000rpm, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in Puffer P1 resuspendiert und die anschließende Lyse mit Puffer P2 (5min, RT) durchgeführt. Es folgte die Neutralisierung mit Puffer P3 (1min, RT). Anschließend wurde erneut zentrifugiert (15min, 7000rpm, 4°C) und der Überstand auf der Anionenaustauscher-Matrix der Säule aufgereinigt. Die DNA wurde gewaschen, von der Säule eluiert und mit Isopropanol gefällt. Nach der Fällung wurde die DNA mit dem im Kit enthaltenen Finalizer aufbereitet und in 500µl A. bidest aufgenommen.

3.3 Nukleinsäureanalytik

3.3.1 DNA-Isolation aus Geweben und Zellen

Die Gewebestücke oder Zellpellets wurden über Nacht in 710µl Lyse-Puffer und 40µl Proteinase K-Lösung (10mg/ml) bei 56°C lysiert. Am nächsten Tag wurden die Proben 5 min bei Raumtemperatur gemischt. Nach Zugabe von 300µl 5M NaCl wurden die Proben erneut 5 min gemischt und anschließend zentrifugiert (10', 13000rpm, 10°C). Zur Präzipitation der DNA wurden 750µl des Überstandes in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit vorgelegten 500µl 2-Propanol überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (15', 13000rpm, 4°C) wurde das Präzipitat zweimal mit 500µl 70%igem Ethanol gewaschen und für min im Vakuumkonzentrator getrocknet. Die DNA wurde in 400µl H₂O aufgenommen und für mindestens zwei Stunden bei 37°C gelöst.

3.3.2 RNA-Isolation aus Geweben und Zellen mittels Trizol

Das Gewebe oder die Zellen wurden in 1000µl Trizol lysiert und bei RT fünf Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 200µl Chloroform wurden die Proben geschüttelt und für weitere drei Minuten bei RT inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (15', 10.800rpm, 4°C) wurden ca. 600µl der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch Zugabe von 500µl Isopropanol und einer 30-minütigen Inkubation bei -20°C. Die präzipitierte RNA wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuumkonzentrator getrocknet. Das Pellet wurde in 50-100µl DEPC-Wasser gelöst.

3.3.3 RNA-Isolation aus Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte wurden auf FrameSlides aufgezogen, einer immunhistologischen Färbung unterzogen und mittels Laser-Dissektion ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Bereiche wurden in Adhesive Cap Reaktionsgefäßen aufgefangen und RNA-Isolation erfolgte mit dem NucleoSpin FFPE RNA Kit unter Befolgung der zugehörigen Anweisungen.

3.3.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen beruht auf der Messung der Absorption mit einem Photometer. Dabei besitzen Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260nm. Als Eichwert für die Messung dient der Absorptionswert des verwendeten Lösungsmittels. Die Absorptionsbestimmung erfolgte bei einer Verdünnung der Nukleinsäurelösung von 1:100, so dass dieser Faktor bei der Konzentrationsberechnung berücksichtigt werden musste.

3.3.5 Restriktionsverdau

Für die Restriktionen wurden Typ II Restriktionsendonukleasen verwendet.

In einem analytischen Verdau wurde 1 µg DNA mit 2 µl 10x Restriktionspuffer und 1 µl Enzym (10U/µl) versetzt (oder je 0,5 µl pro Enzym bei Doppelverdau) und das Reaktionsvolumen mit H₂O auf 20 µl eingestellt. Je nach verwendetem Enzym wurden dem Ansatz 2 µl 10x BSA beigefügt und das H₂O –Volumen entsprechend verringert. Der Reaktionsansatz wurde für 5 min bei 37°C inkubiert.

Für einen präparativen Verdau wurden 10-15 µg DNA mit 7 µl 10x Restriktionspuffer und 5 µl Enzym (10U/µl) versetzt (oder 2,5 µl pro Enzym bei Doppelverdau) und das Reaktionsvolumen mit H₂O auf 70 µl eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend 5-30 min 37°C inkubiert.

3.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

100ng des zu ligierenden Vektors wurden mit dem 3fachen molaren Überschuss an Insert gemischt. Dem Ansatz wurden 2 µl 10x Ligationspuffer und 1 µl T4-Ligase (1U/µl) zugegeben und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Der Ligationsansatz wurde für 30 min bei RT, oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

3.3.7 Agarose-Gelelektrophorese zur Größenfraktionierung nativer DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Gemischen und deren Größenbestimmung. Dabei macht man sich zu Nutze, dass DNA in gelöstem Zustand bei neutralem pH-Wert aufgrund ihrer sauren Phosphatgruppen negativ geladen ist. Auf Grund dessen wandert sie im elektrischen Feld zur Anode, dabei wirkt die Gelmatrix, welche die DNA-Moleküle durchwandert, als molekulares Sieb, das große DNA-Moleküle stärker zurückhält als kleine. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle ist abhängig von der jeweiligen Feldstärke. Der Größenbereich, in dem die höchste Auflösung erreicht wird, wird durch die Agarosekonzentration der Gelmatrix bestimmt. In Abhängigkeit der aufzutrennenden Fragmentgrößen wurden horizontale 1 bzw. 1,5%ige Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde mit 1x TAE-Puffer versetzt und

in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde das zur Detektion der DNA notwendige Ethidiumbromid (0,5µg/ml) zugegeben, die Mischung in die Gelkammer gegossen und ein entsprechender Kamm gewählt. Das ausgehärtete Gel wurde mit 1x TAE-Puffer überschichtet, die Proben mit 1/10Volumen 10x Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 90-105V. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenz des interkalierenden Ethidiumbromids bei UV-Licht (320nm).

3.3.8 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Mit Hilfe des „Zymoclean Gel DNA Recovery“-Kits können DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen aufgereinigt werden. Nach Agarose-Gelelektrophorese und Lokalisierung des gewünschten Fragments unter UV-Licht wurde dieses mit einem Skalpell ausgeschnitten. Alle weiteren Schritte wurden nach dem „Zymoclean Gel DNA Recovery“-Handbuch durchgeführt.

3.3.9 cDNA-Synthese und RT-PCR

Die RT-PCR (reverse Transkriptase-PCR) bietet eine Möglichkeit die Transkription von Genen in bestimmten Zellen oder Geweben zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde zunächst die RNA aus Zellen oder Gewebe isoliert und die in diesem RNA-Gemisch enthaltene mRNA mittels reverser Transkriptase in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Die reverse Transkriptase benutzt dabei die mRNA als Matrize für die cDNA-Synthese, was bedeutet, dass die cDNA keine Introns enthält, da diese bekanntlich aus der mRNA herausgespliced werden. Dies muss bei der Auswahl der Primer für die mit der cDNA durchzuführende Identifizierungs-PCR berücksichtigt werden. Führt man mit der gewonnenen cDNA eine PCR mit Primern durch, die spezifisch sind für eine DNA-Sequenz im Gen von Interesse, so kann man bei erfolgreicher Amplifikation davon ausgehen, dass dieses Gen im jeweiligen Zell- o. Gewebetyp transkribiert wird.

Für die Synthese von cDNS wurde wie folgt verfahren: 500ng RNA wurde mit 1µl random Hexameren) und 1µl dNTPs (10mM) gemischt und das Volumen mit RNase

freiem Wasser auf 13µl eingestellt. Anschließend folgte ein Denaturierungsschritt für 5min bei 65°C um eventuelle Sekundärstrukturen der RNS aufzulösen. Nach dem Denaturieren wurde das Nukleinsäuregemisch auf Eis abgekühlt und es folgte die Zugabe von 1µl „SuperScript III“-Reverser Transkriptase, 1µl DTT (0,1M), 1µl RNaseOut und 4µl Reverse Transkriptase-Puffer. Die Synthese der cDNS erfolgte für 1h bei 55°C, an die sich ein 15-minütiger Hitze-inaktivierungsschritt bei 70°C anschloss.

3.3.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der in vitro Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte. Diese Methode beruht auf einem einfachen Prinzip, bei dem man sich zu Nutze macht, dass DNA bei Temperaturen von mehr als 90°C in Einzelstränge denaturiert und kleinere Oligonukleotide (Primer) sich bei einem Absenken der Temperatur an homologe Sequenzen anlagern können (Annealing). Ausgehend von den 3'-Enden dieser Startermoleküle synthetisiert eine DNA-Polymerase nach Vorgabe der DNA-Matrizen neue komplementäre DNA-Stränge, die nach erneuter Denaturierung selbst als Matrize fungieren. Viele hintereinander ablaufende Zyklen aus Denaturierung der DNA-Doppelstränge, Anlagerung der Primer und DNA-Synthese bewirken eine exponentielle Amplifikation der zwischen zwei Primern liegenden Sequenz.

Dabei leitet sich ein Primer vom Sinnstrang (sense-Primer), der andere vom Gegensinnstrang (antisense-Primer) ab. Da zum Denaturieren der DNA der Reaktionsansatz auf 94°C gebracht wird muss eine thermostabile DNA-Polymerase eingesetzt werden, üblicherweise handelt es sich dabei um die aus *Thermus aquaticus* isolierte Taq-Polymerase. Bei niedrigen Temperaturen kann es zu unspezifischer Primer-Bindung kommen, ist die DNA-Polymerase zu diesem Zeitpunkt bereits aktiv werden störende unspezifische Nebenprodukte amplifiziert. Um dies zu vermeiden kann eine sogenannte „Hotstart“-PCR durchgeführt werden, dabei wird die Polymerase-Reaktion erst gestartet wenn die DNA vollständig denaturiert ist und die Primer auf Grund der Temperatur spezifisch binden. Es gibt verschiedene Möglichkeiten einen Hotstart einzuleiten, eine davon besteht darin eine

Hotstart-DNA-Polymerase zu verwenden, die erst bei Erreichen der Denaturierungstemperatur aktiviert wird.

Reaktionsansatz für die Genotypisierung muriner AP-2 γ -Allele:

10,0 μ l genomische DNS

1,0 μ l dNTPs (10mM)

1,0 μ l In4down (10 μ M)

1,0 μ l Ex5up (10 μ M)

1,0 μ l Ex6up (10 μ M)

5,0 μ l PCR-Puffer

2,5 μ l MgCl₂ (50mM)

0,2 μ l Dream Taq (5U/ μ l)

ad 50 μ l ddH₂O

Reaktionsprotokoll für die Genotypisierung muriner AP-2 γ -Allele:

94°C, 1min

94°C, 45sec

53,5°C, 30sec x37

72°C, 1,5min

Reaktionsansatz für den Nachweis von Transkripten:

1,0 μ l cDNS

1,0 μ l dNTPs (10mM)

1,0 μ l Oligonukleotid-F (10 μ M)

1,0µl Oligonukleotid-R (10µM)

5,0µl PCR-Puffer

2,0µl MgCl₂ (50mM)

0,2µl Platinum-Taq-Polymerase (5U/µl)

ad 50µl ddH₂O

Reaktionsprotokoll für den Nachweis von Transkripten:

94°C, 2min

94°C, 45sec

55-62°C, 30sec Anzahl der Zyklen unterschiedlich je nach Template

72°C, 30sec

Transkript	Annealing Temperatur (c°)
murines GAPDH	60
murines Sox2	63
murine Nanos3	60
murines Blimp1	63
muriner ER-α	60
murines Dmrt1	63
murines Kit	63
Murines AP-2γ	57
murines H19	57
murines Nanog	63
murines p21	60
murines Map2k1	60

humanes p21	60
humanes GAPDH	60
Humanes AP-2 γ	60
humanes Map2k1	60

3.3.11 Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR (qRT-PCR), auch „Real-Time“-RT-PCR genannt, ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und zusätzlich die exakte quantitative Analyse der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst wird. Während der Elongationsphase der PCR wird ein Fluoreszenzfarbstoff in die DNA eingebaut. Am Ende eines Laufs wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR durchgeführt. Die Technik der quantitativen RT-PCR stellt eine deutlich sensiblere Methode zum Vergleich von Transkriptmengen dar, als die semiquantitative RT-PCR. Zum einen können in einer qRT-PCR deutlich geringe Unterschiede in Transkriptmengen detektiert werden, zum anderen können die Transkriptmengen näherungsweise sehr exakt berechnet werden und beruhen nicht auf rein optischen oder graphischen Auswertungen wie nach einer semiquantitativen RT-PCR.

Zur Durchführung einer qRT-PCR wurde hochqualitative RNA ($260/280\text{nm} = 2.0$, $260/230\text{nm} = 2.0$) aus Gewebe mit Hilfe des RNAqueous-4 PCR-Kits nach dessen Handbuch isoliert. Die cDNS-Synthese erfolgte wie beschrieben. Die qRT-PCR wurde in einem „7900HT Fast Real-Time PCR System“ durchgeführt. Jede individuelle Analyse wurde in Triplikaten durchgeführt. Der Ct-Wert wurde ermittelt, wenn die Amplifikationskurve eines Transkripts das Hintergrundfluoreszenzrauschen zum ersten Mal überstieg. Die quantitativen Transkriptmengen wurden aus den individuellen, gemittelten Ct-Werten relativ zu GAPDH ermittelt. Dabei verwendete man folgende Rechnung:

$$2^{-(\text{delta Ct Transkripts X} - \text{delta Ct GAPDH})}$$

Aus den errechneten Werten für die Kontrollproben und den eigentlichen Testproben wurde ein Quotient gebildet, welcher die x-fache Änderung (negativ oder positiv) der Transkriptmenge angibt. Um zu berechnen, ob die Expressionsänderungen zwischen den verglichenen Gruppen statistisch signifikant sind wurde der zweiseitige, heteroskedatische student'sche T-Test verwendet. Die Expressionsänderung wurde als signifikant betrachtet bei $p < 0,05$.

3.3.12 Natrium-Bisulfit-Behandlung genomischer DNA

Die Natrium-Bisulfit-Behandlung genomischer DNA stellt eine Methode zur Detektion von DNA-Methylierung dar. Hierfür wird genomischer DNA nach Behandlung mit Natrium-Bisulfit durch PCR mit „Primern“, die speziell an die Natrium-Bisulfit behandelte Sequenz angepasst wurden, amplifiziert. Bei Säugetieren findet die Methylierung der DNA an CpG-Dinukleotiden statt. Durch Natrium-Bisulfit wurden alle Cytosine innerhalb der genomischen Sequenz, die nicht von einem Guanin gefolgt sind, und alle Cytosine innerhalb eines unmethylierten CpG-Dinukleotides in Uracil konvertiert. An methylierten CpG-Dinukleotiden findet diese Konversion nicht statt.

Es wurden 500ng genomischer DNA in 20µl H₂O gemischt und nach Anleitung des „EZ DNA Methylation Direct“-Kits konvertiert. Die Sulfonierung der Cytosine am 6. Kohlenstoffatom kann nur an einzelsträngiger DNA erfolgen, daher wurde die Probe für acht Minuten bei 98°C denaturiert. Es folgte eine 3½-stündige Inkubation bei 64°C. Hier kam es zur hydrolytischen Deaminierung der Cytosin-Sulfonaten zu Uracil-Sulfonaten. Die konvertierte DNA wurde nun über eine Silikasäule aufgereinigt, währenddessen kommt zu einer alkalischen Desulfonierung der Uracil-Sulfonate zu Uracil. Die entsprechenden Cytosine waren nun vollständig zu Uracil konvertiert. In der darauf folgenden PCR-Reaktion wurden die Uracil-Nukleotide durch Thymidin-Nukleotide ersetzt. Unmethylierte CpG-Dinukleotide wurden daher bei späterer Sequenzierung nach Sanger als TpG-Dinukelotide und methylierte CpGs weiterhin als CpGs wiedergegeben.

3.3.13 Expressions-Microarray

Microarrays erlauben die Betrachtung des globalen Genexpressionsprofils von Zellen, oder eines Gewebes mit geringem Probenmaterialaufwand. In diesem Fall wurden Affymetrix Mouse Gene ST 1.0 Arrays verwendet. Auf diesem Array sind 28.853 Gene vertreten. Jedes Gen wird dabei durch 27 verschiedenen Oligonukleotid-Sonden repräsentiert, die über die gesamte Transkriptlänge verteilt sind, um auch verschiedene Spliceformen detektieren zu können. Der Array wird mit fluoreszenzmarkierter sscDNA hybridisiert und die Fluoreszenzsignale können der Expressionsstärke der einzelnen Gene zugeordnet werden. Hierfür wurde mit dem RNeasy minikit von Qiagen RNA aus frischpräpariertem Gewebe isoliert. Die Konzentration der RNA wurde mit dem Nanodrop 1000 Spektrometer bestimmt und der RIN-Wert wurde am Bioanalyzer 2100 ermittelt. Für die primäre cDNA-Synthese mit random Primern wurden 300ng RNA eingesetzt. Dann folgte eine Amplifikation und die Markierung mit dem Affymetrix Whole-Transcript Sense Target Kit. Der Array wurde mit 11µg der erhaltenen sense DNA hybridisiert und auf einer GeneChip Fluidics Station 40 gewaschen und gefärbt. Das Auslesen des Arrays erfolgte an einem GeneChip Scanner 3000 7G. Die Auswertung der Rohdaten wurde unter Benutzung eines „robust multichip average (RMA) Algorithmus“, mit der GeneSpring GX 11 Software von Agilent durchgeführt.

3.4 Proteinanalytik

3.4.1 Proteinisolation aus Gewebe

Tiefgefrorenes Gewebe wurden in 100µl RIPA-Puffer (3ml/g Gewebe) lysiert und für 30min bei regelmäßigem Mixen auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 13000rpm für 20min. Der Überstand, der den Proteinextrakt enthielt, wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinproben wurden bei -20°C gelagert.

3.4.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das „BCA Protein Assay Reagent Kit“ von Pierce benutzt. Der Assay basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} -Ionen durch Proteine in einem alkalischen Milieu. Der Nachweis der Cu^{1+} -Ionen erfolgt durch ein BCA(bicinchoninic acid)-haltiges Reagenz. Dabei bildet ein Cu^{1+} -Ion einen lila Komplex mit zwei Molekülen BCA, welcher ein Absorptionsmaximum bei 562nm besitzt. Die Absorption ist in einem Bereich von 20-2000 $\mu\text{g/ml}$ linear zur Proteinkonzentration. Die Proteinkonzentration wurde im Vergleich zu einem Standard (BSA) bestimmt, dazu wurde eine Verdünnungsreihe des Standardproteins hergestellt und zusammen mit den Proben unbekannter Konzentration im Photometer gemessen. Aus den Messwerten für die Verdünnungsreihe kann eine Standardkurve erstellt werden, aus der eine Geradengleichung abgeleitet werden kann. Die Messwerte der Proben unbekannter Konzentration wurden in diese Gleichung eingesetzt, die Gleichung umgestellt und die Konzentration ausgerechnet.

Für die Nachweisreaktion wurden 10 μl jeden Standards und 10 μl jeder Proteinprobe in ein Well einer Mikrotiterplatte pipettiert, es wurden in jedes Well 200 μl Farbreagenz zugegeben und die Platte für 30min bei 37°C inkubiert. Als die Platte auf RT abgekühlt war, wurde die Absorptionsmessung im Photometer durchgeführt.

3.4.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese

Wie DNA-Fragmente können auch Proteingemische in einer Gelmatrix durch das Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt werden. Dabei ist die elektrophoretische Beweglichkeit eines Proteins im Gel abhängig von seiner molekularen Masse, seiner Ladung und seiner Konformation. Um zu erreichen, dass die Auftrennung des Proteingemischs nur auf Grund der molekularen Masse geschieht, macht man sich die SDS-Gelelektrophorese zu Nutze. Für diese Form der Elektrophorese werden Polyacrylamidgele verwendet und das SDS (Natriumdodecylsulfat) sowohl der Gelmatrix als auch dem Laufpuffer beigefügt. Das SDS dringt mit seinen lipophilen Seitenketten in das ebenfalls lipophile Innere von gefalteten Proteinen ein und lagert sich mit seinen Dodecylresten an hydrophobe Abschnitte der Aminosäureketten an, wodurch es zur Zerstörung der Tertiärstruktur

des Proteins kommt (Denaturierung). Auf der Oberfläche der Protein/SDS-Komplexe sind die polaren, negativ geladenen Sulfatgruppen der SDS-Moleküle zu finden. Diese negative Ladung maskiert die Eigenladung des Proteins und führt bei Anlegen einer Spannung zur Wanderung des Proteins zur Anode. Zur Größenbestimmung der Proteine wird ein Proteinstandard aufgetragen. Die Proteine wurden vor dem Beladen des Gels mit 4x Lämmli-Puffer versetzt, 5min bei 95°C denaturiert und 5min auf Eis abgekühlt. Für die Gelelektrophorese, sowie den Transfer der DNA wurde das Bio Rad „Electrophoresis Module Mini Protean 3“ benutzt. Die Proben wurden auf das vorbereitete Gel aufgetragen und bei 30mA elektrophoretisch aufgetrennt. Die verwendeten Gele waren wie folgt zusammengesetzt:

Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
4,0ml Wasser	3,4ml Wasser
3,3ml Acrylamid-Lösung (30%)	0,83ml Acrylamid-Lösung (30%)
2,5ml Tris-Puffer (1,5M; pH8,8)	0,63ml Tris-Puffer (1,5M; pH8,8)
0,1ml SDS (10%)	0,05ml SDS (10%)
0,1ml APS (10%)	0,05ml APS (10%)
4,0µl TEMED	4,0µl TEMED

3.4.4 Immuno-Blot (Western-Blot)

Der Western-Blot ermöglicht den empfindlichen Nachweis eines durch SDS-Gelelektrophoreses aufgetrennten Proteins mit Hilfe von Antikörpern, die das gesuchte Protein spezifisch erkennen. Hierzu werden die auf dem Gel aufgetrennten Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid) transferiert. Der Blotaufbau setzte sich aus einem Schwamm, zwei Lagen Blotting-Papier, dem Gel, Membran (zuvor in Methanol und anschließend Transferpuffer equilibriert), weiteren zwei Lagen Blotting-Papier und noch einem Schwamm zusammen. Dieses „Sandwich“ wurde zwischen zwei

löchrigen Plastikplatten eingespannt und mit der Membran zur Anode hingewandt in das „Electrophoresis Module Mini Protean 3“ eingesetzt. Die Vorrichtung wurde mit Transferpuffer gefüllt und der Transfer bei 4°C und 30V ü/N durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in PBS gewaschen und dann 1h in 5%iger Milchpulverlösung geblockt. Anschließend wurde 4x für 5min in PBST gewaschen. Der primäre Antikörper wurde mit 5%iger Milchpulverlösung auf eine geeignete Verdünnungsstufe in einem Gesamtvolumen von 4ml gebracht. Es wurde 1h unter Schütteln inkubiert und dann erneut 4x für 5min mit PBST gewaschen. Als sekundäre Antikörper wurden Meerrettichperoxidase-gekoppelte anti-Maus bzw. anti-Kaninchen Antikörper eingesetzt. Bei der Substratumsetzung durch die Meerrettichperoxidase tritt Chemilumineszenz auf, welche zur Belichtung geeigneter Filme, und somit zum Nachweis des Proteins führt. Der sekundäre Antikörper wurde in einem Gesamtvolumen von 4ml Milchpulverlösung 1:1000 verdünnt und ebenfalls für 1h auf der Membran belassen. Es wurde wieder 4x für 5min mit PBST gewaschen und dann das Substrat für die Meerrettichperoxidase auf die Membran aufgetragen. Als Substrat wurde „SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate“ eingesetzt. Die im Kit enthaltenen Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, 5min im Dunkeln inkubiert, auf die Membran getropft, nochmals 5min im Dunkeln inkubiert, dann wurde die Membran abgestreift, in Folie eingeschlagen, in einer Filmkassette fixiert und ein Biomax-Film aufgelegt. Die Bandenstärke auf dem entwickelten Filmen wurde teilweise mit der ImageJ Software quantitativ ausgewertet.

3.4.5 Entfernen von Antikörpern von der PVDF-Membran („strippen“)

Nach der Chemolumineszenz-Detektion kann die PVDF-Membran mit den immobilisierten Proteinen einer weiteren Detektion mit Antikörpern unterzogen werden. Dafür wurde die Membran für eine halbe Stunde bei 60°C mit „Stripping“-Puffer gewaschen, um die Reaktionslösung sowie Primär- und Sekundärantikörper zu entfernen. Nach der Inkubation mit „Stripping“-Puffer wurde die Membran zweimal für jeweils 10min mit PBST gewaschen und konnte anschließend wie gewohnt mit PBSTM geblockt werden.

3.5 Histologische Analytik

3.5.1 Fixierung von Geweben

Die Fixierungsmethode richtet sich danach was für Versuche später mit dem Gewebe durchgeführt werden sollen. Schließen sich Färbungen für histologische Betrachtungen an, so ist eine Fixierung mit Formalin angemessen, deren Dauer sich nach dem Durchmesser der Probe richtet. Soll aus dem Gewebe außerdem DNA oder RNA isoliert werden, so wird mit 100% Ethanol inkubiert und anschließend dreimal für 10 min bei RT gewaschen.

3.5.2 Einbetten von Geweben

Nach der Fixierung wurden die Präparate in Einbettkassetten überführt und unter fließendem Wasser ausgiebig gewässert bevor sie in die Einbettmaschine gelegt wurden. Dort durchliefen sie zuerst eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 60%, 70%, jeweils 1 h 35 min; 80%, 96%, 2x100%, jeweils 1 h), wurden anschließend in Xylol (1 h, 2x 30 min) und schließlich in Paraffin überführt (3x 1h) und schließlich in diesem bis zur weiteren Verwendung gelagert. Am nächsten Tag wurden die Präparate aus den Einbettkassetten genommen und in Paraffinblöcke gegossen, welche bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden.

3.5.3 Herstellung von Paraffin-Schnitten

Die Paraffinblöcke wurden in ein Mikrotom eingespannt und Schnitte von 3 µm Dicke wurden angefertigt. Diese wurden bei 45°C im Wasserbad geglättet, auf Objektträger oder FrameSlides aufgezogen und bei 37°C über Nacht im Brutschrank getrocknet.

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

Die Gewebeschnitte 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 „Eukitt“ eingedeckt.

3.5.5. Immunhistochemie

Die Schnitte wurden zunächst in Xylol (2x 10 min), danach in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (100%, 96%, 70%, jeweils 5 min) und in H₂O überführt. Endogene Peroxidasen wurden in Methanol/H₂O₂ (25:1) für 20 min geblockt. Zur Antigen-Demaskierung wurden die Schnitte in Citrat-Puffer für 5x5min bei 600 Watt in der Mikrowelle gekocht. Die abgekühlten Schnitte wurden schließlich 30 min mit Pferde-Serum bei RT geblockt, bevor der

Primärantikörper zugegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurde 3x5min mit TBS gewaschen, bevor der Sekundärantikörper hinzugegeben und für 2h bei RT inkubiert wurde. Danach wurde wiederum 3x5min mit TBS gewaschen. Zur Detektion des Sekundärantikörpers wurde die Avidin-Biotin-Methoden gewählt (ABC-Komplex). Die Inkubation mit dem ABC-Komplex erfolgte für 30 min bei RT. Als Chromogen wurde AEC-Lösung verwendet, wobei die Färbereaktion unter dem Mikroskop kontrolliert und nach ausreichender Inkubation abgebrochen wurde. Die Schnitte wurden mit Leitungswasser gespült bevor eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt wurde. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Aquatex eingedeckt.

3.5.6 X-Gal-Färbung von Embryonen

Die Embryonen wurden in kaltem PBS präpariert und anschließend 1h bei RT mit Glutaraldehyd und Formaldehyd fixiert. Danach wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und über Nacht in Färbelösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Färbelösung abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen. Nach der Färbung wurden die Embryonen zur Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe

geführt und anschließend in einem 1:2 Gemisch aus Benzylalkohol und Benzyl Benzoat geklärt.

3.6 Methoden für die Zellkultur

3.6.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Inkubation der Zellen erfolgte in Brutschränken mit wassergesättigter Atmosphäre bei 37° C. Der CO₂-Gehalt der Atmosphäre betrug im Zellinkubator 7,5%. Soweit nicht anders vermerkt, sind die Kulturmedien vor ihrer Verwendung auf 37°C temperiert und es handelt sich bei dem verwendeten PBS immer um Dubecco's Phosphate Buffered Saline ohne Mg²⁺- und Ca²⁺-Ionen. Alle Arbeiten zur Kultivierung von Zellen wurden in Sterilbänken mit Laminar-Luftstrom durchgeführt.

3.6.2 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden schnell bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, in Medium gewaschen, abzentrifugiert und in entsprechender Menge Medium aufgenommen und auf Gewebekulturschalen ausgesät.

3.6.3 Splitten von Zellen

Kurz bevor die Zellen auf den Gewebekulturschalen Konfluenz erreichen sollten diese regelmäßig in einem geeigneten Verhältnis gesplittet werden. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und zweimal mit PBS gewaschen, dann wurden die Zellen für 3min bei 37°C mit 0,05% Trypsin behandelt. Nach Inkubation wurde die Reaktion mit dem doppelten Volumen Medium abgestoppt, die Zellen durch auf- und abpipettieren von der Platte gelöst und vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in Blaudeckelröhrchen überführt, 5min bei 1200rpm zentrifugiert, das Medium abgesaugt, die Zellen kurz aufgeschnippt, im entsprechenden Volumen Medium resuspendiert und auf neuen Gewebekulturschalen oder Platten ausplattiert.

3.6.4 Einfrieren von Zellen

Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Zellen trypsinisiert, vereinzelt, gewaschen und abzentrifugiert. Die Zellen wurden in einem 500µl Einfriermedium (90% FCS; 10% DMSO) aufgenommen und sofort bei -80°C eingefroren.

3.6.5 Bestimmung der Zellzahl

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

3.6.6 Transfektion von Zellen mittels Lipofectamin2000

Am Tag vor der Transfektion wurden $1,25 \times 10^5$ Zellen pro Well einer vorbereiteten 24-Lochplatte ausgesät. Direkt vor der Transfektion wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und 500µl serumfreies Medium in jedes Well gegeben. Pro Well wurden für die Transfektion 800ng DNA eingesetzt; das DNA Volumen wird mit serumfreiem ES-Medium auf 50µl pro Well aufgefüllt. Desweiteren wurden pro Well 2µl Lipofectamin eingesetzt. Dem Lipofektamin wurde pro Well 48µl serumfreies Medium zugegeben, gemischt und 3min bei RT inkubiert. Pro Well wurden dann 50µl DNA Lösung und 50µl Lipofectamin Lösung gemischt und zur Bildung der DNA/Lipofectamin-Komplexe 30min bei RT inkubiert, wobei zwischendurch ab und zu gemischt wurde. Es wurden pro Well 100µl DNA/Lipofectamin-Gemisch hinzupipettiert und die Zellen über Nacht bei 37°C im Inkubator belassen. Abschließend wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und 1ml ES-Medium hinzugegeben.

3.6.7 Luziferaseassay

Beim Luziferaseassay wird die Substratumsetzung eines Reportergens (hier Firefly-Luciferase) gemessen. Die Luziferase oxidiert dabei D(-)-Luciferin in einer zweistufigen, ATP-abhängigen Reaktion, wobei Lichtblitze erzeugt werden, die von

einem Luminometer erfasst werden können (die Messung der Lichtemission erfolgt bei einer Wellenlänge von 562nm). Anhand der gemessenen Lichtemission lassen sich Rückschlüsse auf die Transfektionseffizienz, die Expressionsstärke der Luziferase und somit auf die Aktivierung der verwendeten Promotors ziehen. Zur Expression der Luziferase werden Expressionsvektoren benutzt, die ein Fusionskonstrukt aus einem Promotor und dem Luziferasegen enthalten, hierbei ist es wichtig einen Promotor zu wählen, der in dem zu untersuchenden Zelltyp aktiviert werden kann.

Zur Messung der Luziferaseaktivität wurde den zu untersuchenden Zellen zunächst das Medium entzogen und 2x mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100µl Lysispuffer/Well (auf einer 24-Lochschale). Durch den Lysispuffer wurden die Zellen von der Kulturschale abgelöst und aufgeschlossen, so dass die Luziferase freigesetzt wurde. Bis zur Messung der Luziferase-Aktivität wurde das Lysat in 1,5ml Reaktionsgefäßen auf Eis gelagert.

Nach der Lyse der Zellen werden je 10µl des Lysates in jeweils ein Well einer 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt und diese in das Chemoluminometer eingeführt.

Das Gerät spritzt anschließend in jedes Well 50µl Luziferase-Puffer und misst die dabei auftretende Lichtemission. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt.

3.6.8 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 vereinzelt und auf eine 12-well-Platte ausgesät (eine Genitalfalte pro Well), die eine Schicht SI/SI4mSCF220-Zellen enthielt. SCF220-Zellen dienen den Keimzellen als Nährzellen. Diese Zellen exprimieren membran-gebundenen Stammzellefaktor, 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 Aliquots zu 4×10^6 Zellen/Röhrchen eingefroren. Die Nährzellen wurden jeweils einen Tag vor den Keimzellen aufgetaut und ausplattiert.

3.6.9. Alkalische Phosphatase-Färbung von Keimzellen

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 wurden 2 Tropfen Lösung A gegeben und

geschüttelt. Anschließend wurden 2 Tropfen Lösung B zugegeben und geschüttelt. Dasgleiche erfolgte für Lösung C. Die so hergestellte Färbelösung wurde auf die Zellen gegeben und ca. 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert.

4 Ergebnisse

4.1 Testikuläre Teratome bei AP-2 γ heterozygoten Mäusen

Wie gezeigt wurde führt die Deletion von AP-2 γ in murinen PGCs zu Sterilität in männlichen und weiblichen Tieren durch Keimzellverlust (Weber et al; 2010). Um einen potentiellen Gendosisseffekt zu untersuchen wurden AP-2 γ heterozygote Tiere in den C57BL/6 Stamm zurückgekreuzt. Diese Tiere zeigten jedoch keinen pathomorphisch aberranten Phänotyp. Daher wurden die Tiere in den 129/Sv-Stamm zurück gekreuzt. Bei diesem Inzuchtstamm treten bei dreiwochenalten Männchen mit einer Inzidenz von 1-10% spontan testikuläre Teratome auf (Stevens et al; 1957). Ab der 7. Generation der Rückkreuzung wurden in ca. 90% der männlichen Nachkommen testikuläre Teratome beobachtet, wohingegen die Weibchen keinen Phänotyp aufwiesen (Daten Dissertation Susanne Weber). Um die Teratomentstehung genauer zu untersuchen, wurde eine Kolonie AP-2 γ heterozygoter (+/-) Tiere im reinen 129/Sv-Hintergrund etabliert. Mit Fortschreiten der Rückkreuzung in den 129/Sv Stamm werden durch die zunehmende Entwicklung testikulärer Teratome die meisten AP-2 γ +/- Männchen steril. Daher wurden für die Zucht 129/Sv wildtyp (wt) Männchen mit 129/Sv AP-2 γ +/- Weibchen verpaart. Die Nachkommen aus dieser Verpaarung trugen nicht, wie nach mendelscher Verteilung zu erwarten, zu 50% das AP-2 γ Knock-out-Allel, sondern nur zu 28%. Ein möglicher Grund dafür könnte eine abgeschwächte Form des für AP-2 γ defiziente Tiere beschriebenen Entwicklungsdefekts der Plazenta sein, wodurch es zum Absterben der Embryonen bei der Implantation kommt (Werling und Schorle, 2002b). Für die Verringerte Geburtsrate zur Welt kommender AP-2 γ +/- Nachkommen bei dieser Verpaarung ist vermutlich die reduzierte AP-2 γ Expression im vom Embryo gebildeten Teil der Plazenta verantwortlich. Es wurden insgesamt 51 AP-2 +/- Männchen im Alter zwischen einem und 20 Monaten untersucht. Von den erhaltenen AP-2 γ heterozygoten männlichen Tieren entwickelten 82% testikuläre Teratome, wobei 35% der Tumoren bilateral ausgeprägt waren. Bei den 22 untersuchten wt

Kontrolltieren wurden keine Teratome beobachtet (Abb.6b). Dass in der Kontrollgruppe keine Teratome gefunden wurden (Erwartungswert 1-10%), ist wahrscheinlich dadurch begründet, dass die Anzahl der Tiere in der Kontrollgruppe ($n=22$) zu klein war um eine so geringe Tumorrare statisch korrekt abzubilden. Die Teratome waren oftmals am lebenden Tier bereits vor der Präparation sichtbar, die kleineren Tumore waren in der Regel makroskopisch an den herauspräparierten Hoden zu erkennen.

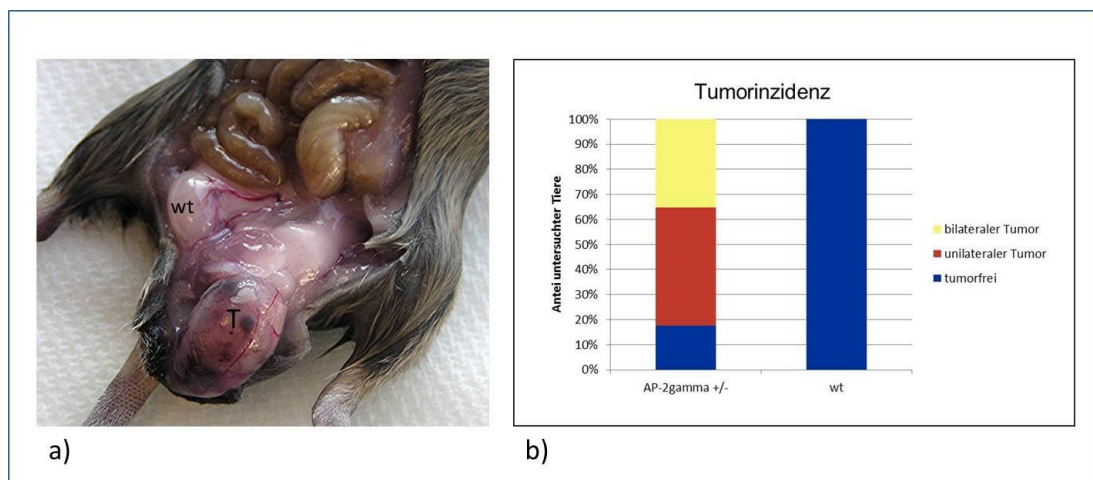


Abb.6: Tumorinzidenz a) Testikuläre Teratome wurden bei AP-2 γ +/- Mäusen ab der 7. Generation der Rückkreuzung in den 129/Sv Hintergrund beobachtet (T). b) 85% aller untersuchten Männchen waren von Tumoren betroffen, wobei bei 35% beide Hoden Teratome aufwiesen (bilateral). Bei den wt Kontrolltieren wurden keine Tumoren gefunden.

Auf histologischen Schnitten der neonatalen Hoden waren die Teratome bereits drei Tage nach der Geburt als Foci undifferenzierter Zellen zu sehen (Dissertation Susanne Weber). Die Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) von Hodenschnitten verschiedener Entwicklungsstadien wurden anhand von histologischen Gesichtspunkten durch Pathologen begutachtet und die vorhandenen Gewebe identifiziert. Ca. drei Wochen nach der Geburt wurde invasives Wachstum der Tumoren innerhalb der Hoden beobachtet, wobei die Läsionen nun zum Großteil aus undifferenziertem Gliagewebe bestanden (Abb.7a). Fünf Wochen nach der Geburt

hat der Tumor bereits die Hälfte der Samenkanälchen verdrängt und es sind weitere Gewebe im Tumor zu erkennen wie etwa Knorpel oder Epithel (Abb.7b).

Zwischen drei und sechs Monaten nach der Geburt waren die Tumoren komplett in reife Teratome ausdifferenziert, wobei diese festen oder zystischen Charakter haben konnten (Abb.8a). Wie für Teratome charakteristisch wurden in den reifen Tumoren Gewebe aus allen drei Keimblättern gefunden, wie beispielsweise Knochen und Knorpel (Abb.8d), Muskel (Abb.8c), hämopoetische Zellen (Abb.8d) (Mesoderm), Gliazellen (Abb.8b) (Ektoderm) und Drüsen (Abb.8b) (Endoderm). Die Teratome waren stets von einer Kapsel umgeben (Abb.6a), Metastasen wurden auch bei sehr alten Tieren nicht beobachtet, obwohl der Primärtumor eine beachtliche Größe erreicht hatte (>2cm Durchmesser). Generell schien die Tumorentwicklung keine negativen Auswirkungen auf die Lebenserwartung der betroffenen Tiere zu haben, da diese auch im Alter von ca. 20 Monaten noch keinerlei Verhaltensauffälligkeiten oder sonstige Krankheitsanzeichen zeigten.

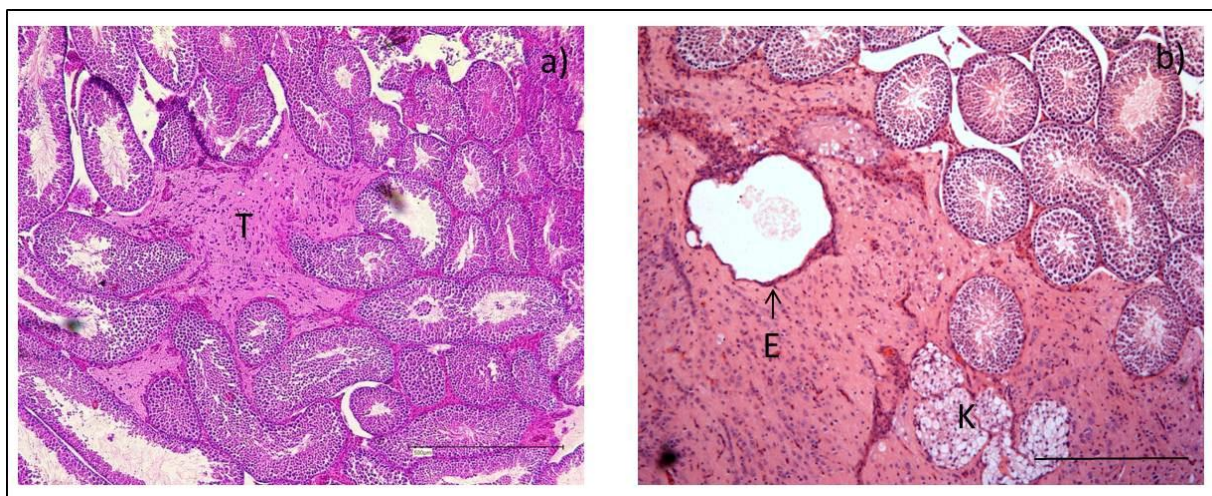


Abb.7: Teratomentwicklung a) HE-Färbung von Hoden drei Wochen alter Mäuse. Es wurde invasives Wachstum der Tumoren innerhalb der Hoden beobachtet (T), wobei die Läsionen hauptsächlich aus undifferenziertes Gliagewebe bestanden b) In HE-Färbungen fünf Wochen alter Mäusen haben die Tumoren bereits erhebliche Teile des Hodengewebes verdrängt und es sind weitere Gewebetypen innerhalb der Teratome zuerkennen, z.B. Epithel (E) und Knorpel (K). Der Größenbalken entspricht 500µm.

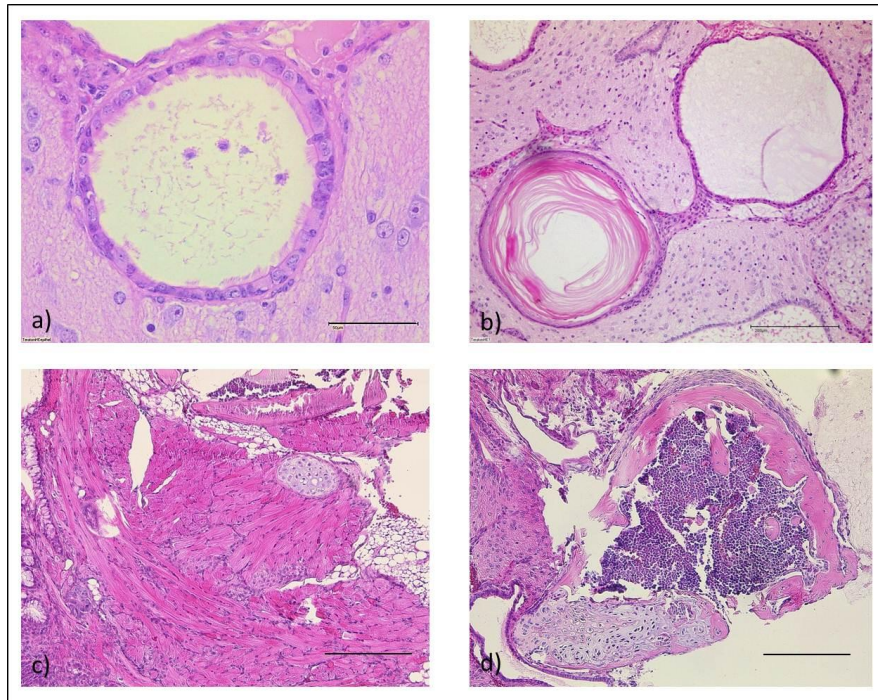


Abb.8: HE-Färbungen von Gewebetypen in reifen Teratomen a) Flimmerepithel b) Plattenepithel mit Verhornung c) Muskelgewebe d) Knorpel mit Ossifikation und Einlagerung von hämatopoetischen Zellen. Der Größenbalken entspricht 50 μ m

4.2 Analyse der Tumorvorläuferläsionen

Da schon bei neonatalen Tieren unreife Teratome beobachtet wurden, wird vermutet, dass die Tumorentstehung schon während der Embryonalentwicklung stattfindet. Die embryonalen Hoden wurden immunhistologisch untersucht, um festzustellen, ob es zu Unterschieden in der Markerexpression zwischen wt und AP-2 γ +/- Keimzellen kommt. Auffälligkeiten erlauben eventuell Rückschlüsse darauf welche Mechanismen bei der Tumorentstehung eine Rolle spielen, bzw. ermöglichen es den Zeitpunkt der Tumorentstehung einzugrenzen. Embryonen der Tage E15.5 bis E18.5 wurden präpariert, die Hoden wurden eine Stunde in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und Serienschnitte angefertigt. Nach hitzevermittelter Antigendemaskierung wurden diese Schnitte zunächst mit Antikörpern gegen die Pluripotenzmarker Oct3/4 und SSEA1 gefärbt. Es handelt sich dabei um Marker undifferenzierter Keimzellen, die ab Tag E15.5 nicht mehr, oder nur noch sehr schwach exprimiert sind. In AP-2 γ +/- Hoden hingegen konnten an Tag E15.5 intratubuläre Foci von Zellen beobachtet

werden, die stark positiv für Oct3/4 und SSEA1 (Fig 9 a und b) waren. Es wird vermutet, dass es sich bei diesen Zellen um den Ursprung der Teratome handelt. Bei weiteren Färbungen zeigte sich, dass die Oct3/4 positiven Zellen negativ für AP-2 γ und cKit waren (Abb.9c und d). Diese undifferenzierten „Teratomstammzellen“ werden auch als „embryonal carcinoma cells“ (ECC) bezeichnet (Pierce et al; 1967). ECCs sind gekennzeichnet durch einen großen, kondensierten Zellkern mit gut sichtbaren Nucleoli (Fig.10f). Auf Schnitten von Tag E18.5 ist deutlich zu erkennen, dass die proliferierenden ECCs aus dem betroffenen Samenkanälchen ausgetreten sind und begannen „epithelartige“ Strukturen zu bilden (Abb.10).

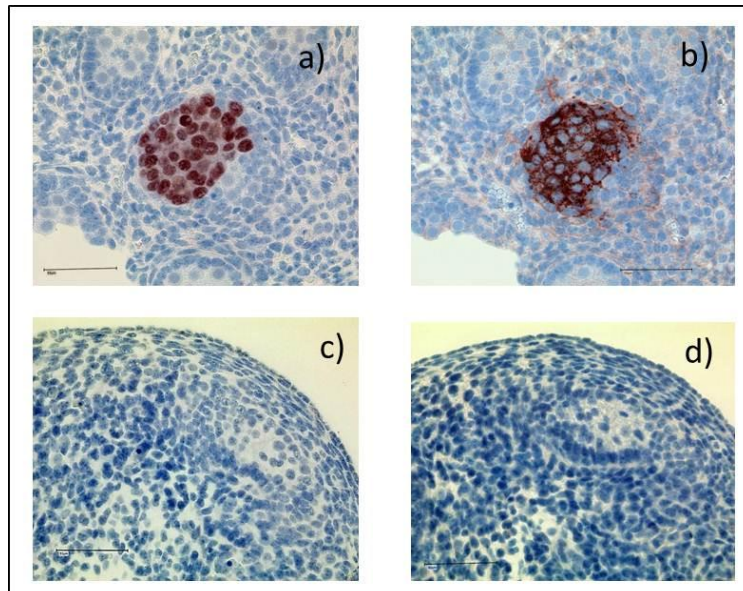


Abb.9: Immunhistochemische Färbungen von E16.5 embryonalen Hoden a) Oct3/4 b) SSEA1 c) AP-2 γ d) cKit. Es handelt sich um Färbungen auf Paraffinschnitten. Der Größenbalken entspricht 50 μ m.

Nur wenige Zellen der Tumorvorläufer exprimieren Tra98 (Abb.10a) oder Mvh (Abb.10d), Marker für postmigratorische Keimzellen. In Gegensatz zu den Keimzellen umliegender Samenkanäle sind die ECCs positiv für Ecadherin (Abb.10b) und die Proliferationsmarker Ki67 (Abb.10c) und phosphoH3 (Abb.10e).

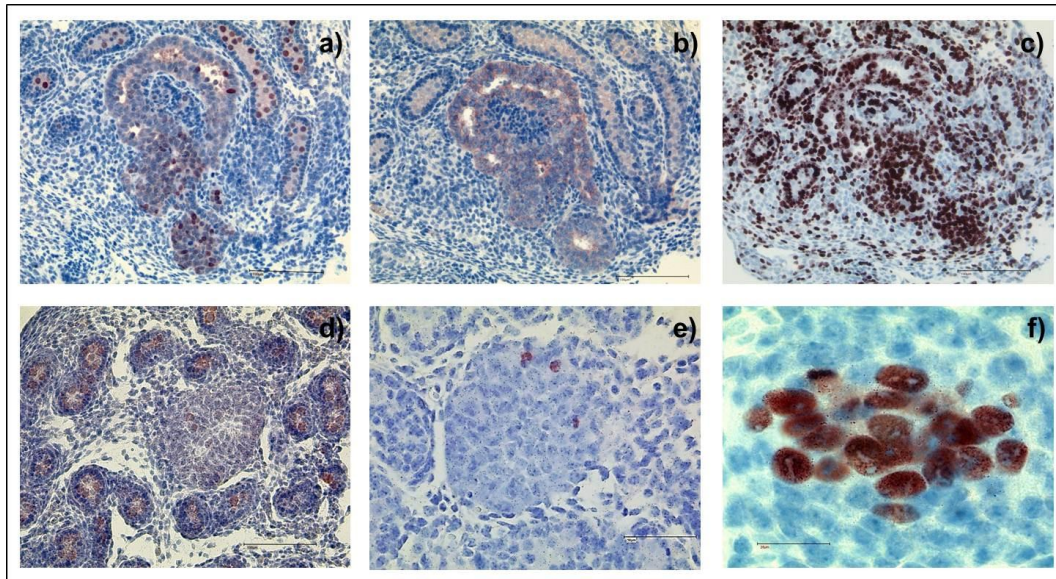


Abb.10 Immunhistochemische Färbungen von E18.5 embryonalen Hoden a) TRA98 b) E-cadherin c) Ki67 d) MVH e) phosphoH3 f) Oct3/4. Es handelt sich um Färbungen auf Paraffinschnitten. Der Größenbalken in a), b), c) und d) entspricht 100µm, in e) 50µm und in f) 20µm

Da nicht für alle Marker von Interesse Antikörper zur Verfügung standen, die für immunhistochemische Färbungen auf Paraffinschnitten geeignet sind, sollten zusätzlich semiquantitative RT-PCRs durchgeführt werden. Um frühe Tumorfoci mit nicht-transformiertem Gewebe vergleichen zu können, mussten die Tumorzellen für die RNA-Isolation von den umliegenden Zellen getrennt werden. Da diese Stellen auf Schnitten von E16.5 Hoden nicht eindeutig (z.B. durch veränderte Zellmorphologie) identifizierbar sind musste zunächst eine Antikörperfärbung durchgeführt werden. Für diese Färbung wurde ein SSEA1 Antikörper eingesetzt, da dieser die gesuchten Strukturen am deutlichsten und zuverlässigsten anfärbt (Abb.10 d). Da die SSEA1 positiven Regionen aus den Schnitten durch Mikrodissektion ausgeschnitten werden sollten, wurden die Schnitte nicht auf herkömmliche Objektträger aufgezogen, sondern auf spezielle Frame Slides, in welche die für die Mikrodissektion notwendige Membran eingespannt ist. Um genug Material für die RNA-Isolation zu erhalten wurden bis zu 15 Serienschnitte auf einem Frameslide platziert. Die RNA, welche aus diesen Proben gewonnen wurde war auf Grund der Fixierung und Einbettung des Materials, sowie durch die Hitzebehandlung und die Färbung von sehr schlechter

Qualität, d.h. stark fragmentiert. Außerdem konnten nur geringe Mengen RNA extrahiert werden, was auf die geringe Größe der Objekte zurückzuführen ist. Um die Effizienz und Qualität zu steigern wurden verschiedene Bedingungen getestet. Die besten Ergebnisse wurden erzielt wenn die Proben eine Stunde in 100% Ethanol fixiert wurden und die Fällung der RNA unter Zuhilfenahme des Carriers Glykogen durchgeführt wurde. Da nicht ausreichend RNA für –RT-Kontrollen vorhanden war wurde die RNA einem DnaseI-Verdau unterzogen. Für eine erfolgreiche cDNA-Synthese mussten mindestens 500ng RNA eingesetzt werden. Da durch die Fragmentierung der RNA die PolyA-Schwänze der RNA sehr häufig von der mRNA abbrechen müssen für die cDNA-Synthese Random Hexamer Primer verwendet werden, um eine gleichmäßige Erststrangsynthese von der gesamten RNA zu gewährleisten. Für die sich anschließenden RT-PCRs wurden die Primer einerseits exonüberspannend, andererseits aber auch so gewählt, dass die entstehenden Amplifikate zwischen 90 und 80 bp groß waren, da dies erfahrungsgemäß der Länge der von der fragmentierten RNA synthetisierten cDNA Stücke entspricht. Um die so erhaltenen PCR-Banden möglichst scharf abzubilden wurden 3%ige Agarosegele verwendet. Die Tumorfoci wurden in den RT-PCRs mit nicht-transformiertem Gewebe aus den gleichen Hoden verglichen, welche auf dieselbe Weise aufbereitet wurden. Die RT-PCRs zeigten, dass die Zellen der Tumovorläuferläsionen, im Gegensatz zum umliegenden Gewebe, die Pluripotenzmarker Nanog und Sox2 exprimieren, wie auch Nanos3, einen Marker für undifferenzierte PGCs. In keiner der untersuchten Proben konnte Expression von cKit, Dmrt1 oder Estrogenrezeptor- α nachgewiesen werden. Wobei eine der fünf proteincodierenden Splicevarianten des Estrogenrezeptor- α -Transkripts mit den hier verwendeten Primern nicht detektiert werden kann, so dass eine Expression dieses Transkripts möglicherweise dennoch stattfindet. Die Expressionsstärke von Blimp1 war in Tumor- u. Normalgewebe etwa gleich stark (wenn man die unterschiedlichen Gapdh-Expressionslevels der Proben berücksichtigt) (Abb.11).

Die immunhistologische Analyse und die durchgeführten RT-PCRs lassen vermuten, dass die Differenzierung in den ECCs AP-2 γ heterozygoter Tiere blockiert ist. Dies zeigt sich durch die aberrant fortgesetzte Expression von Pluripotenzmarkern und die schwache, bzw. ausbleibende, Expression von Markern reifer Keimzellen. Des

Weiteren entgehen die ECCs dem mitotischen Arrest, welchen wt Keimzellen ab Tag E14.5 eingehen (Western et al.; 2008).

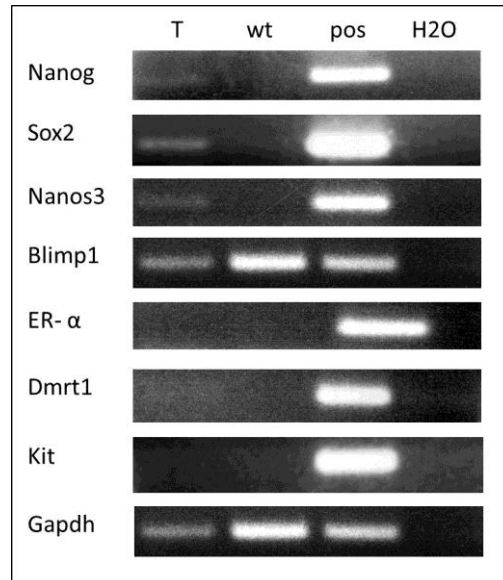


Abb.11: RT-PCRs auf microdisseziertem Tumormaterial von Tag E16.5. Die Expression von Markern, für die keine Antikörper zur Verfügung standen, wurde auf mRNA-Ebene mit semiquantitativen RT-PCRs untersucht. Verglichen wurde mikro-disseziertes Tumorgewebe (T) mit Normalgewebe (wt)

4.3 Untersuchung des DNA-Methylierungs Status früher Teratome

Da embryonale Keimzellen in ihrer normalen Entwicklung vor Tag E15.5 Marker wie Oct3/4, SSEA1 und Ecadherin exprimieren, können die Tumovorläuferzellen mit Hilfe dieser Marker nicht bis zu einem früheren Zeitpunkt verfolgt werden. Um das initiale transformierende Ereignis zeitlich weiter einzugrenzen wurde das Imprintingmuster der transformierten Zellen untersucht. Hierbei macht man sich zunutze, dass sich das Imprintingmuster der Keimzellen während ihrer Entwicklung ändert. Prä-migratorische und migratorische PGCs haben zunächst ein biparentales Imprintingmuster. Das bedeutet, dass bei Genen die von Imprinting betroffen sind jeweils das maternal vererbte, oder das paternal vererbte Allel durch Methylierung

stillgelegt ist. Die Methylierung dieser Gene wird von sogenannten differentiell methylierten Regionen (DMR) gesteuert, deren Aktivität wiederum von ihrem eigenen Methylierungsstatus abhängt. Nach Eintritt in die Genitalfalten wird das Imprintingmuster der PGCs am Tag E12.5 gelöscht. Je nach Geschlecht des Embryos wird dann ca. ab Tag E14.5 ein paternales, oder ein maternales Imprintingmuster etabliert (Verona et al.; 2008). Wenn man davon ausgeht, dass sich das Imprinting der transformierten Keimzelle, die die „Stammzelle“ des Teratoms darstellt, nach der Transformation nicht mehr ändert, lassen sich durch Ermittlung des Imprintingstatus der Tumorzellen Rückschlüsse über den Zeitpunkt der Transformation ziehen (Abb.12).

Als exemplarischer DNA-Bereich wurde die differentiell methylierte Region (DMR) des 5'-Bereichs des H19 Promotors ausgewählt. Um frühe Tumorerläsionen mit nicht-transformiertem Gewebe vergleichen zu können, wurden Paraffinschnitte von embryonalen Hoden von E16.5 und d1 angefertigt, mit SSEA1 Antikörper gefärbt und die positiven Regionen (welche die Tumorerläufer darstellen) mikro-disseziert (Abb.12d). Aus Tumor-, und Normalgewebe wurde DNA isoliert und diese einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. Bei diesem Versuch wurde die Methylierung von 15 CpGs in der DMR des H19-Promotors betrachtet. Die Untersuchung ergab, dass das Imprinting der Tumorzellen von Tag E16.5 komplett gelöscht ist, wohingegen das Imprinting der sich normal entwickelnden Keimzellen schon teilweise neu etabliert ist (Abb.13a). Dieser Zustand ist am Tag d1 unverändert (Abb.13b), was zeigt, dass sich Imprintingmuster in den Tumoren nicht mehr ändert.

Zusätzlich wurde auch eine immunhistochemische Färbung mit einem anti-5mC Antikörper durchgeführt, welche zeigte, dass die DNA der Tumorzellen generell hypomethyliert ist, die DNA der Keimzellen der umliegenden Tubuli dagegen ist hypermethyliert (Abb.13 c). Dies deutet darauf hin, dass die Tumorzellen von einer Zelle abstammen, in der das Imprintingmuster bereits gelöscht ist (E12.5), aber noch nicht mit der Neu-etablierung begonnen wurde (ab E14.5). Die Ereignisse, die zur Transformation der AP-2 γ +/- Keimzellen führen finden also wahrscheinlich zwischen den Tagen E12.5 und E13.5 statt.

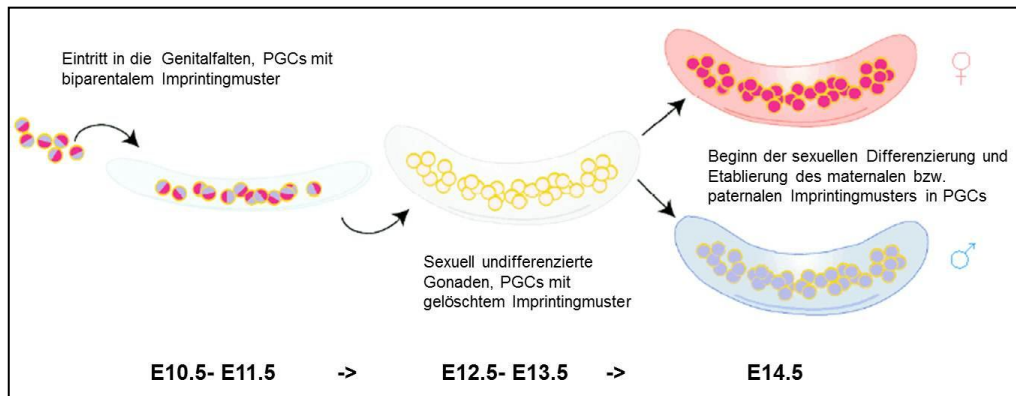


Abb.12: Veränderungen des Imprintingmusters während der Keimzellentwicklung migratorische PGCs weisen ein biparentales Imprintingmuster auf (blau/rot), nach Eintritt in die Genitalfalten wird dieses gelöscht (weiß) und abhängig vom Geschlecht des Embryos ab E14.5 jeweils das maternale (rot) oder das paternale (blau) Imprintingmuster etabliert (modifiziert von Petra Haikova).

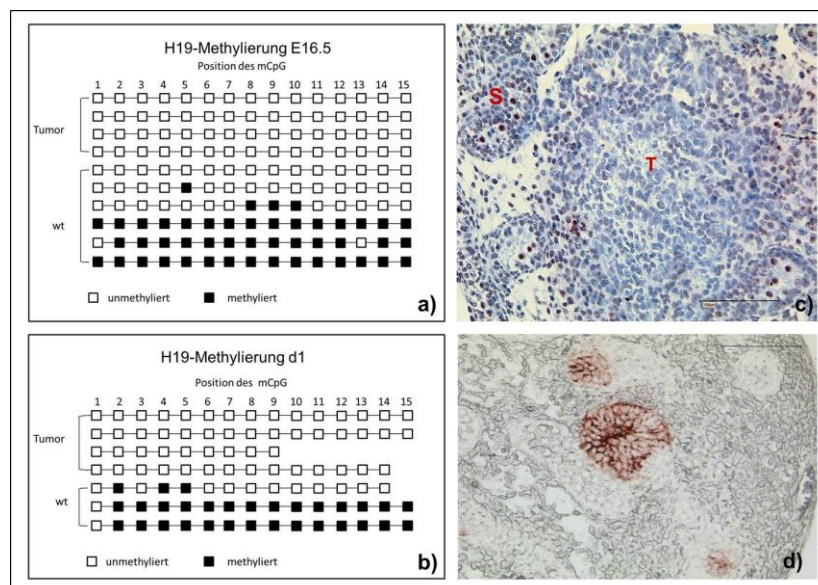


Abb.13: Analyse des Imprintingmusters in Tumoren a) Bisulfidsequenzierung von mikrodissiziertem Tumor- u. Normalgewebe zeigt, dass Imprinting des H19 Locus in den Tumoren vollständig gelöscht ist (weiße Kästchen), wohingegen im Normalgewebe die Re-etablierung des Imprintings begonnen hat (schwarze Kästchen) b) auch an Tag d1 wurde kein neues Imprintingmuster in den Tumorzellen etabliert c) immunhistochemische Färbung mit anti-5mC Antikörper, DNA von Keimzellen in wt Samenkanälchen (S) ist hypermethyliert, DNA von Tumorzellen (T) dagegen ist hypomethyliert d) Beispiel eines SSEA1 gefärbten Schnitts vor der Mikrodissektion mit roten Tumorfoci

4.4 Untersuchung des Proliferationsverhaltens von AP-2 γ +/- PGCs

Um zu untersuchen ob sich die Proliferationsrate von AP-2 γ +/- PGCs im Vergleich zu wt PGCs unterscheidet, sollten diese in Kultur genommen und gezählt werden. Die Embryonen, aus denen die Genitalfalten entnommen werden, dürfen nicht weiter entwickelt sein als Tag E12.5, da nach diesem Tag PGCs nicht mehr erfolgreich in Kultur genommen werden können. Daher wurden die Genitalfalten aus E12.5 Embryonen präpariert, trypsinisiert und die Zellen vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen je einer Genitalfalte in eine Vertiefung einer 12-Loch Zellkulturschalen mit SCF-exprimierenden Feedern ausgesät. Es wurden verschiedene Mediumzusammensetzungen getestet, um die Kulturbedingungen zu ermitteln, bei denen die meisten PGCs anwachsen und ihre Differenzierung möglichst lange hinausgezögert wird. Dabei enthielt das Grundmedium immer LIF und bFGF. Zusätzlich wurde dem Medium noch SCF zugegeben, oder SCF und Forskolin. Es wurde festgestellt, dass in Medium mit LIF, bFGF und SCF im Vergleich zu den anderen Bedingungen die meisten PGCs anwachsen, deshalb wurde dieses Medium für alle weiteren Versuche verwendet.

Allerdings wurde bei allen Bedingungen beobachtet, dass nach 72 Stunden die meisten PGCs ihre Morphologie änderten, was auf Differenzierung hindeutet. Nach 7 Tagen in Kultur konnte bei Verwendung von Medium mit LIF, bFGF und SCF beobachtet werden, dass aus den verbleibenden PGCs embryonic germ cell (EGC) Kolonien hervorgehen. Diese Kolonien entsprechen morphologisch embryonalen Stammzellen (ES). Die Bildung von EGC-Kolonien wurde sowohl bei weiblichen, wie auch bei männlichen PGCs beobachtet und war vom AP-2 γ -Genotyp unabhängig. Es lässt sich daher sehen, dass die Tumorentwicklung in AP-2 γ +/- Mäusen nicht auf aberrante Formation von EGCs zurückzuführen ist. Aus dem nicht benötigten embryonalen Gewebe, das bei der Präparation der Genitalfalten anfiel wurde DNA isoliert, um den PGCs in den jeweiligen Wells Genotypen und Geschlecht zuordnen zu können. Die PGCs benötigen ca. 8 Stunden um auf der Zellkulturschale adhärent zu werden.

Danach wurde je eins der beiden von einem Embryo stammenden Wells einer alkalischen Phosphatase Färbung unterzogen, um die PGCs identifizieren zu können. Hierbei waren die PGCs an der starken Blaufärbung und der abgerundeten Morphologie zu erkennen (Abb.14a). Nach der Färbung wurden die Zellen fixiert und je 5 zufällig gewählte Gesichtsfelder unter dem Mikroskop ausgezählt. Aus diesen fünf Feldern wurde der Mittelwert gebildet und dieser als Ausgangszellzahl festgelegt. Nach 48 Stunden wurde das Well mit der zweiten Genitalfalte des jeweiligen Embryos fixiert, gefärbt und ebenfalls ausgezählt. Die Proliferation wurde als Zunahme der Zellzahl in Prozent bestimmt. Es zeigte sich, dass die Proliferationsrate in AP-2 γ +/- PGCs im Vergleich zu den wt Kontrollen weder bei männlichen noch bei weiblichen PGCs erhöht ist (Abb.14b). Die Proliferationsrate ist jedoch generell bei männlichen PGCs deutlich höher als bei weiblichen PGCs (Abb.14b).

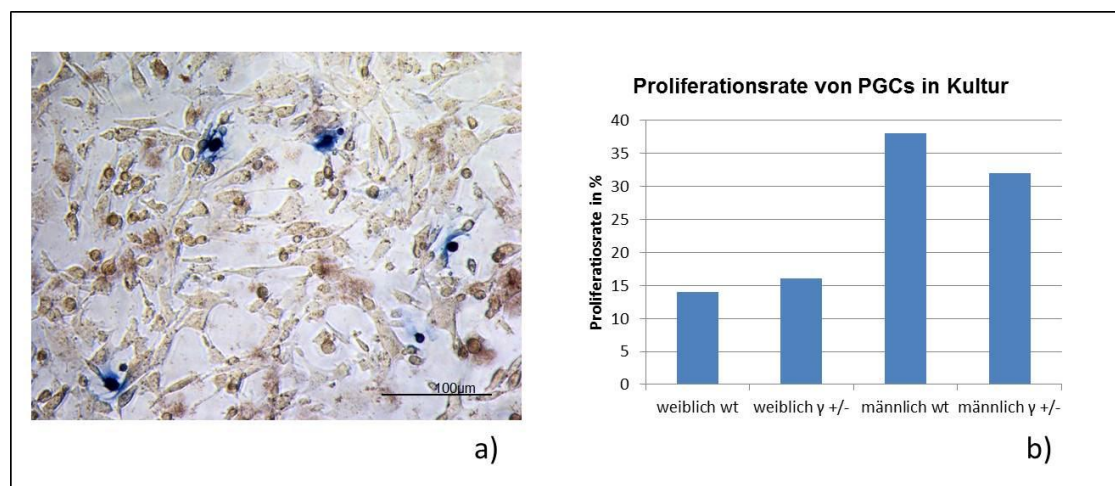


Abb.14: Proliferationsverhalten von AP-2 γ +/- PGCs *in vitro* a) alkalische Phosphatase-Färbung von PGCs mit Feedern 8 Stunden nach dem diese in Kultur genommen wurden. Die PGCs sind an der blauen Färbung und der abgerundeten Zellmorphologie zu erkennen. b) Vergleich der Proliferationsraten von weiblichen und männlichen AP-2 γ +/- PGCs mit den jeweiligen Wildtyp-Kontrollen (wt). Die Proliferationsraten von AP-2 γ +/- und wt PGCs sind vergleichbar, jedoch proliferieren PGCs aus männlichen Embryonen etwa doppelt so stark wie solche aus weiblichen Embryonen, die am selben Tag isoliert wurden.

4.5 Untersuchung der Regulation von Map2k1 durch AP-2 γ

Die fehlerhafte Regulation welcher Gene in AP-2 γ +/- PGCs diese anfällig für maligne Transformation macht ist von besonderem Interesse, da es sich bei diesen um direkte oder indirekte Zielgene von AP-2 γ in Keimzellen handelt. Da bislang keine Zielgene von AP-2 γ in PGCs bekannt sind, wurde ein ChIP-on-Chip mit in vitro differenzierten PGCs durchgeführt (Jana Anschlag, persönliche Mitteilung) um Hinweise zu erhalten. In diesem Versuch sollte gezeigt werden an welche Promotoren AP-2 γ in PGCs bindet. Als eines dieser potentiellen Zielgene wurde Map2K1 (Mek1) identifiziert. Diese Proteinkinase steht in der „mitogen-activated protein kinase“ Signaltransduktionskette unter Ras und über Erk1. Map2K1 Expression ist mit Zellzyklusregulation (Matsui et al; 2010) sowie mit der Regulation von Pluripotenz assoziiert. So kann Mek1 Inhibitor eingesetzt werden, um die Differenzierung von embryonalen Stammzellen in Kultur zu unterdrücken (Theunissen et al; 2011). In der Sequenz bis zu 700 bp 5' des Transkriptionsstarts des murinen Map2K1-Gens befinden sich 7 potentielle AP-2 γ Bindestellen, von denen 5 durch bioinformatische Analyse mit rVista ermittelt wurden (Abb.15a). Eine dieser Bindestellen ist zwischen Mensch und Maus konserviert. Zwei weitere Bindestellen wurden durch die ChIP-on-Chip Analyse ermittelt (Abb.15b). Um eine potentielle Regulation des Map2K1 Promotors durch Bindung von AP-2 γ zu untersuchen wurde ein Luziferasereporter-Konstrukt kloniert. Dabei wurde der Bereich 839 bp 5' des Transkriptionsstarts des Map2K1-Gens vor die Firefly-Luziferasesequenz des pGL3basic Reporterplasmids kloniert (Abb.15b).

Für die Reporterassays wurden humane Hepatocarcinomzellen (HCT116) benutzt, deren endogenes AP-2 γ und Map2K1-Expressionslevel sehr niedrig ist. Die Transfektion der HCT116 Zellen wurde mit Lipofectamine 2000 durchgeführt und die Transfektionseffizienz lag bei ca. 60-70% (Abb.15b). Das Reporterplasmid wurde entweder zusammen mit einem murinen AP-2 γ -Expressionsplasmid, oder einer Leerplasmidkontrolle in die HCT116 Zellen transfiziert, die Lyse der Zellen erfolgte 48h nach der Transfektion. Die Auswertung des Luziferaseassays ergab, dass das Reporterkonstrukt in den HCT116 Zellen sehr stark aktiviert wird, wenn es nur mit einem Leerplasmid zusammen transfiziert wurde. Dies deutet darauf hin, dass in

HCT116 Zellen Faktoren exprimiert sind, die an den Map2K1-Promotor binden und ihn aktivieren können. Durch Kotransfektion mit dem AP-2 γ -Expressionsplasmid wurde diese Aktivierung auf 60% gesenkt (Abb.16c), was auf eine repressive Funktion von AP-2 γ bei der Transkription von Map2K1 hindeutet.

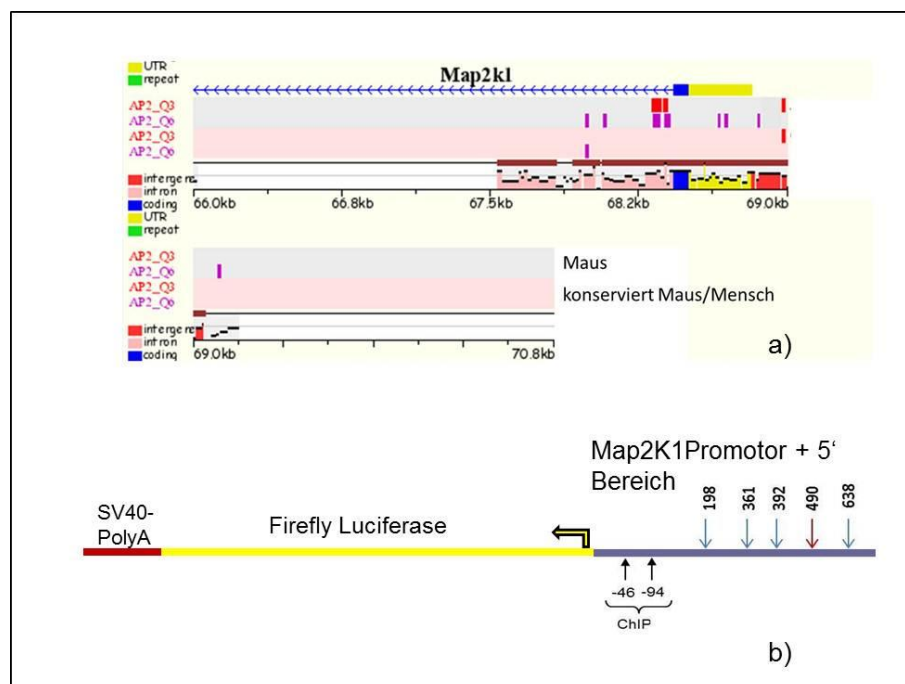


Abb.15: Map2K1 Reporterkonstrukt a) schematische Darstellung des 5'UTR-Bereichs, des ersten Exons, sowie Teile des ersten Introns des Map2K1-Genlokus. Die potentiellen AP-2 γ -Bindestellen sind in violett (murine Bindestelle) und rot (konserviert zwischen Maus und Mensch) gekennzeichnet. b) Für die Erstellung des Map2K1-Reporterkonstrukts wurde der 839 bp 5' des Transkriptionsstarts des Map2K1-Gens liegende Bereich (lila) in den pGL3basic-Vektor vor das Firefly-Luziferase-Gen (gelb) kloniert, auf welches ein SV40-PolyA-Signal folgt (rot). Dieser Bereich umfasst die Promotorregion des Gens, sowie Teile der 5'UTR und enthält sowohl die mit rVista vorhergesagten AP-2 γ -Bindestellen, wie auch die durch ChIP-on-Chip Analyse ermittelten.

In zwei weiteren Experimenten wurden die Auswirkungen einer Änderung des AP-2 γ -Expressionslevels auf die Map2K1-Transkription vom endogenen Map2K1-Promotor der HCT116 Zellen untersucht. Hierzu wurden zunächst HCT116 Zellen mit einem

Leerplasmid oder einem AP-2 γ - Expressionsplasmid transfiziert; nach 48 Stunden wurde aus den jeweiligen Ansätzen RNA isoliert, diese mit DNAase verdaut und cDNA für qRTs synthetisiert. Die qRT Analyse ergab, dass die Map2K1-Expression in Zellen, in denen AP-2 γ überexprimiert wurde dreimal geringer war als in den Kontrollzellen (Abb.16d). Dies zeigt, das AP-2 γ die Transkription von Map2K1 auch am endogenen Map2K1-Promotor hemmt.

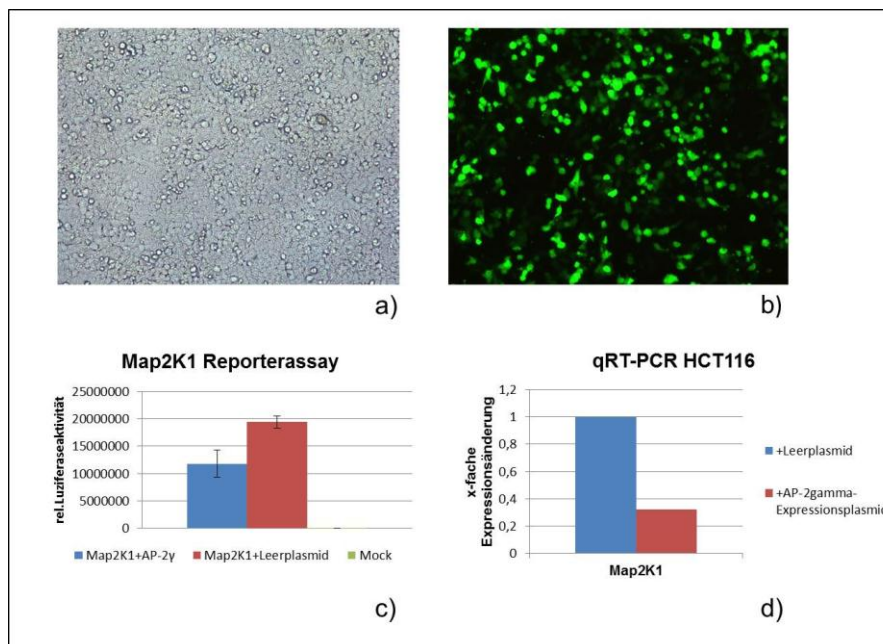


Abb.16: Regulation des Map2K1-Promotors durch AP-2 γ in HCT116 Zellen a) Phasenkontrastaufnahme der konfluent mit Tcam-2 bewachsenen Zellkulturschale 24h nach der Transfektion b) Kontrolltransfektion mit einem GFP-Reporterplasmid zur Ermittlung der Transfektionseffizienz. Der Anteil fluoreszierender, und damit transfizierter Zellen, wurde auf ca. 60%-70% geschätzt, wobei die Intensität des Fluoreszenzsignals deutlich variierte. c) Graphische Auswertung des Map2K1-Reporterassays in HCT116 Zellen. Die Aktivierung des Map2K1-Reporterkonstrukts wird durch Kotransfektion eines AP-2 γ -Expressionsplasmids (blauer Balken) auf 60% gesenkt, im Vergleich zur Kontrolltransfektion mit einem Leerplasmid (roter Balken). d) qRT-Analyse der endogenen Map2K1-Expression in HCT116-Zellen nach Transfektion eines AP-2 γ -Expressionsplasmids. Die Expression von endogenem Map2K1 wird im Vergleich zur Kontrolltransfektion mit einem Leerplasmid (blauer Balken) um ca. das Dreifache reduziert, wenn in den Zellen AP-2 γ überexprimiert wird (roter Balken). $p=0,014$

Tcam-2 ist eine humane Seminom-Zelllinie mit hohem endogenen AP-2 γ -Expressions Level. Auf Grund der Ähnlichkeit von Seminomzellen mit PGCs werden Tcam-2 als einziges geeignetes zurzeit verfügbares PGC-Zellkulturmodell betrachtet (Eckert et al; 2008). Mit Hilfe eines siRNA induzierten Knock-downs wurde die Transkription von AP-2 γ auf ca. 50% des Ausgangswerts gesenkt (Abb.17a), was eine Reduktion der Proteinexpression um ebenfalls ca. 50% zur Folge hat (Abb.17b). 48h nach der siRNA Transfektion wurde aus den Zellen RNA und Protein isoliert, als Kontrolle dienten Zellen, die mit scrambled RNA transfiziert wurden, sowie untransfizierte Zellen (Mock). Die RNA wurde für cDNA Synthese und nachfolgende qRT Analyse eingesetzt. Um zu überprüfen, ob eine Reduktion des AP-2 γ -Expressionslevels ausreicht, um einen Effekt auf die Expressionsstärke seiner Zielgene zu haben, wurde die Expression des bekannten AP-2 γ -Zielgens p21 (Williams et al; 2009) untersucht. Da die p21-Expression nach AP-2 γ Knock-down um das 2,2-fache ansteigt (Abb.17 c)), wird angenommen, dass die Knock-down-Effizienz zumindest theoretisch ausreicht, um einen potentiellen Effekt auf die Map2K1-Expression zu beobachten. Es zeigte sich, dass nach Senkung der AP-2 γ -Expression um 50% die Transkription von Map2K1 (auch Mek1) im Vergleich zu Zellen, die mit scrambled RNA transfiziert wurden um ca. 25% ansteigt (Abb.17c). Mit den isolierten Proteinen wurde ein Western Blot durchgeführt; auch auf Proteinebene kommt es zu einer leichten Steigerung der Map2K1-Expression nach AP-2 γ Knock-down. Bei Verringerung der AP-2 γ -Expression steigt die Map2K1-Expression um ca.13%, im Vergleich zur Kontrolle (Abb.17d). Erk1/2 befindet sich in der Map-Signaltransduktionskette downstream von Mek1 und wird durch Phosphorylierung von diesem aktiviert. Nach AP-2 γ Knock-down steigt die Phosphorylierung von Erk1/2 in Tcam-2 deutlich an (Abb.17d), wahrscheinlich als Folge der erhöhten Mek1 Expression.

Die unter Punkt 4.5 beschriebenen Versuche zeigen, das AP-2 γ unter bestimmten Bedingungen in der Lage ist die Expression vom Map2K1-Promotor zu regulieren, jedoch ist nicht gezeigt, dass es sich dabei um eine direkte Regulation durch Bindung von AP-2 γ an dem Map2K1-Promotor handelt, dafür sind weitere Analysen, wie eine Chromatin Immunpräzipitation notwendig. Weiterhin kann der Einfluss von AP-2 γ auf den Map2K1-Promotor von Kofaktoren und damit vom Zelltyp/Gewebe

abhängen. Um zu bestimmen, ob Map2K1 in PGCs ein Zielgen von AP-2 γ ist müssen daher Experimente direkt in Keimzellen durchgeführt werden.

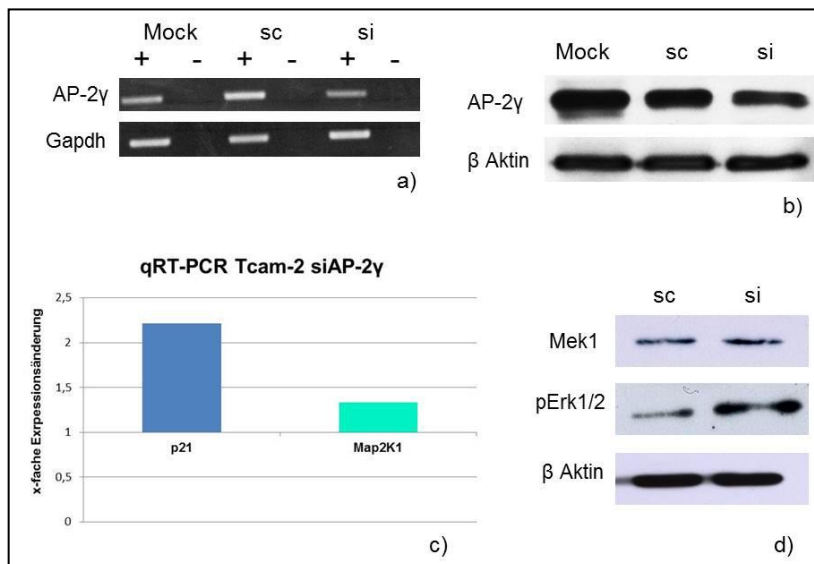


Abb.17: AP-2 γ Knock-down in Tcam-2 Seminomzellen a) 48 Stunden nach Transfektion der Tcam-2 Zellen mit AP-2 γ siRNA wurde RNA isoliert und semiquantitative RT-PCRs durchgeführt. Im Vergleich zur scrambled RNA-Kontrolle ist die Expression von AP-2 γ mRNA nach Transfektion mit AP-2 γ siRNA um 55% verringert b) 48 Stunden nach Transfektion der Tcam-2 Zellen mit AP-2 γ siRNA wurde Protein isoliert und ein Western Blot mit anti-AP-2 γ -Antikörper durchgeführt. Die Expression von AP-2 γ Protein ist nach Transfektion mit AP-2 γ siRNA auf 69% der Proteinmenge in der scrambled RNA-Kontrolle reduziert c) Realtime-PCR mit RNA aus AP-2 γ siRNA behandelten Tcam-2 Zellen zeigte, dass die Expression von p21 um das 2,2fache ansteigt im Vergleich zur scrambled RNA-Kontrolle ($p=0,04$). Die Expression von Map2K1 steigt nach siRNA-Behandlung um das 1,3fache im Vergleich zur scrambled RNA-Kontrolle ($p=0,0008$)

4.6. Untersuchungen zur Änderung des globalen Expressionsmusters von AP-2 γ +/- Keimzellen mittels Microarray

Um Veränderungen in der globalen Genexpression von AP-2 γ +/- PGCs gegenüber AP-2 γ wt PGCs zu untersuchen wurde ein Expressions-Microarray durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie ermöglicht durch den Einsatz geringer Mengen von Probenmaterial die Expression einer großen Zahl von Genen zu betrachten. Um wt Tiere mit AP-2 γ +/- Tieren zu vergleichen wurden jeweils drei Proben von jedem Genotyp verwendet. Da es sich bei Keimzellen um eine kleine Zellpopulation handelt muss für die Präparation der RNA-Proben ein Zeitpunkt gewählt werden an dem möglichst viele PGCs vorhanden sind, und AP-2 γ in diesen exprimiert ist. Da AP-2 γ in PGCs nur bis Tag E12.5 exprimiert ist (Weber et al; 2010) wurde dieser Tag für die Präparation der Genitalfalten gewählt, in die die PGCs zu diesem Zeitpunkt bereits eingewandert sind. An Tag E12.5 ist AP-2 γ in einigen PGCs noch stark exprimiert, in anderen nur schwach oder gar nicht mehr (Abb.18 a)). Voraussetzung für den Vergleich der Genexpressionsmuster ist, dass das AP-2 γ -Level in heterozygoten Genitalfalten tatsächlich erniedrigt ist. Daher wurde im Vorfeld RNA und Protein aus wt und AP-2 γ +/- Genitalfalten von Tag E12.5 isoliert. Semiquantitative RT-PCR-Analyse ergab, dass das Expressionsniveau der AP-2 γ mRNA in heterozygoten Genitalfalten um ca. 50% verringert ist im Vergleich zum Wildtyp (Abb.18 b)), was der Erwartung nach Deletion eines Allels entspricht. Die Western Blot-Analysen mit den gewonnen Proteinen zeigte, dass die Expression des AP-2 γ -Proteins nur um durchschnittlich 25% verringert ist (Abb.18 c)). Diese Erkenntnis ist wichtig für die Auswertung des Microarrays, denn die relativ geringe Änderung der AP-2 γ -Proteinexpression muss bei der Abschätzung der zu erwartenden Effekte auf das globale Expressionsmuster berücksichtigt werden.

Um eine ausreichende Menge RNA für den Microarray zu erhalten ist es notwendig mehrere Genitalfalten E12.5 für eine Probe zusammenzufassen. Deshalb wurden die Verpaarungen für die Präparation so angesetzt, dass alle Embryonen des jeweiligen Wurfs denselben Genotyp haben und gepoolt werden konnten. Um eine möglichst große Homogenität zwischen den drei Proben einer Gruppe zu erreichen wurde die

Präparation der Genitalfalten immer zur gleichen Uhrzeit durchgeführt und die Isolierung der RNA direkt angeschlossen. Da die Unterscheidung männlicher und weiblicher Genitalfalten anhand morphologischer Kriterien an Tag E12.5 schwierig ist, und weil das Aussortieren der weiblichen Genitalfalten die RNA-Ausbeute stark verringern würde, wurden alle präparierten Genitalfalten für die RNA-Gewinnung benutzt. Zudem finden die geschlechtsspezifischen Ereignisse der PGC-Entwicklung in Weibchen und Männchen nach Tag E12.5 statt. Aus dem nichtverwendeten embryonalen Material wurde DNA isoliert, um mittels PCR den Genotyp des Wurfs zu bestätigen.

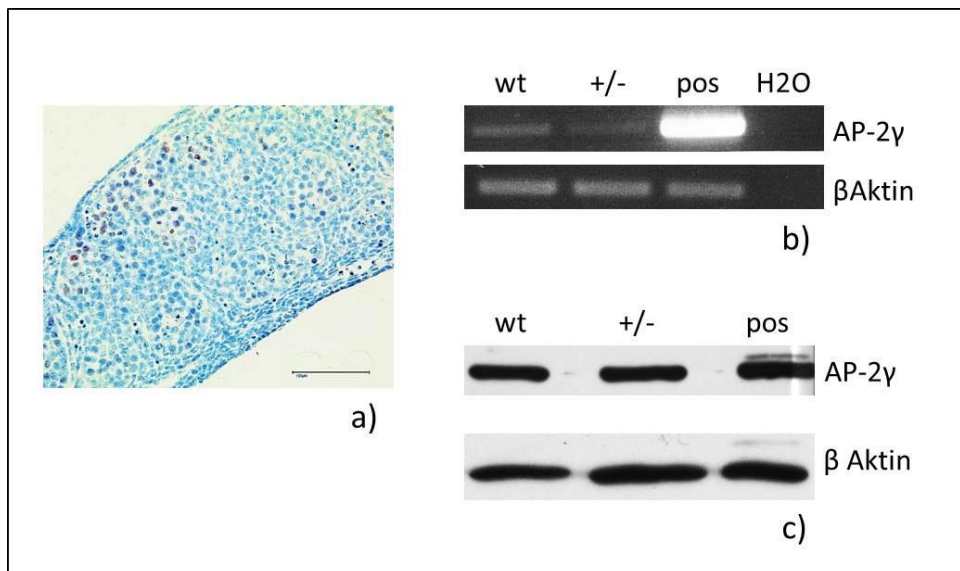


Abb.18: AP-2γ-Expression in E12.5 Genitalfalten a) Immunhistochemische AP-2γ-Färbung eines Querschnitts durch eine Genitalfalte von Tag E12.5. Der Größenbalken entspricht 100µm. b) Semiquantitative RT-PCR mit RNA aus E12.5 Genitalfalten. Die Expression der AP-2γ-mRNA ist in +/- Genitalfalten im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle um 47% verringert c) exemplarischer AP-2γ Western Blot mit Protein aus E12.5 Genitalfalten. Die Auswertung der Bandenstärke mit ImageJ-Software ergab, dass die AP-2γ-Protein-Expression in +/- Genitalfalten auf 75% verringert ist im Vergleich zu der Wildtyp-Kontrolle.

Für die Zuverlässigkeit der Microarray-Daten ist die Qualität der verwendeten RNA entscheidend, weshalb diese zunächst im Bioanalyzer überprüft wurde. Dieser

ermittelt den RIN- Wert (RNA Integrity Number), welcher an Maß für die Integrität der RNA darstellt (1=völlig degradiert- 10=völlig intakt). Der RIN-Wert aller für den Microarray eingesetzten RNA-Proben war >9. Im Anschluss wurde die RNA noch einem DnaseI-Verdau unterzogen, um evtl. in den Proben enthaltene DNA zu beseitigen

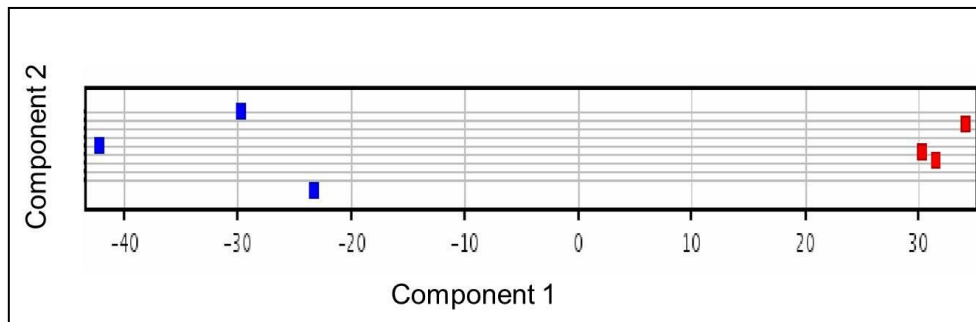


Abb.19: Clusteranalyse der für den Microarray verwendeten RNA-Proben. Nach Hauptkomponentenanalyse (**Principle Component Analysis = PCA**) konnten die RNA-Proben anhand der durch den Microarray gewonnenen Daten Clustern zugeordnet werden. Wie in der Abbildung zu erkennen bilden die Wildtyp-RNA-Proben (blau) einen Cluster und die RNA-Proben aus den AP-2 γ heterozygoten Tieren (rot) einen zweiten, wobei die heterozygoten Proben enger zusammenclustern als die Wildtyp-Proben.

Die nach Auslesen der Gene Chips erhaltenen Microarray-Rohdaten wurden zunächst einer Hauptkomponentenanalyse (engl. **Principle Component Analysis = PCA**) unterzogen, deren Sinn darin besteht die große Datenmenge, die jeder RNA-Probe zugeordnet ist zu vereinfachen, indem diese Variablen zu sogenannten „Hauptkomponenten“ zusammengefasst werden, durch die sie genähert werden. Mit diesem vereinfachten Datensatz wurde anschließend eine Clusteranalyse durchgeführt, d.h. die einzelnen Proben werden anhand der sie beschreibenden Eigenschaften Gruppen zugeordnet, in diesem Fall den Gruppen „wildtyp“ und „heterozygot“. Für den Erfolg des Versuchs ist es entscheidend, dass sich diese beiden Gruppen in ihren Eigenschaften möglichst stark unterscheiden, da es sich bei den betrachteten Eigenschaften um die Expressionslevels der 28.853 untersuchten Gene handelt. Weiterhin ist es wünschenswert, dass die Proben innerhalb einer

Gruppe möglichst nah zusammen clustern, d.h. die Varianz innerhalb einer Gruppe klein ist, denn je höher die Varianz innerhalb einer Gruppe ist, desto größer muss der Unterschied zwischen den beiden Gruppen sein, um statistische Signifikanz zu erreichen. Die Clusteranalyse ergab, dass die drei Wildtyp-Proben und die drei heterozygoten Proben jeweils deutlich zusammenclustern und beide Gruppen sich deutlich voneinander abgrenzen (Abb. 19). Es zeigte sich, dass die drei heterozygoten Proben dabei untereinander näher zusammen clustern als die Wildtyp-Proben untereinander. Für die Varianz innerhalb der Gruppen kommen verschiedene Faktoren als ausschlaggebend in Frage. Einerseits kann sich das Entwicklungsstadium der präparierten Würfe um bis zu 16 Stunden unterscheiden, da dies der maximalen Zeitspanne zwischen Verpaarung und Feststellung des vaginal Plugs entspricht. Andererseits wurden die Embryonen eines Wurfs nicht nach Geschlecht unterschieden, so dass der Anteil weiblichen und männlicher Tiere an den einzelnen Proben unterschiedlich sein kann, was Unterschiede im Expressionsniveau geschlechtsspezifisch exprimierter Gene erklärt. Da die Entwicklung der PGCs bis zum Tag E12.5 in weiblichen und männlichen Tieren jedoch gleich verläuft, sollte sich dieser Unterschied nicht auf die Ermittlung von AP-2 γ -Zielgenen auswirken.

Da in AP-2 γ heterozygoten Tieren das AP-2 γ -Proteinlevel nur um ca. 25% erniedrigt ist (Abb.18 c)) kann nicht mit einem starken Effekt auf das Expressionsniveau von AP-2 γ -Zielgenen gerechnet werden. Weiterhin ist zu beachten, dass dieses differentielle Expressionsmuster nicht von allen Zellen in den präparierten Genitalfalten gezeigt wird, da AP-2 γ nur in den Keimzellen, nicht aber in anderen Zelltypen der Genitalfalten (Sertolizellen, Leydigzellen etc.) exprimiert ist, was den zu erwartenden Effekt zusätzlich abschwächen dürfte. Aufgrund dieser Annahmen wurde der Schwellenwert der Expressionsänderung bei der Auswertung des Microarrays auf 1,3fach gesetzt. Um zu bestätigen, dass die ermittelte Expressionsänderung statistisch signifikant ist wurde T-Test nach Student durchgeführt und alle Daten mit einem p-Wert $p > 0,05$ ausgeschlossen. Nach Ausschluss der Gene mit unbekannter Funktion ergab sich eine Liste von 97 potentiellen AP-2 γ -Zielgenen, die zwischen 1,3- 2,4-fach hoch-bzw. herunterreguliert sind (Abb.20). Auf der Basis der Expressionslevel dieser Gene wurde mit den 6

verwendeten Proben eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt, dabei bestätigte sich die Gruppenzuordnung der Proben, die sich nach der Clusterung auf Basis sämtlicher Rohdaten ergeben hatte (Abb.20).

Um die Zuverlässigkeit des Microarrays als Methode zu überprüfen, sollten die Ergebnisse stichprobenhaft durch eine zweite Methode verifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde die restliche RNA der Proben, die für den Mikroarray verwendet wurden für cDNA-Synthese eingesetzt und Real-time-PCR Analysen durchgeführt. Hierbei sollten die im Microarray gefundenen Expressionsänderungen ausgewählter positiv, bzw. negativ regulierter Gene bestätigt werden. Die mit dem Microarray ermittelte Tendenz der Regulation (d.h. Expressionsminderung, oder –erhöhung) wurde für alle ausgewählten Marker in der Real-Time-PCR bestätigt, jedoch ergaben sich generell weniger starke Effekte, die in 3 von 6 Fällen keine statistische Signifikanz erreichten (Abb. 21). Diese Abweichungen kommen dadurch zustande, dass die Varianz innerhalb der miteinander verglichenen Probengruppen bei der Real-Time-PCR größer ist als beim Microarray, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass bedingt durch das experimentelle Vorgehen der Pipettierfehler bei der Real-Time-PCR deutlich größer ist als beim Microarray und die Effizienz der PCR-Reaktion Schwankungen unterworfen ist, die beim Microarray ebenfalls entfallen. Dass trotz dieser Unterschiede mit beiden Methoden für alle Marker die gleichen Regulationstendenzen festgestellt wurden, untermauert die Aussagekraft der Microarray-Daten.

Um zu zeigen, dass die ermittelten Expressionsänderungen kein zufälliger Effekt sind, der nur in der für den Microarray verwendeten Proben auftritt, sondern einen generellen Unterschied zwischen AP-2 γ wildtyp und heterozygoten PGCs widerspiegelt wurden nochmals Genitalfalten präpariert und weitere Real-Time-PCRs durchgeführt. Wie bei der Verifizierung der Microarray-Daten wurden auch hier wieder drei Wildtyp-Proben und drei heterozygote Proben zu Gruppen zusammengefasst und miteinander verglichen. Neben durch den im Microarray ermittelten potentiellen Zielgenen wurden weitere Marker untersucht, deren

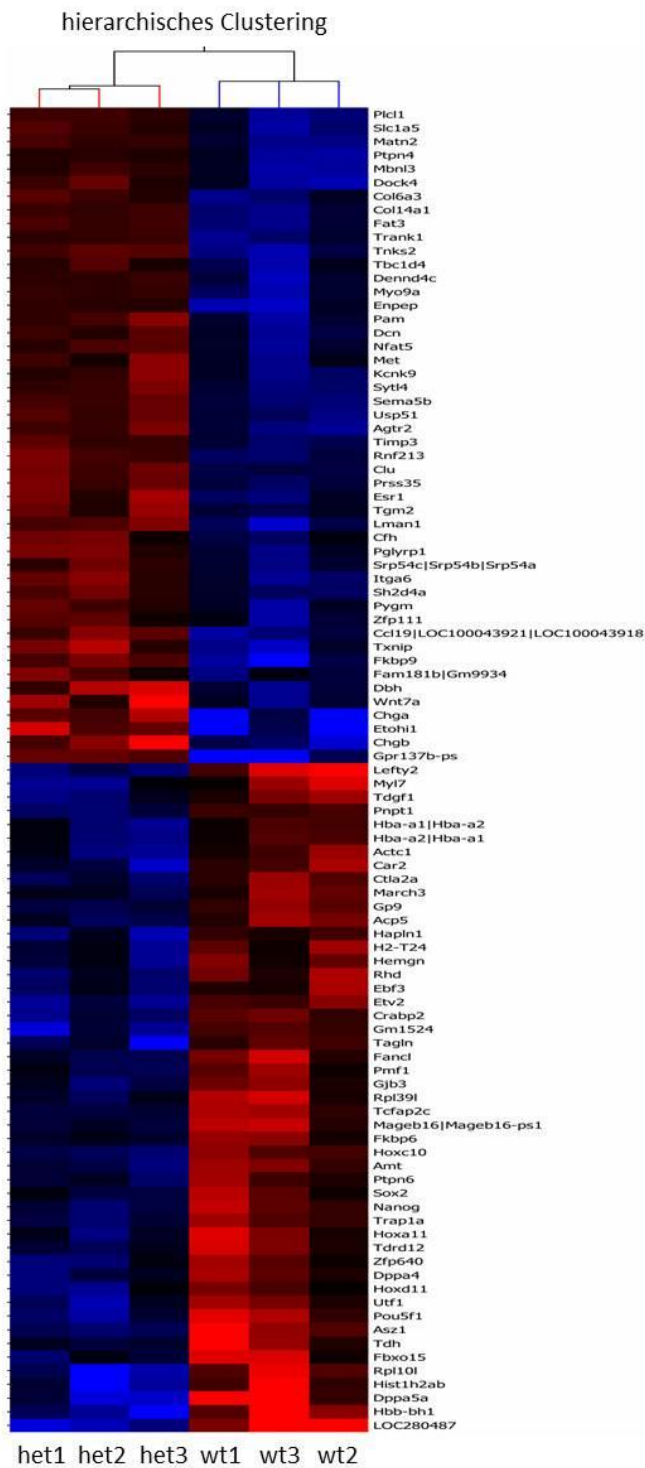


Abb.20: „Heat map“ der im Microarray gefundenen deregulierten Gene. het1-3 bezeichnet die drei heterozygoten Proben, wt1-3 die drei Wildtyp-Proben. Diese drei Proben wurden auf Grund ihrer Expressionswerte für die aufgeführten, differenziell regulierten Gene hierarchisch zueinander geclustert. Rote Felder bedeuten „herauf-reguliert“ im Vergleich zur anderen Gruppe, blaue Felder bedeuten „herunter-reguliert“.

Expressionsänderung im Microarray entweder unter dem Schwellenwert von 1,3-fach blieb, oder keine statistische Signifikanz erreichte. In diesem Experiment ergab sich für AP-2 γ eine Expressionsminderung um das 0,7-fache, was etwa dem erwarteten Effekt entspricht, jedoch ist durch eine relative hohe Varianz der CT-Werte innerhalb der technischen Triplikate bei der AP-2 γ Real-Time-PCR keine statistische Signifikanz erreicht ($p=0,56$). Der Grund für die uneinheitlichen CT-Werte ist nicht bekannt, zumal die CT-Werte innerhalb der technischen Replikate der anderen untersuchten Markern sehr viel homogener sind. Für die Marker Dppa4, Dppa5a, Esr1 und Nanog konnten die Ergebnisse des Microarrays bestätigt werden, das Expressionslevel von Lefty2 (im Microarray um das 0,7-fache herunterreguliert) bleibt fast unverändert (1,002-fach reguliert). Die im Microarray nicht signifikant regulierten Gene Dnd1 und Esr2 sind hier um das 0,56- bzw. das 0,58-fache herunterreguliert. Für das AP-2 γ -Zielgen p21 bestätigte sich der in Tcam-2 nach AP-2 γ -knock-down beobachtete Effekt (Abb.17c)); die p21 Expression steigt in heterozygoten Genitalfalten fast auf das doppelte (1,97-fach). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bestimmte Gene in allen AP-2 γ +/- Genitalfalten ähnlich stark reguliert sind (Dppa5a, Dppa4, Esr1, Nanog), andere jedoch entweder nur in einem Teil der Genitalfalten, oder sehr unterschiedlich stark (p21, Esr2, Dnd1, Lefty2).

Die 97 durch den Microarray ermittelten potentiellen AP-2 γ -Zielgene wurden entsprechend ihrer Funktionen in Gruppen eingeteilt (Abb.23). Die größte dieser Gruppen ist die der entwicklungsassoziierten Gene, zu der auch Gene gezählt wurden, die in der Keimzellentwicklung relevant sind, sowie pluripotenzassoziierte Gene ohne näher definierte Funktion wie etwa Fbxo15. Dass Keimzellmarker einen großen Anteil der gefundenen differentiell exprimierten Gene ausmachen entspricht insofern der Erwartung als dass die Keimzellen die einzigen Zellen in den Genitalfalten sind, in denen AP-2 γ am Tag E12.5 exprimiert ist. Die große Zahl der deregulierten Pluripotenzmarker ist in diesem Fall auch den Keimzellen zu zuordnen, da diese der einzige pluripotente Zelltyp in Genitalfalten des Tags E12.5 sind. Die Erniedrigung des Expressionslevels der Pluripotenzmarker deutet darauf hin, dass es in Keimzellen durch Reduktion der AP-2 γ Expression zum Einsetzen von Differenzierungsprozessen kommt. Dieses Ergebnis ist vor dem Hintergrund, dass es in den Tumoren der AP-2 γ +/- Tiere zu einer aberranten persistierenden Expression

von Pluripotenzmarkern kommt, überraschend. Da AP-2 γ heterozygote Mäuse einen Tumorphänotyp aufweisen ist es nicht verwunderlich, dass unter den potentiellen AP-2 γ -Zielgenen viele Tumorsuppressor- bzw. Oncogene zu finden sind (13%).

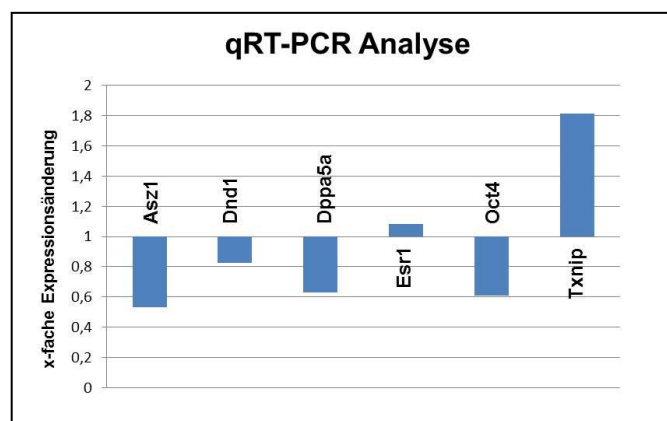


Abb.21: Validierung der Microarray-Daten durch Real-Time-PCR. Die Genexpression ist als x-fache Expressionsänderung zwischen Wildtyp und heterozygoten Proben dargestellt, wobei die wt-Expression gleich eins gesetzt wurde. $p > 0,05$ für Asz1, Dnd1 und Esr1; $p < 0,05$ für Dppa5a, Oct4 und Txnip.

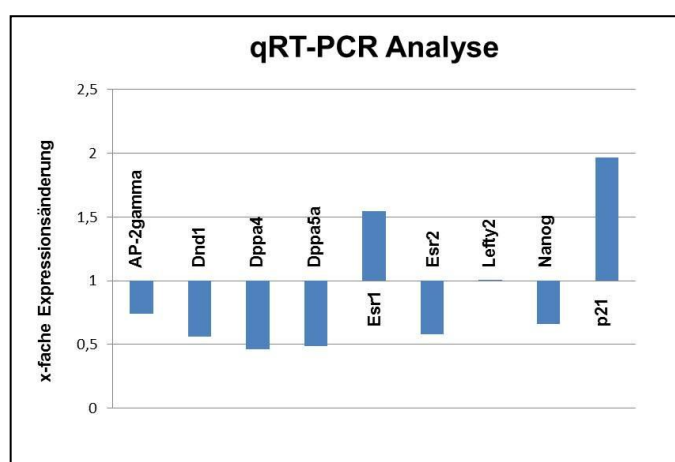


Abb.22: Real-Time-PCR. Die Genexpression ist als x-fache Expressionsänderung zwischen Wildtyp und heterozygoten Proben dargestellt. $p > 0,05$ für AP-2 γ und Esr2; $p < 0,05$ für Dnd1, Dppa4, Dppa5a, Esr1, Lefty2, Nanog und p21

Weitere kleinere Gruppen von deregulierten Genen sind Signaltransduktion (6%), Immunsystem (7%) und Metabolismus (6%). Insgesamt 22% der ermittelten Zielgene sind keiner bekannten Funktion zuzuordnen. Da einige dieser Gene jedoch zu den im Microarray am stärksten deregulierten Genen zählen, ist es durchaus möglich, dass es sich teilweise um Gene handelt, die einen großen Einfluss auf den in dieser Arbeit untersuchten Phänotyp haben.

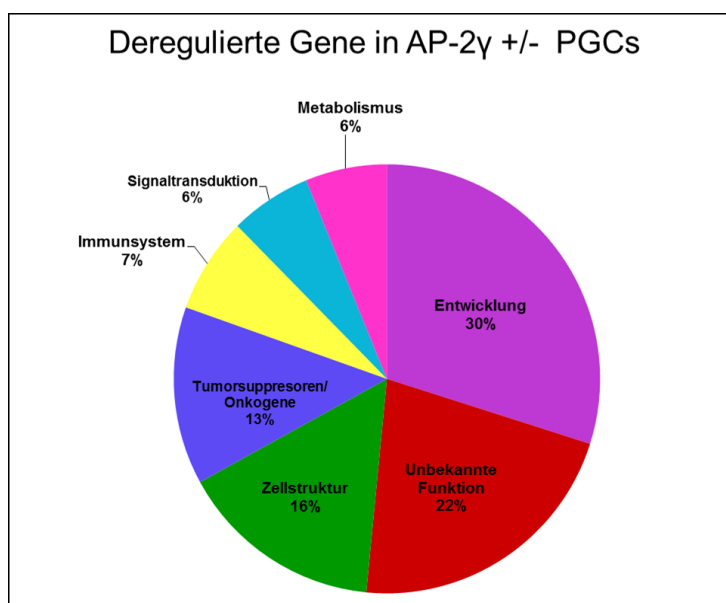


Abb.23: Funktionszuordnung der AP-2γ-Zielgene. Die in der Microarray-Analyse als dereguliert identifizierte Gene wurden gemäß ihrer Funktion in Gruppen eingeteilt. Die Gruppe „Entwicklung“ beinhaltet neben klassischen Regulatoren der Embryonalentwicklung auch Marker für Keimzellentwicklung und pluripotenzassoziierte Gene.

4.7 Untersuchung von AP-2γ -/- Tieren im 129/Sv Hintergrund

Frühere Experimente haben gezeigt, dass der Phänotyp den bestimmte Mutationen hervorrufen vom genetischen Hintergrund der Tiere abhängig ist. So ist bekannt, dass es in Dnd1 und Dmrt1 defizienten Mäusen im C57BL/6 Hintergrund zum Verlust der Keimzellen durch Apoptose kommt, im 129/Sv Hintergrund jedoch überlebt ein

Teil der Keimzellen. In einigen dieser Keimzellen findet eine maligne Transformation statt, wodurch es zur Bildung von testikulären Teratomen kommt (Cook et al, 2009; Krentz et al, 2009). Auch *Dnd1* oder *Dmrt1* +/- Tiere entwickeln im 129/Sv Hintergrund Teratome, jedoch mit deutlich geringerer Inzidenz als die entsprechenden -/- Männchen. Um zu untersuchen, ob dies auch für AP-2 γ defiziente Mäuse zutrifft, wurden AP-2 γ -/- Tiere im 129/Sv Hintergrund erzeugt. Hierzu wurden Weibchen mit zwei konditionalen AP-2 γ -Allelen (fl/fl) mit Männchen verpaart, die einerseits AP-2 γ heterozygot waren und andererseits positiv für das Sox2Cre-Transgen. Bei Embryonen die das Sox2Cre-Transgen erben kommt es zur Cre/LoxP vermittelten Exzision des von der Mutter ererbten konditionalen AP-2 γ -Allels. Wurde vom Vater das konstitutive AP-2 γ Knockout-Allel geerbt, wird AP-2 γ in diesem Embryo vollständig deletiert. Die Hoden von vier Wochen alten AP-2 γ -/-, +/- und wt Tieren wurden präpariert und verglichen, dabei fiel bereits bei makroskopischer Betrachtung auf, dass die Größe der -/- Hoden im Vergleich zum wt und zu +/- Tieren deutlich verringert ist (Abb.24a). Weiterhin war zu erkennen, dass die +/- Hoden wie erwartet von Tumoren befallen sind. Die Proben wurden in Paraffin eingebettet und Schnitte angefertigt. Zunächst wurden HE-Färbungen betrachtet, wobei zu erkennen war, dass die wt Hoden vollkommen normal entwickelt sind, wohingegen in den -/- Hoden die Leydigzellen und Sertolizellen zwar vorhanden sind, die Keimzellen jedoch fehlen. Um diesen Befund zu bestätigen wurde eine Färbung mit dem Keimzellmarker Tra98 durchgeführt. Während die Keimzellen der wt Kontrolle stark positiv waren (Abb.24b), konnte in den -/- Hoden keine Färbung beobachtet werden (Abb.24b). Die Tumore der +/- Hoden sind Teratome, die dem Entwicklungszustand der bereits beschriebenen Tumore gleichaltriger Tiere entsprechen. Es kann also festgehalten werden, dass der durch AP-2 γ Deletion hervorgerufene Keimzellverlust nicht vom genetischen Hintergrund der Tiere abhängig ist. Der völlige Verlust von AP-2 γ in Keimzellen ist offenbar nicht mit deren Überleben vereinbar, hierfür muss mindestens ein funktionsfähiges AP-2 γ Allel vorhanden sein. Ob es durch Verlust eines AP-2 γ -Allels zur Entstehung von Teratomen kommt ist jedoch vom genetischen Hintergrund abhängig.

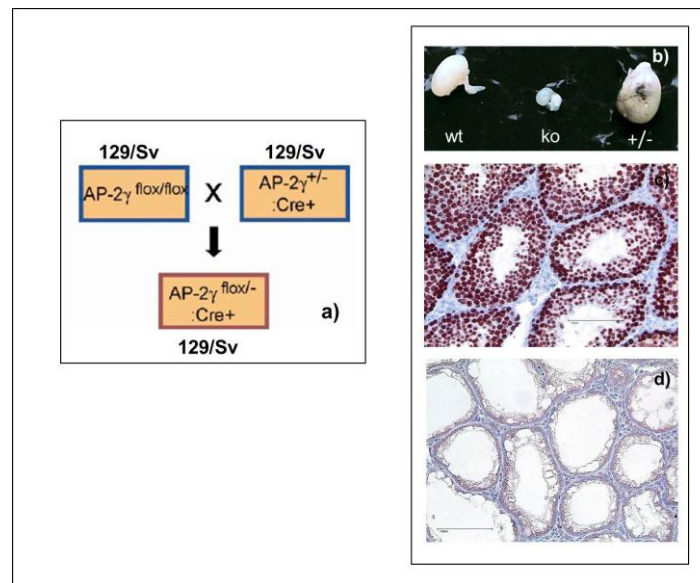


Abb.24: Deletion von AP-2 γ im 129Sv Hintergrund a) Verpaarungsschema für die Herstellung von AP-2 γ Knock-out Mäusen. „flox“ steht das konditionale AP-2 γ Allel, „+“ für das wt Allel und „-“ für das Knock-out Allel. „Cre+“ steht für das Sox2-Cre Transgen. b) Makroskopischer Vergleich der adulten Hoden der verschiedenen Genotypen. Die Hoden von AP-2 γ Knock-out Mäusen (Mitte) sind im Vergleich zu denen der Wildtyp-Geschwister deutlich größenreduziert (links). Die Hoden der AP-2 γ heterozygoten Tiere sind deutlich sichtbar von Tumoren befallen (rechts). c, d) Immunhistologische Färbung mit Tra98-Antikörper. Im Wildtyp-Hoden sind die Keimzellen deutlich gefärbt (c), im Knock-out Hoden fehlen die Keimzellen völlig. Der Größenbalken entspricht 100 μ m.

4.8 *In vivo* Lineage Tracing von AP-2 γ Knock-out-PGCs

Wie in dieser Arbeit gezeigt, verlieren AP-2 γ Knock-out-Mäuse ihr Keimzellen unabhängig vom genetischen Hintergrund. Es ist anzunehmen, dass es in AP-2 γ defizienten Tieren im 129/Sv Hintergrund wie bei vergleichbaren Tieren in gemischtem Hintergrund zur Keimzellspezifizierung kommt, dieses Zellschicksal jedoch nicht aufrechterhalten werden kann. Da während der Versuche im gemischten genetischen Hintergrund keine Apoptose in AP-2 γ -/- PGCs detektiert werden konnte wurde somatische Differenzierung dieser Zellen als mögliche Erklärung für den Keimzellverlust in Betracht gezogen und diese Hypothese mit Zellkulturexperimenten

gestützt (Weber et al; 2010). Um die somatische Differenzierung der AP-2 γ $-/-$ PGCs auch in vivo nachweisen zu können wurde ein Lineage Tracing Experiment durchgeführt, welches es ermöglicht die PGCs auch nach der Differenzierung mit Hilfe eines Reporters sichtbar zu machen. Als Reporter diente eine LacZ-Kassette, die unter der Kontrolle des endogenen Rosa26-Promotors steht und erst nach Cre-Rekombination aktiviert wird. Ist die LacZ-Kassette aktiviert, kommt es zur Expression von β -Galaktosidase, was dazu führt, dass die entsprechenden Zellen durch X-Gal-Färbung nachgewiesen werden können. Der Rosa26-Lokus bietet den Vorteil, dass er ubiquitär exprimiert wird. Dies bedeutet, dass es möglich ist den Reporter durch Cre-Rekombination spezifisch in PGCs zu aktivieren, jedoch bleibt der Reporter auch nach der Differenzierung dieser Zellen aktiv, auf Grund der ubiquitären Expression des Rosa26-Promotors, unter dessen Kontrolle er steht.

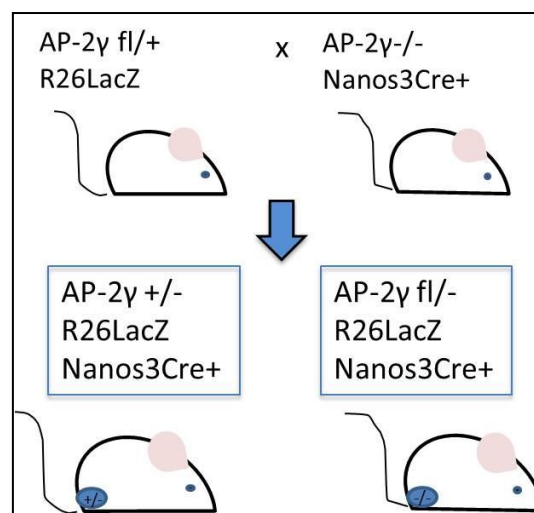


Abb.25: Verpaarungsschema für die in vivo Lineage Tracing Experimente. Weibchen, die homozygot für den LacZ-Reporter in Rosa26-Lokus sind (R26LacZ) und die gleichzeitig ein AP-2 γ Wildtyp-Allel und ein konditionales Allel (AP-2 γ fl/+) aufweisen wurden mit einem AP-2 γ -Knock-out-Männchen (AP-2 γ $-/-$) verpaart, welches gleichzeitig positiv für die Cre-Rekombinase unter dem Nanos3-Promotor ist (Nanos3Cre+). Dies führte zu Nachkommen, bei denen der LacZ-Reporter in den PGCs aktiv ist, wobei der AP-2 γ -Genotyp dieser PGCs entweder +/- oder $-/-$ sein kann.

Es wurde eine Verpaarungsstrategie gewählt, bei der nur in PGCs, in denen der AP-2 γ Knock-out induziert wird auch gleichzeitig der Reporter aktiviert wird (Abb.25). Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien aus dieser Verpaarung wurden präpariert, fixiert und einer Wholemount X-Gal-Färbung unterzogen. Wenn AP-2 γ -/- PGCs durch somatische Differenzierung verloren gehen, sollten diese differenzierten Zellen als LacZ-positive Zellen nachweisbar sein.

Die präparierten Embryonen der verschiedenen Entwicklungsstadien wurden zunächst mit Glutaraldehyd fixiert und dann für ca. 3 Stunden bei 37°C in der X-Gal-Färbelösung belassen. Nach dem Färben wurden die Embryonen geklärt und am Mikroskop fotografiert. Die PGCs sind anhand der Blaufärbung durch den LacZ-Reporter und ihre typische Lokalisation im Embryo gut zu erkennen (Abb.26a), jedoch fiel auf, dass es in einem geringen Prozentsatz der Embryonen zu einer ubiquitären, ektopischen Blaufärbung kam. Dieser Effekt beruht auf einer fehlerhaften Expression der Cre-Rekombinase die bei den Nanos3Cre-Männchen in einem geringen Anteil der Embryonen auftritt (Suzuki et al; 2008 supplementary data). Die betreffenden Embryonen wurden in diesem Experiment nicht berücksichtigt. Des Weiteren wurde in einigen Embryonen neben der den PGCs zu zuordnenden Blaufärbung (Abb.26e schwarzer Pfeil) ein ektopisches Signal beobachtet, welches in der Schwanzregion lokalisiert war (blauer Pfeil Abb.26e). Möglicherweise kam diese Färbung durch Verletzung des Embryos beim Präparieren zustande. Am Tag E9.5 sind etwa gleich viele PGCs in AP-2 γ -/- und +/- Embryonen zu sehen, die dem Entwicklungsstadium angemessen lokalisiert sind, d.h. sich auf der Migration zu den Genitalfalten befinden. Am Tag E10.5 ergibt sich ein ähnliches Bild, allerdings beginnen sich die PGCs nun in den Genitalfalten zu sammeln und sind nicht mehr über so einen weiten Bereich verteilt wie an E9.5 (Abb.26b+f). Am Tag E11.5 sind erstmals deutliche Unterschiede zwischen den Genotypen zu erkennen. Während sich die PGCs in den heterozygoten Embryonen weiter in den Genitalfalten sammeln (Abb.26g), hat die Anzahl der PGCs im den -/- Embryonen im Vergleich dramatisch abgenommen (Abb.26c) und es sind nur noch einzelne Keimzellen zu sehen (schwarzer Pfeil Abb.26c). Am Tag E13.5 sind außerhalb der Genitalfalten keine PGCs mehr sichtbar, daher wurden die Genitalfalten freipräpariert. In den AP-2 γ +/- Genitalfalten kommt es durch die eingewanderten

PGCs zu einer starker Blaufärbung (Abb.26h, rote Markierung), wohingegen die Genitalfalten der AP-2 γ $-/-$ Embryonen bis auf vereinzelt nachweisbare PGCs (Abb.26d, rote Markierung) weitgehend ungefärbt bleiben. Wären die PGCs während ihrer Wanderung in somatische Zellen differenziert müssten diese als blaugefärbte Zellen irgendwo im Embryo nachweisbar sein. Da dies nicht der Fall ist muss davon ausgegangen werden, dass die AP-2 γ $-/-$ PGCs, bis auf sehr wenige Zellen, die die Genitalfalten erreichen, zwischen Tag E10.5 und E13.5 verloren gehen. Da in den Hoden postnataler AP-2 γ $-/-$ Mäuse keine Keimzellen mehr nachgewiesen werden können, ist anzunehmen, dass die wenigen PGCs, die die Genitalfalten erreichen, nach Tag E13.5 ebenfalls verloren gehen. Der Versuch wurde mit allen gezeigten Embryonalstadien 2-3mal durchgeführt. Es wäre sinnvoll die Versuche noch 2-3 zu wiederholen, um auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Effekten um Zufallsbeobachtungen auf Grund einer kleinen Stichprobe handelt. Um evtl. vorhandenen apoptotische PGCs nachzuweisen wurden Gefrierschnitte von E11.0 Embryonen angefertigt und TUNEL-Färbungen, sowie verschiedene immunhistologische Färbungen durchgeführt. Da die Morphologie der Embryonen in den Gefrierschnitten jedoch sehr schlecht erhalten war, konnten die Färbungen nicht zuverlässig ausgewertet werden.

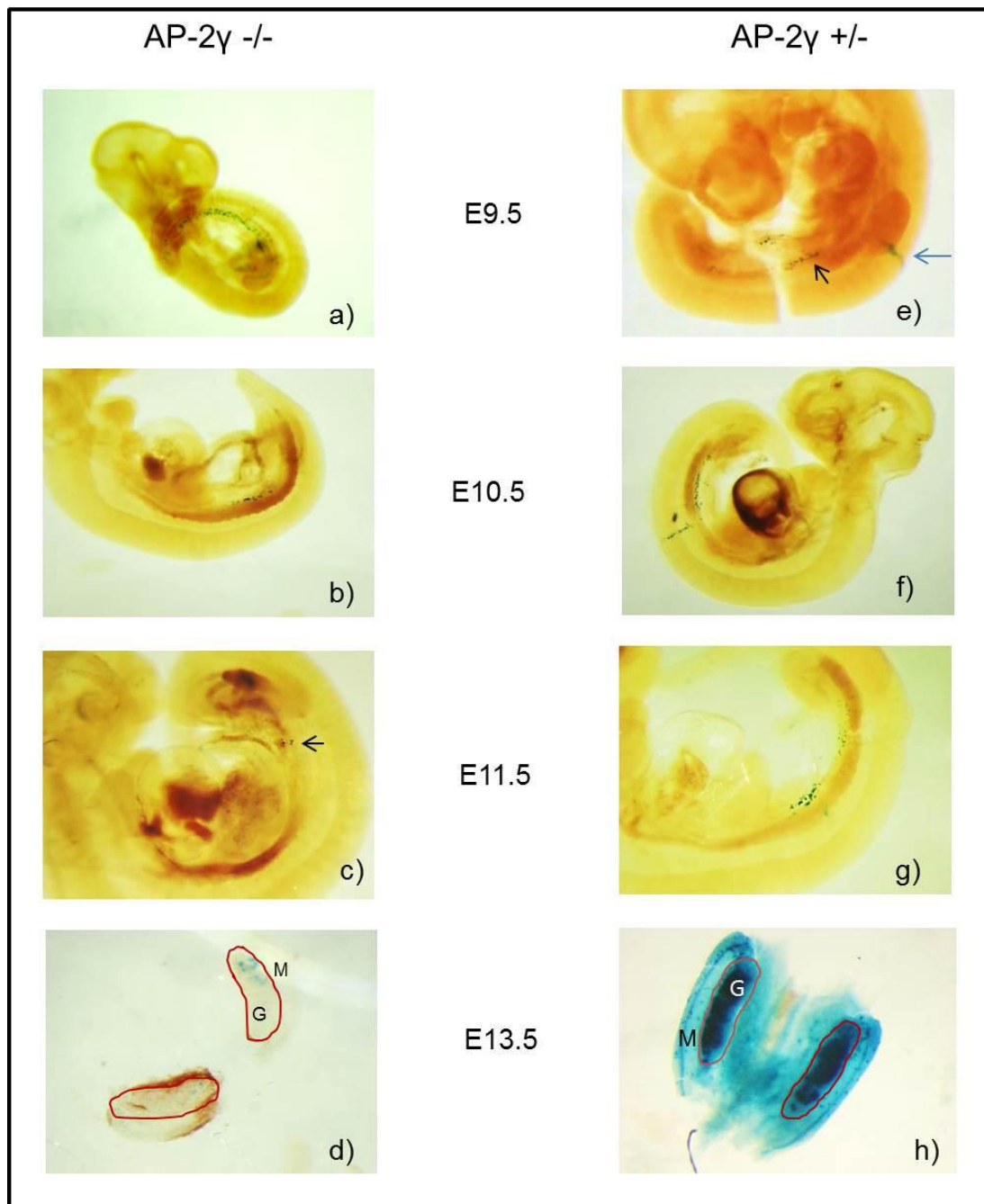


Abb.26: *In vivo* Lineage Tracing von PGCs a-d) AP-2 γ ^{-/-} Embryonen der Tage E9.5-E13.5 e-h) AP-2 γ ^{+/-} Embryonen der Tag E9.5-E13.5. Die Pfeile in c) und e) weisen auf PGCs. Die roten Markierungen in d) und h) grenzen die Genitalfalten vom Mesonephros ab, G= Genitalfalte, M= Mesonephros.

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung der Tumoren in AP-2 γ heterozygoten Mäusen und Ermittlung des Zeitpunkts der Tumorinitiation

Die Deletion von AP-2 γ in PGCs führt sowohl bei männlichen, wie auch bei weiblichen Mäusen zum kompletten Keimzellverlust (Weber et al; 2010). In dieser Arbeit wurde der Phänotyp der AP-2 γ heterozygoten (+/-) Tiere untersucht. Diese zeigen keine Auffälligkeiten, solange sie im C57BL/6 Hintergrund gehalten werden. Bei Rückkreuzung in den 129/Sv Hintergrund kommt es ab der 7. Generation der Rückkreuzung bei 82% der Männchen zur Bildung von testikulären Teratomen, während die Weibchen weiterhin unauffällig sind.

Anatomie und Histologie der in AP-2 γ +/- Tieren beobachteten Teratome sind mit den beschriebenen spontanen oder experimentell induzierten Teratomen in 129/Sv und 129/Sv^{Ter} Mäusen (Rives&Hamilton, 1986; Stevens, 1964) vergleichbar. Auch dass keine Metastasierung der Tumoren beobachtet wurde, deckt sich mit früheren Beschreibungen (Sundström et al; 1998). Als Tumovorläuferzellen von murinen Teratomen wurden bereits 1967 die „embryonal carcinoma cells“ (ECCs) beschrieben (Pierce et al; 1967). Es handelt sich dabei um Zellen, die morphologisch undifferenzierten PGCs ähneln. Die ECCs wurden in dieser Arbeit erstmals immunhistologisch und durch PCR-Analyse charakterisiert. Die Markerexpression der ECCs an Tag E16.5 entspricht der undifferenzierter PGCs; so werden Marker exprimiert die mit Pluripotenz, bzw. frühen PGCs assoziiert sind (Nanog, Oct3/4, Sox2, SSEA1, Nanos3, Ecadherin). Die Marker für differenzierte Keimzellen MvH oder Tra98 dagegen sind schwach oder gar nicht exprimiert. Des Weiteren sind ECCs an Tag E18.5 positiv für Proliferationsmarker, im Gegensatz zu wt PGCs, welche sich zu diesem Zeitpunkt im mitotischen Arrest befinden (Western et al; 2008). In ECCs kommt es demnach zu einer Blockierung der Keimzellendifferenzierung und zu fortgesetzter Proliferation, beides sind Voraussetzungen für die Bildung von Teratomen.

Verschiedene Beobachtungen sprechen bei murinen testikulären Teratomen für eine Tumorinitiation um den Tag E12.5. So wurden in detaillierten elektronenmikroskopischen Untersuchungen ECCs in den tumoranfälligen 129/Sv^{Ter} Mäusen bereits am Tag E13.0 beobachtet (River&Hamilton, 1986). Weiterhin wurde bei der experimentellen Induktion von Teratomen durch die Transplantation embryonaler Genitalfalten in das Interstitium adulter Mäusehoden beobachtet, dass die Effizienz der Tumorbildung drastisch sinkt, wenn die transplantierten Genitalfalten nach Tag E12.5 entnommen wurden (Stevens, 1964). Auch die Charakterisierung der ECCs durch RT-PCRs und immunhistochemische Färbungen, in dieser Arbeit zeigten, dass das Markerprofil dieser Zellen dem von PGCs um Tag E11.5-E12.5 entspricht. Dem entsprechend sind, im Gegensatz zu wt PGCs in angrenzenden Samenkanälchen, in den ECCs Pluripotenzmarker wie Oct4, Nanog und SSEA1 noch stark exprimiert und Marker für reife Keimzellen wie Mvh und Tra98 nur schwach oder gar nicht detektierbar. Von migratorischen PGCs unterscheiden sich ECCs durch die Expression der Rezeptor-Tyrosinkinase Kit. Kit wird während der Migration von PGCs exprimiert und beim Erreichen der Genitalfalten herunterreguliert. Dass in den am Tag E16.5 beobachteten Tumovorläuferläsionen mittels RT-PCR keine Kit-Expression nachgewiesen werden konnte, spricht dafür, dass die maligne Transformation der PGCs nach Erreichen der Genitalfalten durchlaufen wird. Diese Einschätzung wird durch die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse des Imprintingmusters der ECCs gestützt. Der Imprintingstatus der ECCs, bzw. Tumovorläuferläsionen wurde exemplarisch anhand der Methylierung der DMR des H19-Promotors untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Imprinting in den Tumorzellen gelöscht ist, was dem Zustand in PGCs zwischen Tag E12.5-E13.5 entspricht (Verona et al.; 2008). Dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen in humanen Keimzelltumoren. Dort wird angenommen, dass es sich bei der biallelischen Expression von durch Imprinting regulierten Genen in Keimzelltumoren um eine Eigenschaft handelt, die deren embryonalen Phänotyp widerspiegelt, jedoch nicht ursächlich an der Tumorinitiation beteiligt ist (Looijenga et al; 1998). Eine zu klärende Frage wäre an dieser Stelle, ob sich das Ausbleiben der Re-Etablierung der DNA-Methylierung in ECCs auf das Imprinting beschränkt, oder ob darüber hinaus die Promotor-Methylierung anderer Gene davon betroffen ist. Dies ist von Interesse, da die Herunterregulation der Pluripotenzmarker Sox, Nanog und Oct4

in PGCs mit Methylierung ihrer Promotorregionen einhergeht (Western et al; 2008). Sollte es aufgrund fehlender Promotormethylierung zu einer aberranten persistierenden Expression von Pluripotenzregulatoren kommen, könnte dies zur Transformation der PGCs beitragen. Ein weiterer deutlicher Hinweis auf den Zeitpunkt der Tumorentstehung ist auch, dass die Deregulation von AP-2 γ wie hier besprochen zur Bildung von Teratomen führt. Da AP-2 γ in PGCs nur bis Tag E12.5 nachgewiesen werden kann, ist der Effekt, den AP-2 γ auf die Tumorentstehung hat zeitlich entsprechend einzuordnen. Eine Deletion von AP-2 γ nach Tag E12.5 führt erwartungsgemäß nicht zur Tumorbildung, wie eigene Versuche gezeigt haben, bei denen Vasa-Cre-Mäuse (Cre-Expression ab E15 in den Keimzellen) für die Induktion des AP-2 γ -Knockouts benutzt wurden.

5.2 Abhängigkeit des Tumorphänotyps von AP-2 γ -Zielgenen und dem genetischen Hintergrund

Wie in AP-2 γ heterozygoten Mäusen ist eine Abhängigkeit der Entwicklung testikulärer Teratome vom genetischen Hintergrund auch in anderen Modellen, wie z.B. Dnd1 oder Dmrt1 heterozygoten Mäusen, beobachtet worden. Diese Tieren sind im C57BL/6 Hintergrund ebenfalls tumorfrei, im 129/Sv Hintergrund kommt es in 29% der Dnd1+/-, und 56% Dmrt1 +/- Männchen zur Bildung von testikulären Teratomen (Cook et al; 2011, Krentz et al; 2009). Der 129/Sv Inzuchtstamm ist der einzige bekannte Mausstamm, bei dem es zur spontanen Bildung von testikulären Teratomen kommt, wobei die Tumorzinzidenz bei wt 129/Sv Männchen je nach Sub-Stamm zwischen 1-10% liegt (Stevens et al; 1957). Da die Tumorraten der 129/Sv Mäuse durch das Einkreuzen der Dnd1, Dmrt1 und AP-2 γ Deletionsmutationen deutlich gesteigert wird, können diese Gene als Modifier dieses Teratom-Phänotyps bezeichnet werden. Entscheidend für die Ausprägung dieses Phänotyps sind also einerseits die spezifisch eingebrachten Mutationen, sowie andererseits unbekannte Determinanten, die den 129/Sv Stamm auszeichnen. Die Beobachtung, dass nur männliche Tiere Teratome entwickeln, deutet darauf hin, dass Unterschiede in der Keimzellentwicklung zwischen beiden Geschlechtern bei der Tumorentstehung eine Rolle spielen. Die Keimzellentwicklung verläuft in weiblichen und männlichen

Embryonen bis zum Eintritt der PGCs in die Genitalfalten (E10.5-E12.5) identisch. Kurz darauf wird in weiblichen PGCs die Meiose eingeleitet, wohingegen männliche PGCs ab Tag E12.5 in einen mitotischen Arrest (G0) eintreten (Western et al; 2008), der bis nach der Geburt beibehalten wird. Wie in dieser Arbeit und anderen Veröffentlichungen gezeigt wurde, gehen die späteren Tumoren in 129/Sv Mäusen auf einzelne PGCs zurück, die nicht ab E12.5 in den Zellzyklusarrest gehen, sondern auch an Tag E17.5 noch aktiv proliferieren (Cook et al; 2011; Krentz et al; 2009). Die Deregulation der Zellzykluskontrolle und somit die Vermeidung des mitotischen Arrests ist somit ein entscheidendes Ereignis bei der Tumorenstehung. Um herauszufinden warum diese aberrant proliferierenden PGCs nur im 129/Sv Hintergrund, nicht aber im C57BL/6 Hintergrund auftreten, wurden 129/Sv^{Ter/+} PGCs (die Tumoren entwickeln) und C57BL/6^{Ter/+} (die keine Tumoren entwickeln) PGCs verglichen. Es stellte sich heraus, dass weder alle 129/Sv^{Ter/+} PGCs, noch alle C57BL/6^{Ter/+} PGCs in den G0-Arrest eintreten. Jedoch treten die C57BL/6^{Ter/+} PGCs nicht in die Mitose ein, da das Ausbleiben des G0-Arrest durch Arrest an einer anderen Stelle des Zellzyklus kompensiert wird (Cook et al; 2011). Eine globale Expressionsanalyse (Microarray) zeigte darüber hinaus, dass Gene, die mit Zellzykluskontrolle und Apoptose assoziiert sind (z.B. p15^{Ink4b}, Puma, Bax, p53, Atm) in C57BL/6 PGCs im Vergleich zu 129/Sv PGCs stärker exprimiert sind; dagegen ist das G1-S-Phase assoziierte Cyclin D1 in C57BL/6 PGCs um das 3,43-fache herunterreguliert (Cook et al; 2011). Es lässt sich also sagen, dass die Anfälligkeit des 129/Sv-Stamms für testikuläre Teratome zumindest teilweise durch die gestörte Zellzykluskontrolle der PGCs begründet ist.

Ein weiteres Ereignis, das bei der Entstehung von Teratomen eine Rolle spielt, und vermutlich vom genetischen Hintergrund beeinflusst wird, ist die fehlerhafte Regulation von Pluripotenzmarkern. Teratome sind dadurch charakterisiert, dass sie aus Geweben aller drei Keimblättern bestehen, was als „Tumorstammzelle“ eine pluripotente Zelle voraussetzt. PGCs exprimieren zwar zunächst Pluripotenzmarker wie Oct4, SSEA1, Sox2 und Nanog, jedoch werden während der Keimzeldifferenzierung herunterreguliert und Marker für reife Keimzellen, wie Tra98 und Mvh hochreguliert (Western et al, 2008; Lacham-Kaplan, 2004). Wie in dieser Arbeit beschrieben sind die ECCs der frühen Tumorvorläuferläsionen stark positiv für

Oct4, SSEA1, Sox2 und Nanog (Abb.9, 10 und 11), was dafür spricht, dass es bei der Transformation von PGCs in ECCs zu einer aberranten Fortsetzung der Expression von Pluripotenzmarkern kommt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Mvh und Tra98 in vielen ECCs nicht, oder nur schwach exprimiert sind, wohingegen sie positiv für Ecadherin sind (Abb.9). Fortgesetzte Expression von Pluripotenzmarkern und ausbleibende Expression von Markern für reife Keimzellen spricht für eine unvollständige Differenzierung der Tumovorläuferzellen. Dafür, dass das Erreichen oder die Erhaltung pluripotenter Zustände im genetischen 129/Sv Hintergrund begünstigt ist spricht neben der Prädisposition zur Teratomentwicklung auch dass die Effizienz der ES-Zellgewinnung aus isolierten Epiblasten in diesem Stamm sehr hoch ist. Im C7BL/6 und CBA Stamm ist hierfür eine zusätzliche Inhibition der Serin/Threonin-Kinase Erk notwendig (Batlle-Morera et al; 2008). Basierend auf früheren Beobachtungen, die zeigen, dass zwischen Pluripotenz und Zellzykluskontrolle eine enge Verbindung besteht (Wang& Blelloch, 2009) und ihren eigenen Beobachtungen in ECCs, spekulieren Cook et al., dass die Transition vom „migratorischen Programm“ in PGCs (hohe Expression von Pluripotenzmarkern) zur Differenzierung in Prospermatogonien von erfolgreichem Zellzyklusarrest abhängig ist.

Wie bereits erwähnt kann der Phänotyp der spontan auftretenden Teratome im 129/Sv-Stamm durch das Einkreuzen von bestimmten Modifiern verstärkt oder abgemildert werden (Stevens, 1967a; Noguchi& Stevens, 1982; Michaud et al, 1994; Krentz et al, 2009). AP-2 γ ist in diesem Zusammenhang ein ausgesprochen potenter Modifier, da die Deletion eines Allels die Tumorzinzidenz bereits von den erwarteten 1-10% in 129/Sv wt Männchen auf 82% steigert (Abb.6b). Deletion eines Dnd1 oder Dmrt1-Alles führt dagegen lediglich zu einer Steigerung auf 29% bzw. 56%. Das Einkreuzen von Modifiern hat Auswirkungen auf das globale Expressionsmuster der PGCs, welche die Entstehung von Teratomen begünstigen. Dabei ist denkbar, dass es zu Expressionsänderungen einzelner direkter oder indirekter Zielgene kommt, deren Deregulation direkten Einfluss auf die Tumorentstehung nehmen. Andererseits ist es vorstellbar, dass sich die durch Deregulation mehrerer Gene hervorgerufenen Effekte aufsummieren und so zur Tumorbildung führen.

Um den Effekt der Deletion eines AP-2 γ - Allel auf das globale Expressionsmuster in PGCs zu untersuchen, wurde eine globale Expressionsanalyse (Microarray) durchgeführt, indem wt und AP-2 γ +/- Genitalfalten vom Tag E12.5 verglichen wurden. Da in AP-2 γ +/- Tieren lediglich ein AP-2 γ -Allel deletiert ist, kommt es nur zu einer Verringerung der AP-2 γ mRNA Expression um ca. 50% und einer Verringerung der AP-2 γ Protein Expression um ca. 25%. Der Effekt auf das globale Expressionsmuster ist daher nicht so stark, wie er bei einem kompletten Knock-out gewöhnlich zu erwarten ist. Entsprechend war die stärkste in der globalen Expressionsanalyse detektierte Deregulation eines Gens eine 2,66fache Steigerung der Expression (RIKEN cDNA 4933409K07 gene). Da die für den Versuch verwendeten Genitalfalten nicht nach Geschlecht selektiert wurden, handelt es sich bei den 97 gefundenen signifikant regulierten Genen um solche, bei denen Expressionsunterschiede zwischen den wt und AP-2 γ +/- Genotypen potentielle Expressionsunterschiede zwischen weiblichen und männlichen PGCs überwiegen. Da AP-2 γ am Tag E12.5 nur von PGCs und nicht von anderen Zelltypen der Genitalfalten exprimiert ist, wird angenommen, dass es auch nur in diesen zu einer Änderung des globalen Expressionsmusters kommt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es neben den direkten Effekten in PGCs auf Grund von Interaktionen zwischen PGCs und somatischen Zellen (z.B. Sertolizellen) auch zu sekundären Effekten im Genexpressionsmuster von somatischen Zellen kommt. So sind unter den 97 signifikant regulierten Genen viele keimzell,- bzw. testisassoziierte Marker, (z.B. Wnt7a, Agtr2, Kcnk9, Slc1a5, Clu, Dcn and Ptpn6, Gp9), deren Funktion noch nicht untersucht ist. Eine Gruppe von Genen, deren Expression am Tag E12.5 herunterreguliert ist sind pluripotenzassoziierte Marker (Oct4, Sox2, Nanog, Utf1, Tdgf1, Fbxo15, Dppa4, Dppa5a). Oct4, Sox2 und Nanog kooperieren bei der Bildung eines regulatorischen Netzwerks, welches durch die Kontrolle der Expression zahlreicher Zielgene, sowie durch autoregulatorische Effekte maßgeblich an der Pluripotenzkontrolle in Stammzellen beteiligt ist (Boyer et al; 2005). Daher liegt die Vermutung nahe, dass eine Deregulation von Oct4, Sox2 oder Nanog die Expressionsänderungen der anderen Pluripotenzmarker verursachen könnte, zumal Utf1, Tdgf1 und Fbxo15 bekannte Zielgene von Oct4 sind (Bianco et al, 2010; Nishimoto et al, 1999; Tokuzawa et al, 2003). Ein Faktor, der in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen könnte ist Esr2 (Östrogenrezeptor β). Dieser

Marker wurde im Microarray und in qRT-PCRs als deutlich herunterreguliert gefunden, jedoch erreichen diese Ergebnisse keine statistische Signifikanz. Es wurde gezeigt, dass *Esr2* in ES-Zellen mit *Nanog* interagiert um die Transkription von *Oct4* zu aktivieren (Zhang et al; 2008). Außerdem interagiert *Esr2* wiederum mit *Oct4* um die Expression von *Nanog* positiv zu beeinflussen (van den Berg et al; 2008). *Dppa5a* zeigt zwar in Keimzellen und anderen pluripotenten Zellen ein ähnliches Expressionsmuster wie *Oct4* (Western et al; 2005), jedoch kommt *Dppa5a* nicht als Regulator von *Oct4* in Frage, da *Oct4* essentiell für die Keimzellentwicklung ist (Kehler et al; 2004), *Dppa5a* defiziente Mäuse sind jedoch gesund und fertil (Amano et al; 2006). Über direkte oder indirekte Regulation der *Oct4*, *Sox2* oder *Nanog* Expression durch *AP-2 γ* in PGCs ist nichts bekannt. Nach den hier gezeigten Microarray und qRT-PCR-Daten müsste *AP-2 γ* bei einer direkten Regulation des *Oct4*, *Sox2* oder *Nanog* Promotors durch DNA-Bindung als transkriptioneller Aktivator fungieren. Dies scheint im Fall von *Nanog* unwahrscheinlich, da *AP-2 γ* in Trophoblaststammzellen als transkriptioneller Repressor am *Nanog*-Promotor agiert (Kuckenbergh et al; 2010). Bei einer indirekten Regulation könnte *AP-2 γ* die Expression eines Aktivators positiv beeinflussen oder aber die Expression eines Repressors reprimieren. Die Frage ob *Oct4*, *Sox2* oder *Nanog* direkt durch *AP-2 γ* reguliert werden, oder es einen übergeordneten Regulator gibt, dessen Expression von *AP-2 γ* abhängig, ist bedarf zur Klärung weiterer Experimente. Die Expression der Pluripotenzmarker in *AP-2 γ +/-* PGCs ist offenbar noch stark genug, um negative Effekte auf die Migration und Überleben der Keimzellen zu verhindern, da die überwiegende Mehrheit der *AP-2 γ +/-* PGCs die Gonaden erreichen und sich normal entwickeln. Die Infertilität der meisten *AP-2 γ +/-* Männchen wird dadurch hervorgerufen, dass die Hoden durch das Tumorstadium zerstört werden und nicht durch fehlerhafte Spermatogenese. Da die Reduktion der *AP-2 γ* -Expression zu einer Expressionsminderung von Pluripotenzmarkern an Tag E12.5 führt, ist anzunehmen, dass die persistierende Expression dieser Gene, die am Tag E16.5 in ECCs beobachtet wurde, keine direkte Folge der erniedrigten *AP-2 γ* -Expression ist. Dabei ist zu bedenken, dass E12.5 der letzte Tag der Keimzellentwicklung ist, an dem *AP-2 γ* -Protein nachweisbar ist, d.h. dass sich die Erniedrigung des *AP-2 γ* -Expressionsniveaus in heterozygoten Tieren auch nur bis zu diesem Tag auf potentielle Zielgene auswirken kann. Es ist möglich, dass sich nach E12.5 die

Expressionsniveaus der Pluripotenzmarker wieder auf das „wt-Expressionslevel“ einstellen und die über den Tag E14.5 hinaus persistierende Expression ein sekundärer Effekt der PGC-Transformation ist, nicht jedoch das Ereignis, welches um den Tag E12.5 zur Transformation führt. Als Hinweis darauf, dass Gene, die im Expressions-Microarray oder in qRT-PCRs als dereguliert gefunden wurden nach Tag E12.5 auf ihr „wt-Expressionslevel“ zurückkehren, kann die Entwicklung der p21-Expression gesehen werden. So wurde mittels qRT-PCR festgestellt, dass sich die p21-Expression in wt und AP-2 γ +/- Hoden (tumorfrei) einen Monat nach der Geburt nicht signifikant unterscheidet ($p=0,74$).

Da die maligne Transformation in AP-2 γ +/- PGCs nicht durch Überexpression von Pluripotenzregulatoren am Tag E12.5 erklärt werden kann, muss nach anderen potentiellen Mechanismen gesucht werden. Wie die Microarray-Analyse zeigte sind in AP-2 γ +/- Genitalfalten verschiedene Tumorsuppressoren und Onkogene dereguliert, von denen einige bekannte Funktionen in der Keimzellentwicklung haben. Das in AP-2 γ +/- PGCs herunterregulierte *Asz1* (auch *GASZ*) ist essentiell für die Expression von Mili und für die Synthese von piRNAs während der Keimzellentwicklung. Auf Grund der fehlenden Repression durch piRNAs kommt es in *Asz1* -/- Keimzellen zur Mobilisierung von Retrotransposons, was zu DNA-Schäden und Zelltod führen kann. Weiterhin zeigen *Asz1* -/- Keimzellen einen Meiose-Defekt und die adulten Tiere sind infertil (Ma et al; 2009). Es ist durchaus denkbar, dass nicht-unterdrückte Retrotransposons durch Insertionsmutagenese oder DNA-Doppelstrangbrüche zur Transformation von Zellen beitragen (Belancio et al; 2010). Das im Microarray heraufregulierte *Nat5* aktiviert die Transkription von mTERT (Fujiki et al; 2010), der katalytischen Untereinheit der Telomerase. Die Aktivität von Telomerase ist mit pluripotenten Zelltypen assoziiert und SNPs in der genomischen TERT Region sind mit humanen TGCTs assoziiert (Kratz et al; 2011). Wie bereits diskutiert spielt die Deregulation von Proliferation und Zellzykluskontrolle eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung aus PGCs. Unter den in AP-2 γ +/- PGCs deregulierten Genen befinden sich einige, die diese Mechanismen beeinflussen. Die heraufregulierte Tyrosinkinase *Met* ist ein bekanntes proto-Onkogen, das in vielen Krebsarten überaktiviert ist und Tumorprogression, Angiogenese und Metastasierung durch die Aktivierung der PI3K, MAPK, Shp2, und

PLC- γ Signalwege begünstigt (Gentile et al; 2008). Durch PI3K kommt es in PGCs auch zur Aktivierung von AKT, und wie in Pten defizienten Mäusen gezeigt wurde, ist dies mit einer Steigerung der Proliferationsrate verbunden, die zur Entstehung von Teratomen in 100% der Pten -/- Männchen führt (Kimura et al; 2003). Esr1 ist ein weiterer Aktivator des PI3K Signalwegs, der durch AKT Aktivierung zu erhöhter Proliferation in PGCs führt. Es wurde gezeigt, dass Esr1 am Tag E12.5 sowohl in PGCs wie auch in den somatischen Zellen der Genitalfalten exprimiert ist. Stimulation mit 17- β -Estradiol führt jedoch nur in PGCs zu erhöhter Phosphorylierung von AKT, SRC, cKit und ERK1/2, nicht in somatischen Zellen. In Folge der 17- β -Estradiol Stimulation kommt es zur Erhöhung der Proliferationsrate der PGCs. Es lässt sich vermuten, dass der gleiche Effekt erzielt wird wenn das Level der Esr1 Expression, wie hier gezeigt in AP-2 γ +/- PGCs, gesteigert wird. In dieser Arbeit wurde die Proliferation von *in vitro* kultivierten wt und AP-2 γ +/- PGCs verglichen und es konnte keine Erhöhung der Proliferationsrate in AP-2 γ +/- PGCs festgestellt werden. Jedoch wurde bei einer früheren Durchführung des gleichen Versuchs beobachtet, dass die AP-2 γ +/- PGCs signifikant schneller proliferieren als die wt Kontrolle (siehe Dissertation Susanne Weber, 2007). Diese widersprüchlichen Ergebnisse sind vermutlich durch die Unzuverlässigkeit der angewendeten Methode begründet. Um in dieser Frage Klarheit zu gewinnen, wäre es sinnvoll die PGCs anhand eines Keimzellmarkers wie etwa Stella oder Blimp1 mittels FACS (Fluorescence assisted cell sorting) zu isolieren und einer Zellzyklus-Analyse zu unterziehen. Um die mögliche Aktivierung der PI3K, SRC und MAPK Signalwege, sowie der cKit-Phosphorylierung zu untersuchen müsste man Proteine aus E12.5 Genitalfalten, oder aus FACS sortierten PGCs gewinnen und Western Blot Analysen mit den entsprechenden Antikörpern durchführen. Dass die Entwicklung von TGCTs östrogenabhängig ist, ist seit längerem bekannt. So wurde im Tiermodell gezeigt dass gestörtes Östrogen-Signalling und/oder Synthese zur Inhibition der TGCTs Entwicklung führt (Douglas et al; 2006). Weiterhin wurde ein positiver Zusammenhang zwischen maternalem Östrogenlevel und TGCT Entwicklung beim Nachwuchs festgestellt (Holl et al; 2009). Die Effekte gesteigerter Aktivierung von Esr1 auf die Entwicklung von TGCTs ist auch im Hinblick darauf von Interesse, dass die zunehmende Östrogenbelastung der Umwelt im Verdacht steht zu der steigenden

Zahl der TGCTs in der weißen Bevölkerung der westlichen Länder beizutragen (Sharpe, 2003).

Eine Verringerung der Dnd1 Expression wurde in den für den Microarray verwendeten Proben nicht als signifikant eingestuft ($p > 0,05$), jedoch erreichte die Deregulation in den nur mit qRT untersuchten RNAs signifikantes Niveau ($p < 0,05$). Der Grund dafür ist die geringere Varianz zwischen den einzelnen Proben im zweiten Versuch. Warum das Expressionsniveau von Dnd1 zwischen den einzelnen Genitalfalten so stark schwankt ist nicht bekannt. Die Rolle von Dnd1 in der Entwicklung von testikulären Teratomen ist jedoch bereits untersucht. In Dnd $-/-$ PGCs kommt es am Tag E14.5 nicht zur Induktion von p27 und p21, welche in wt PGCs zu diesem Zeitpunkt maßgeblich an der Einleitung bzw. Aufrechterhaltung des G0-Arrests beteiligt sind (Western et al; 2003). Im 129/Sv Hintergrund kommt es in Folge dessen zur Tumorinitiation, während es im C7BL/6 Hintergrund zum Arrest des Zellzyklus vor der Mitose kommt (Cook et al; 2011). Sollte die erniedrigte Dnd1 Expression bei der Tumorbildung in AP-2 γ +/- Mäusen eine Rolle spielen, so wird dies eine andere sein, denn p27 wurde in den AP-2 γ +/- Genitalfalten nicht als dereguliert gefunden. Weiterhin tritt der Effekt, den p21 auf die Aufrechterhaltung des mitotischen Arrests hat, erst später ein, wenn die p21 Expression PGCs schon nicht mehr durch AP-2 γ beeinflusst wird.

Die in dieser Arbeit in *in vitro* Experimenten gezeigte Regulation des Map2K1-Promotors durch AP-2 γ hat sich *in vivo* nicht bestätigt, da Map2K1 weder im Microarray noch in qRT-PCRs hochreguliert in AP-2 γ +/- PGCs gefunden wurde. Die unterschiedlichen Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Versuche könnten einerseits daher rühren, dass AP-2 γ in verschiedenen Zelltypen, evtl. durch die Anwesenheit unterschiedlicher Kofaktoren, unterschiedlich agiert. Andererseits könnte es sich bei der in den Zellkulturexperimenten gezeigten Interaktion um ein Artefakt handeln. Um dies auszuschließen müsste eine ChIP-Analyse durchgeführt werden, die eine direkte Bindung von AP-2 γ an den MapK1-Promotor nachweist.

Obwohl die Tumorzinzidenz in AP-2 γ +/- Tieren vergleichsweise hoch ist, wurde pro Hoden in der Regel nur ein Tumorfokus gefunden, im Gegensatz zu anderen Teratommodellen, bei denen pro Hoden mehrere Tumorfoci vorkommen (Kimura et

al, 2003; Krentz et al, 2009). Dies bedeutet, dass es sich bei der malignen Transformation in AP-2 γ +/- PGCs um ein relativ seltenes Ereignis handelt. Wie bereits diskutiert kommt es in AP-2 γ +/- PGCs zur Deregulation mehrerer Gene, die potentiell in die Transformation involviert sein könnten, wobei einige Faktoren in allen untersuchten Proben relativ gleichmäßig verändert waren, andere jedoch nur in einem Teil der Proben oder sehr unterschiedlich stark. Es ist denkbar, dass es zu einer ganz bestimmten Konstellation von Expressionsänderungen in dieser Gruppe von Genen kommen muss, damit PGCs transformiert werden, diese jedoch nur in wenigen AP-2 γ +/- PGCs erreicht wird. Es wäre auch möglich, dass die Deletion eines AP-2 γ Allels PGCs für weitere Mutationen prädisponiert, die auftreten müssen, damit es zur Transformation der entsprechenden Zelle kommt. Auch eine Abhängigkeit der Transformation vom Mikromillieu ist vorstellbar. Ueno et al. haben ein Modell postuliert, in dem das Überleben bestimmter PGCs und die Besiedlung der Genitalfalten durch diese, vom Erreichen sogenannter Stammzellnischen abhängt. Sie vermuten, dass die Regulation der PGC Entwicklung durch diese Nischen auch dafür notwendig ist das Auftreten aberranter, neoplastischer Stammzellklone zu unterdrücken (Ueno et al; 2009). In diesen Stammzellnischen wären die PGCs bestimmten Umwelteinflüssen, wie etwa Wachstumsfaktoren oder Hormonen, ausgesetzt, die wahrscheinlich gewissen Schwankungen unterliegen. Sollte die Deregulation von Esr1 und evtl. Esr2 in der Transformation AP-2 γ heterozygoter PGCs tatsächlich eine wesentliche Rolle spielen, könnten Ungleichmäßigkeiten in der Östrogenverteilung ausschlaggebend sein.

5.3 Keimzellphänotyp AP-2 γ defizienter Mäuse im 129/Sv Hintergrund

In C57BL/6 Dnd1 Knock-out-Mäusen kommt es zum Verlust der meisten Keimzellen während der Migration, die restlichen gehen kurz nach Ankunft in den Genitalfalten verloren. Im Gegensatz dazu gehen die Keimzellen im 129/Sv Hintergrund nicht verloren, dafür kommt es bei 94% der Männchen zur Entwicklung von testikulären

Teratomen (Cook et al; 2009). Um zu zeigen, dass die PGCs durch Bax-abhängige Apoptose verloren gehen, wurden die Dnd1 +/- Mäuse mit Bax +/- gekreuzt. Wie sich zeigte überleben auch im C7BL/6 Hintergrund in Dnd1 -/-/Bax -/- ein großer Teil der Keimzellen, doch kommt es nicht zur Tumorbildung (Cook et al; 2011). Neben dem genetischen Hintergrund spielt auch die Gendosis eine Rolle. Die Anzahl der Tiere mit Teratomen steigt in Dnd1 und auch in Dmrt1 defizienten Tieren stark an, wenn beide Allele des Gene deletiert sind. Zur Klärung der Frage, ob es auch bei AP-2 γ -/- Tieren im 129/Sv Hintergrund zum Überleben von PGCs und einer Steigerung der Tumorinzidenz kommt wurden AP-2 γ defiziente Tiere in diesem Hintergrund erzeugt. Im Gegensatz zu Dnd1 -/- und Dmrt1 -/- Tieren verlieren AP-2 γ -/- Mäuse auch im 129/Sv ihre Keimzellen (Abb.24 b). Dies bedeutet dass, der komplette Verlust von AP-2 γ nicht mit der Erhaltung der Keimzellen vereinbar ist, unabhängig vom genetischen Hintergrund. Ein möglicher Grund für den unterschiedlichen Phänotyp zwischen AP-2 γ und Dnd1 oder Dmrt1 -/- Mäusen könnte der Mechanismus durch den es zum Keimzellverlust kommt, sein. In Dnd1 -/- und Dmrt1 -/- Mäusen gehen die PGCs durch Bax-abhängige Apoptose verloren, dies konnte in AP-2 γ -/- Tieren nicht nachgewiesen werden. Auf jeden Fall deuten die unterschiedlichen Phänotypen der 129/Sv AP-2 γ +/- und -/- Mäuse darauf hin, dass AP-2 γ zwei distinkte Funktionen während der Keimzellentwicklung hat. Dabei handelt es sich einerseits um eine Funktion während der Keimzellmigration, die essential für die Erhaltung der Keimzellen ist, und andererseits um eine Funktion die wichtig für die Unterdrückung der Transformation der post-migratorischen PGCs ist.

5.4 *In vivo* Lineage Tracing von AP-2 γ -/- PGCs

Wie in dieser Arbeit gezeigt ist der Keimzellverlust in AP-2 γ defizienten Mäusen unabhängig vom genetischen Hintergrund. Der genaue Mechanismus durch den die Keimzellen verloren gehen ist bisher nicht bekannt. Da in früheren Versuchen keine Apoptose nachgewiesen werden konnte, wurde somatische Differenzierung der PGCs vermutet und auch gezeigt, dass nach AP-2 γ Deletion somatische Marker hochreguliert werden (Weber et al; 2010). Um diese Hypothese zu untersuchen

wurden *in vivo* Lineage Tracing Experimente in E9.5- E13.5 Embryonen durchgeführt. Durch Cre-Rekombination wurde gleichzeitig mit der Induktion der AP-2 γ Knock-outs ein LacZ-Reporter aktiviert und die AP-2 γ $-/-$ PGCs durch X-Gal-Färbung sichtbar gemacht. Es wurde angenommen, dass Anzahl und Lokalisation der betrachteten AP-2 γ $+/-$ PGCs der von wt PGCs entsprechen, da in AP-2 γ $+/-$ Tieren die Keimzellmigration und die Besiedlung der Genitalfalten erfolgreich abgeschlossen wird. Von Tag E9.5- E10.5 wurden in AP-2 γ $+/-$ und $-/-$ Embryonen etwa gleich viele migratorische PGCs beobachtet. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu früheren Experimenten, bei denen die PGCs durch alkalische Phosphatase-Färbung sichtbar gemacht wurden. Damals konnten die Keimzellen nach Tag E8.5 nicht mehr detektiert werden (Weber et al; 2010). Die unterschiedlichen Ergebnisse beruhen wahrscheinlich auf den angewendeten Färbemethoden. Alkalische Phosphatase (TNAP) ist ein Marker für frühe, undifferenzierte PGCs; wenn man davon ausgeht, dass es in AP-2 γ $-/-$ PGCs zum Einsetzen somatischer Differenzierung kommt, verlieren die Zellen diesen Marker vermutlich und sind daher nicht mehr durch alkalische Phosphatase-Färbung nachweisbar. Dieses Problem sollte bei der LacZ-Färbung nicht auftreten, da der Reporter von einem ubiquitär aktiven Promotor (Rosa26) kontrolliert wird. Ab Tag E11.5 kommt es zu einer starken Reduktion der Keimzellzahl in AP-2 γ $-/-$ Embryonen im Vergleich zur Kontrolle. Die aus E13.5 Embryonen präparierten Genitalfalten der Kontrolltiere sind durch die dichte Besiedlung mit PGCs stark blau gefärbt, wohingegen in AP-2 γ $-/-$ Genitalfalten nur sehr wenige PGCs nachweisbar sind. Auch außerhalb der Genitalfalten wurden keine blaugefärbten Zellen beobachtet, die auf differenzierte PGCs zurückgehen könnten. Hierfür kommen zwei Erklärungen in Frage. Erstens hängt die erfolgreiche Detektion differenzierter PGCs von der Expression und Nachweisbarkeit des Reporters ab. Sollte die Reporterexpression vom Rosa26-Promotor in den differenzierten Zellen aus irgendeinem Grund nicht gewährleistet sein, könnten die Zellen nicht dargestellt werden. Das Funktionieren der X-Gal-Färbung selbst wurde durch Mitführen von Positivkontrollen kontrolliert und somit sichergestellt, dass es nicht zu falsch negativen Ergebnissen kam. Als zweite Möglichkeit wird in Betracht gezogen, dass die PGCs nach Tag E10.5 verloren gehen, wobei der Mechanismus dieses Verlusts unbekannt ist.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit können verschiedene Schlussfolgerungen gezogen werden, die es erlauben eine neue Hypothese über den Keimzellverlust im AP-2 γ $-/-$ Mäusen zu formulieren. Zunächst wird die frühere Vermutung gestützt, dass AP-2 γ in migratorischen PGCs Differenzierungsprozesse unterdrückt und so für den Erhalt der Keimzellidentität sorgt. Die Microarray-Analyse in AP-2 γ $+/-$ Genitalfalten eine Erniedrigung der Expressionslevels vieler Pluripotenzmarker, wie z.B. Oct4, Sox2 und Nanog. Dies kann als Zeichen einsetzender Differenzierung gewertet werden, wobei anzunehmen ist, dass der Effekt bei kompletter AP-2 γ Defizienz deutlich stärker ist. Zweites können AP-2 γ $-/-$ PGCs mit einem Reporter, der nicht vom Differenzierungszustand abhängig ist (Rosa26-LacZ) deutlich länger nachgewiesen werden, als anhand einer Färbung, die auf einem Marker für undifferenzierte PGCs (TNAP) beruht. Weiterhin deutet die Beobachtung, dass die AP-2 γ $-/-$ PGCs, bzw. die durch Differenzierung aus ihnen hervorgegangenen Zellen, auch durch den LacZ-Reporter ab E11.5 zum größtem Teil nicht mehr nachweisbar sind darauf hin, dass diese Zellen wahrscheinlich absterben. Bei früheren Untersuchungen konnte keine Apoptose in AP-2 γ $-/-$ PGCs nachgewiesen werden. Die Ursache hierfür könnte die Verwendung von Embryonen von Tag E8.0 für den Apoptose-Nachweis sein (Weber et al; 2010). Da die Anzahl der AP-2 γ $-/-$ PGCs bei der X-Gal-Färbung erst zwischen E10.5 und E11.5 stark zurückging, könnte auch erst ab diesem Zeitpunkt Apoptose detektiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es in PGCs durch den Verlust von AP-2 γ zum Einsetzen von Differenzierungsprozessen kommt, die durch die Herunterregulation von Pluripotenzmarkern und die Induktion von mesodermalen Markern gekennzeichnet sind. Ab Tag E10.5 gehen in AP-2 γ $-/-$ Tieren die Keimzellen verloren, jedoch konnte somatische Differenzierung als Mechanismus des Keimzellverlusts *in vivo* nicht nachgewiesen werden.

5.5 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es in AP-2 γ heterozygoten Mäusen auf Grund von gestörter Pluripotenzregulation, unvollständiger Differenzierung und fehlendem mitotischem Arrest in PGCs zur Bildung testikulärer Teratome kommt. Diese Tumoren wurden eingehend charakterisiert und mit Teratomen in anderen Mausmodellen verglichen. Durch Vergleiche des globalen Expressionsmusters von AP-2 γ +/- und wt Genitalfalten konnten einige Theorien aufgestellt werden, durch Beteiligung welcher Faktoren es zur Transformation in AP-2 γ +/- PGCs kommt. Da sich diese Theorien hauptsächlich auf ein verändertes Proliferationsverhalten und fehlerhafte Zellzykluskontrolle stützen, müssten diese Aspekte noch eingehender untersucht werden. So wäre es wichtig zweifelsfrei festzustellen, ob das Proliferationsverhalten von AP-2 γ +/- PGCs tatsächlich gestört ist, wozu sich FACS-Analysen am besten eignen würden. Außerdem sollte überprüft werden welche zellulären Signalwege in diesem Zusammenhang aktiviert sind; zu diesem Zweck müssten Western Blot- Analysen durchgeführt werden. Des Weiteren könnten mit Genen, die möglicherweise direkte Zielgene von AP-2 γ sind (z.B. Esr1) ChIPs und Luziferase-Assays durchgeführt werden, um eine direkte Regulation nachzuweisen. Es wäre auch interessant zu untersuchen, ob AP-2 γ wt und +/- PGCs unterschiedlich stark auf Stimulation mit Estradiol- β reagieren, was dafür sprechen würde, dass die Überexpression von Esr1 direkt in die Transformation von AP-2 γ +/- PGCs involviert ist.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der Keimzellverlust in AP-2 γ Knock-out Mäusen unabhängig vom genetischen Hintergrund ist. Durch *in vivo* Lineage Tracing Experimente wurde gezeigt, dass AP-2 γ -/- PGCs nicht, wie bisher angenommen am Tag E8.0 verloren gehen, sondern mindestens bis E10.5 persistieren. Nach Tag E11.5 jedoch waren in AP-2 γ -/- Tieren keine PGCs mehr detektierbar. Es ist unklar, ob dies evtl. mit Problemen beim Nachweis des Reporters zusammenhängt, oder ob die PGCs verloren gehen. Um auszuschließen, dass es sich bei dieser Beobachtung um ein Artefakt bei einer kleinen Stichprobe handelt, sollte das Experiment zunächst wiederholt werden. Eine Möglichkeit wäre auch, das Experiment mit einem anderen Reporter zu wiederholen, wobei die Auswahl so zu

treffen wäre, dass dieser von einem ubiquitär aktiven Promotor angetrieben wird. Weiterhin sollte zwischen Tag E10.5-E11.5 eine TUNEL- oder aktive Caspase3-Färbung durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob die PGCs durch Apoptose verloren gehen.

6 Literaturverzeichnis

Amano, H., K. Itakura, et al. (2006). "Identification and targeted disruption of the mouse gene encoding ESG1 (PH34/ECAT2/DPPA5)." *BMC Dev Biol* 6: 11.

Ancelin, K., U. C. Lange, et al. (2006). "Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells." *Nat Cell Biol* 8(6): 623-30.

Auman, H. J., T. Nottoli, et al. (2002). "Transcription factor AP-2gamma is essential in the extra-embryonic lineages for early postimplantation development." *Development* 129(11): 2733-47.

Batlle-Morera, L., A. Smith, et al. (2008). "Parameters influencing derivation of embryonic stem cells from murine embryos." *Genesis* 46(12): 758-67.

Bedell, M. A., L. S. Cleveland, et al. (1996). "Deletion and interallelic complementation analysis of Steel mutant mice." *Genetics* 142(3): 935-44.

Belancio, V. P., A. M. Roy-Engel, et al. (2010). "All y'all need to know 'bout retroelements in cancer." *Semin Cancer Biol* 20(4): 200-10.

Bianco, C., M. C. Rangel, et al. (2010). "Role of Cripto-1 in stem cell maintenance and malignant progression." *Am J Pathol* 177(2): 532-40.

Bosher, J. M., T. Williams, et al. (1995). "The developmentally regulated transcription factor AP-2 is involved in c-erbB-2 overexpression in human mammary carcinoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(3): 744-7.

Boyer, L. A., T. I. Lee, et al. (2005). "Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells." *Cell* 122(6): 947-56.

Chazaud, C., M. Oulad-Abdelghani, et al. (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.

Chung, P. W., A. J. Bayley, et al. (2004). "Spermatocytic seminoma: a review." *Eur Urol* 45(4): 495-8.

Cook, M. S., D. Coveney, et al. (2009). "BAX-mediated cell death affects early germ cell loss and incidence of testicular teratomas in Dnd1(Ter/Ter) mice." *Dev Biol* 328(2): 377-83.

- Cook, M. S., S. C. Munger, et al. (2011). "Regulation of male germ cell cycle arrest and differentiation by DND1 is modulated by genetic background." *Development* 138(1): 23-32.
- Deng, C., P. Zhang, et al. (1995). "Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control." *Cell* 82(4): 675-84.
- Douglas, M. L., M. M. Richardson, et al. (2006). "Testicular germ cell tumors exhibit evidence of hormone dependence." *Int J Cancer* 118(1): 98-102.
- Eckert, D., S. Buhl, et al. (2005). "The AP-2 family of transcription factors." *Genome Biol* 6(13): 246.
- Eckert, D., D. Nettersheim, et al. (2008). "TCam-2 but not JKT-1 cells resemble seminoma in cell culture." *Cell Tissue Res* 331(2): 529-38.
- Extavour, C. G. and M. Akam (2003). "Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation." *Development* 130(24): 5869-84.
- Farini, D., G. La Sala, et al. (2007). "Chemoattractant action and molecular signaling pathways of Kit ligand on mouse primordial germ cells." *Dev Biol* 306(2): 572-83.
- Feng, W. and T. Williams (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): 460-75.
- Fujiki, T., M. Uono, et al. "NFAT5 regulates transcription of the mouse telomerase reverse transcriptase gene (2010). " *Exp Cell Res* 316(20): 3342-50.
- Garcia, M. A., M. Campillos, et al. (2000). "Identification of amino acid residues of transcription factor AP-2 involved in DNA binding." *J Mol Biol* 301(4): 807-16.
- Gartel, A. L. and A. L. Tyner (2002). "The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis." *Mol Cancer Ther* 1(8): 639-49.
- Gentile, A., L. Trusolino, et al. (2008). "The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer." *Cancer Metastasis Rev* 27(1): 85-94.
- Ginsburg, M., M. H. Snow, et al. (1990). "Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation." *Development* 110(2): 521-8.

Gu, Y., C. Runyan, et al. (2009). "Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration." *Development* 136(8): 1295-303.

Hajkova, P., S. J. Jeffries, et al. "Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway(2010). " *Science* 329(5987): 78-82.

Hayashi, K., S. M. de Sousa Lopes, et al. (2007). "Germ cell specification in mice." *Science* 316(5823): 394-6.

Heaney, J. D., M. Y. Lam, et al. (2008). "Loss of the transmembrane but not the soluble kit ligand isoform increases testicular germ cell tumor susceptibility in mice." *Cancer Res* 68(13): 5193-7.

Heaney, J. D., M. V. Michelson, et al. (2009). "Deletion of eIF2beta suppresses testicular cancer incidence and causes recessive lethality in agouti-yellow mice." *Hum Mol Genet* 18(8): 1395-404.

Helt, C. E., R. C. Rancourt, et al. (2001). "p53-dependent induction of p21(Cip1/WAF1/Sdi1) protects against oxygen-induced toxicity." *Toxicol Sci* 63(2): 214-22.

Hoei-Hansen, C. E., J. E. Nielsen, et al. (2004). "Transcription factor AP-2gamma is a developmentally regulated marker of testicular carcinoma in situ and germ cell tumors." *Clin Cancer Res* 10(24): 8521-30.

Holl, K., E. Lundin, et al. (2009). "Endogenous steroid hormone levels in early pregnancy and risk of testicular cancer in the offspring: a nested case-referent study." *Int J Cancer* 124(12): 2923-8.

Jager, R., S. Schafer, et al. "Loss of transcription factor AP-2gamma/TFAP2C impairs branching morphogenesis of the murine mammary gland (2010). " *Dev Dyn* 239(3): 1027-33.

Javelaud, D., J. Wietzerbin, et al. (2000). "Induction of p21Waf1/Cip1 by TNFalpha requires NF-kappaB activity and antagonizes apoptosis in Ewing tumor cells." *Oncogene* 19(1): 61-8.

Kaatsch, P. (2004). "[German Childhood Cancer Registry and its favorable setting]." *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 47(5): 437-43.

Kehler, J., E. Tolkunova, et al. (2004). "Oct4 is required for primordial germ cell survival." *EMBO Rep* 5(11): 1078-83.

- Kimura, T., A. Suzuki, et al. (2003). "Conditional loss of PTEN leads to testicular teratoma and enhances embryonic germ cell production." *Development* 130(8): 1691-700.
- Knuesel, M. T., K. D. Meyer, et al. (2009). "The human CDK8 subcomplex is a molecular switch that controls Mediator coactivator function." *Genes Dev* 23(4): 439-51.
- Koubova, J., D. B. Menke, et al. (2006). "Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice." *Proc Natl Acad Sci USA* 103(8): 2474-9.
- Kratz, C. P., S. S. Han, et al. (2011). "Variants in or near KITLG, BAK1, DMRT1, and TERT-CLPTM1L predispose to familial testicular germ cell tumour." *J Med Genet*.
- Krentz, A. D., M. W. Murphy, et al. (2009). "The DM domain protein DMRT1 is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(52): 22323-8.
- Kuckenbergh, P., S. Buhl, et al. (2010). "The transcription factor TCFAP2C/AP-2gamma cooperates with CDX2 to maintain trophoctoderm formation" *Mol Cell Biol* 30(13): 3310-20.
- Kurimoto, K., Y. Yabuta, et al. (2008). "Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice." *Genes Dev* 22(12): 1617-35.
- Lacham-Kaplan, O. (2004). "In vivo and in vitro differentiation of male germ cells in the mouse." *Reproduction* 128(2): 147-52.
- Lee, N. P., K. W. Leung, et al. (2006). "Blockage of testicular connexins induced apoptosis in rat seminiferous epithelium." *Apoptosis* 11(7): 1215-29.
- Liu, S., W. R. Bishop, et al. (2003). "Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy." *Drug Resist Updat* 6(4): 183-95.
- Looijenga, L. H., A. J. Verkerk, et al. (1998). "Genomic imprinting in testicular germ cell tumours." *Apmis* 106(1): 187-95; discussion 196-7.
- Ma, L., G. M. Buchold, et al. (2009). "GASZ is essential for male meiosis and suppression of retrotransposon expression in the male germline." *PLoS Genet* 5(9): e1000635.

Matson, C. K., M. W. Murphy, et al. (2010). "The mammalian doublesex homolog DMRT1 is a transcriptional gatekeeper that controls the mitosis versus meiosis decision in male germ cells." *Dev Cell* 19(4): 612-24.

Matsui, T. A., H. Murata, et al. (2010). "A novel MEK1/2 inhibitor induces G1/S cell cycle arrest in human fibrosarcoma cells." *Oncol Rep* 24(2): 329-33.

Michaud, E. J., S. J. Bultman, et al. (1994). "A molecular model for the genetic and phenotypic characteristics of the mouse lethal yellow (Ay) mutation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(7): 2562-6.

Mohibullah, N., A. Donner, et al. (1999). "SELEX and missing phosphate contact analyses reveal flexibility within the AP-2[alpha] protein: DNA binding complex." *Nucleic Acids Res* 27(13): 2760-9.

Moser, M., A. Imhof, et al. (1995). "Cloning and characterization of a second AP-2 transcription factor: AP-2 beta." *Development* 121(9): 2779-88.

Mostofi, F. K., I. A. Sesterhenn, et al. (1987). "Immunopathology of germ cell tumors of the testis." *Semin Diagn Pathol* 4(4): 320-41.

Motzer, R. J., A. Amsterdam, et al. (1998). "Teratoma with malignant transformation: diverse malignant histologies arising in men with germ cell tumors." *J Urol* 159(1): 133-8.

Niculescu, A. B., 3rd, X. Chen, et al. (1998). "Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication." *Mol Cell Biol* 18(1): 629-43.

Noguchi, T. and L. C. Stevens (1982). "Primordial germ cell proliferation in fetal testes in mouse strains with high and low incidences of congenital testicular teratomas." *J Natl Cancer Inst* 69(4): 907-13.

Ogryzko, V. V., P. Wong, et al. (1997). "WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases." *Mol Cell Biol* 17(8): 4877-82.

Ohinata, Y., H. Ohta, et al. (2009). "A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice." *Cell* 137(3): 571-84.

Ohinata, Y., B. Payer, et al. (2005). "Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice." *Nature* 436(7048): 207-13.

Oosterhuis, J. W. and L. H. Looijenga (2003). "Current views on the pathogenesis of testicular germ cell tumours and perspectives for future research: highlights of the 5th Copenhagen Workshop on Carcinoma in situ and Cancer of the Testis." *Apmis* 111(1): 280-9.

Oosterhuis, J. W. and L. H. Looijenga (2005). "Testicular germ-cell tumours in a broader perspective." *Nat Rev Cancer* 5(3): 210-22.

Oulad-Abdelghani, M., P. Bouillet, et al. (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): 338-47.

Pauls, K., R. Jager, et al. (2005). "Transcription factor AP-2gamma, a novel marker of gonocytes and seminomatous germ cell tumors." *Int J Cancer* 115(3): 470-7.

Pauls, K., H. Schorle, et al. (2006). "Spatial expression of germ cell markers during maturation of human fetal male gonads: an immunohistochemical study." *Hum Reprod* 21(2): 397-404.

Pierce, G. B., L. C. Stevens, et al. (1967). "Ultrastructural analysis of the early development of teratocarcinomas." *J Natl Cancer Inst* 39(4): 755-73.

Popa, C., A. L. Dahler, et al. (2004). "AP-2 transcription factor family member expression, activity, and regulation in human epidermal keratinocytes in vitro." *Differentiation* 72(5): 185-97.

Rajpert-De Meyts, E. and N. E. Skakkebaek (1994). "Expression of the c-kit protein product in carcinoma-in-situ and invasive testicular germ cell tumours." *Int J Androl* 17(2): 85-92.

Richardson, B. E. and R. Lehmann (2010). "Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(1): 37-49.

Rivers, E. N. and D. W. Hamilton (1986). "Morphologic analysis of spontaneous teratocarcinogenesis in developing testes of strain 129/Sv-ter mice." *Am J Pathol* 124(2): 263-80.

Runyan, C., K. Schaible, et al. (2006). "Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration." *Development* 133(24): 4861-9.

Salonen, J., A. Leminen, et al. (2008). "Tissue AP-2gamma and Oct-3/4, and serum CA 125 as diagnostic and prognostic markers of malignant ovarian germ cell tumors." *Tumour Biol* 29(1): 50-6.

Schneider, D. T., G. Calaminus, et al. (2004). "Epidemiologic analysis of 1,442 children and adolescents registered in the German germ cell tumor protocols." *Pediatr Blood Cancer* 42(2): 169-75.

Seki, Y., M. Yamaji, et al. (2007). "Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice." *Development* 134(14): 2627-38.

Sharpe, R. M. (2003). "The 'oestrogen hypothesis'- where do we stand now?" *Int J Androl* 26(1): 2-15.

Spiller, C., D. Wilhelm, et al. (2009). "Cell cycle analysis of fetal germ cells during sex differentiation in mice." *Biol Cell* 101(10): 587-98.

Stevens, L. C. (1964). "Experimental Production Of Testicular Teratomas In Mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 52: 654-61.

Stevens, L. C. (1967). "The biology of teratomas." *Adv Morphog* 6: 1-31.

Stevens, L. C. (1967). "Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice." *J Natl Cancer Inst* 38(4): 549-52.

Stevens, L. C. (1973). "A new inbred subline of mice (129-terSv) with a high incidence of spontaneous congenital testicular teratomas." *J Natl Cancer Inst* 50(1): 235-42.

Stevens, L. C. and K. P. Hummel (1957). "A description of spontaneous congenital testicular teratomas in strain 129 mice." *J Natl Cancer Inst* 18(5): 719-47.

Sundstrom, J., L. J. Pelliniemi, et al. (1999). "Characterization of the model for experimental testicular teratoma in 129/SvJ-mice." *Br J Cancer* 80(1-2): 149-60.

Theunissen, T. W., A. L. van Oosten, et al. (2011). "Nanog overcomes reprogramming barriers and induces pluripotency in minimal conditions." *Curr Biol* 21(1): 65-71.

Tokuzawa, Y., E. Kaiho, et al. (2003). "Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development." *Mol Cell Biol* 23(8): 2699-708.

Tummala, R., R. A. Romano, et al. (2003). "Molecular cloning and characterization of AP-2 epsilon, a fifth member of the AP-2 family." *Gene* 321: 93-102.

Ueno, H., B. B. Turnbull, et al. (2009). "Two-step oligoclonal development of male germ cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(1): 175-80.

Ulbright, T. M. (2005). "Germ cell tumors of the gonads: a selective review emphasizing problems in differential diagnosis, newly appreciated, and controversial issues." *Mod Pathol* 18 Suppl 2: S61-79.

van den Berg, D. L., W. Zhang, et al. (2008). "Estrogen-related receptor beta interacts with Oct4 to positively regulate Nanog gene expression." *Mol Cell Biol* 28(19): 5986-95.

Verona, R. I., J. L. Thorvaldsen, et al. (2008). "The transcriptional status but not the imprinting control region determines allele-specific histone modifications at the imprinted H19 locus." *Mol Cell Biol* 28(1): 71-82.

Walt, H., J. W. Oosterhuis, et al. (1993). "Experimental testicular germ cell tumorigenesis in mouse strains with and without spontaneous tumours differs from development of germ cell tumours of the adult human testis." *Int J Androl* 16(4): 267-71.

Wang, X., H. A. Pasolli, et al. (2008). "AP-2 factors act in concert with Notch to orchestrate terminal differentiation in skin epidermis." *J Cell Biol* 183(1): 37-48.

Wankhade, S., Y. Yu, et al. (2000). "Characterization of the activation domains of AP-2 family transcription factors." *J Biol Chem* 275(38): 29701-8.

Weber, S., D. Eckert, et al. (2010). "Critical function of AP-2 gamma/TCFAP2C in mouse embryonic germ cell maintenance." *Biol Reprod* 82(1): 214-23.

Werling, U. and H. Schorle (2002). "Conditional inactivation of transcription factor AP-2gamma by using the Cre/loxP recombination system." *Genesis* 32(2): 127-9.

Werling, U. and H. Schorle (2002). "Transcription factor gene AP-2 gamma essential for early murine development." *Mol Cell Biol* 22(9): 3149-56.

Western, P., J. Maldonado-Saldivia, et al. (2005). "Analysis of Esg1 expression in pluripotent cells and the germline reveals similarities with Oct4 and Sox2 and differences between human pluripotent cell lines." *Stem Cells* 23(10): 1436-42.

- Western, P. S., D. C. Miles, et al. (2008). "Dynamic regulation of mitotic arrest in fetal male germ cells." *Stem Cells* 26(2): 339-47.
- Williams, C. M., A. G. Scibetta, et al. (2009). "AP-2gamma promotes proliferation in breast tumour cells by direct repression of the CDKN1A gene." *Embo J* 28(22): 3591-601.
- Williams, T., A. Admon, et al. (1988). "Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements." *Genes Dev* 2(12A): 1557-69.
- Williams, T. and R. Tjian (1991). "Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2." *Genes Dev* 5(4): 670-82.
- Williams, T. and R. Tjian (1991). "Characterization of a dimerization motif in AP-2 and its function in heterologous DNA-binding proteins." *Science* 251(4997): 1067-71.
- Winger, Q., J. Huang, et al. (2006). "Analysis of transcription factor AP-2 expression and function during mouse preimplantation development." *Biol Reprod* 75(3): 324-33.
- Yamaji, M., Y. Seki, et al. (2008). "Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice." *Nat Genet* 40(8): 1016-22.
- Youngren, K. K., D. Coveney, et al. (2005). "The Ter mutation in the dead end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours." *Nature* 435(7040): 360-4.
- Zhang, X., J. Zhang, et al. (2008). "Esrrb activates Oct4 transcription and sustains self-renewal and pluripotency in embryonic stem cells." *J Biol Chem* 283(51): 35825-33.
- Zhao, F., M. Satoda, et al. (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): 40755-60.
- Zhao, Q., G. Rank, et al. (2009). "PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing." *Nat Struct Mol Biol* 16(3): 304-11.

7 Anhang

7.1 Regulierte Gene Microarray

genesymbol	Fold change(+/- vs wt)	refseq
Gpr137b-ps	1,9038568	NR_003568
Etohi1	1,845189	NM_001177399 NM_001177400
Chga	1,8181679	NM_007693
Chgb	1,7921127	NM_007694
Fkbp9	1,5984612	NM_012056
Txnip	1,5618995	NM_001009935 NM_023719
Dbh	1,5493186	NM_138942
Wnt7a	1,5275562	NM_009527
Lman1	1,4897939	NM_027400 NM_001172062
Ccl19 LOC100043921	1,4779133	NM_011888 XM_001481240 XM_001481237
Tnks2	1,4732026	NM_001163635
Agtr2	1,4320294	NM_007429
Dock4	1,424704	NM_172803
Esr1	1,4242601	NM_007956
Itga6	1,419541	NM_008397
Enpep	1,3962891	NM_007934
Sema5b	1,3767934	NM_013661
Pam	1,3753873	NM_013626
Sytl4	1,373737	NM_013757
Rnf213	1,3707232	
Usp51	1,3695724	NM_001137547
Mbnl3	1,3677279	NM_134163
Pglyrp1	1,3668915	NM_009402
Prss35	1,3659278	NM_178738
Kcnk9	1,3640093	NM_001033876
Slc1a5	1,3606361	NM_009201
Fat3	1,3585896	NM_001080814
Plcl1	1,3571339	NM_001114663
Matn2	1,3529828	NM_016762
Clu	1,3505065	NM_013492
Col14a1	1,3404659	NM_181277
Col6a3	1,3372067	
Sh2d4a	1,3368849	NM_028182
Myo9a	1,3280993	NM_173018
Trank1	1,3278474	NM_001164659
Tgm2	1,3240724	NM_009373
Ptpn4	1,3232504	NM_019933
Dcn	1,319043	NM_007833
Nfat5	1,3183129	NM_133957 NM_018823
Dennd4c	1,3157259	NM_001081014
Pygm	1,3138239	NM_011224
Timp3	1,311234	NM_011595
Zfp111	1,3102064	NM_019940
Srp54c Srp54b Srp54a	1,3101488	NM_001100110 NM_001100109 NM_011899
Fam181b Gm9934	1,3059558	NM_021427
Tbc1d4	1,3053716	NM_001081278
Cfh	1,3052262	NM_009888

Met	1,3010345	NM_008591
March3	-1,3040073	NM_177115
Fkbp6	-1,3043915	NM_033571
Hba-a1 Hba-a2	-1,309866	NM_008218 NM_001083955
Hba-a2 Hba-a1	-1,310913	NM_001083955 NM_008218
Pmf1	-1,3140264	NM_025928
Sox2	-1,3155416	NM_011443
Ptpn6	-1,3220427	NM_013545 NM_001077705
Pnpt1	-1,3234978	NM_027869
Ebf3	-1,3297963	NM_001113415 NM_001113414 NM_010096
Hemgn	-1,337574	NM_053149
Hapln1	-1,3385869	NM_013500
Hoxd11	-1,3443547	NM_008273
Gp9	-1,3482028	NM_018762
H2-T24	-1,3510754	NM_008207
Gjb3	-1,3645815	NM_008126 NM_001160012
Dppa4	-1,3720014	NM_001018002 NM_028610
Trap1a	-1,3811487	NM_011635
Acp5	-1,3821328	NM_001102404 NM_007388 NM_001102405
Zfp640	-1,3834373	
Ctla2a	-1,3840746	NM_007796 NM_001145799
Actc1	-1,390887	NM_009608
Tdrd12	-1,3977547	NM_028034
Crabp2	-1,4021012	NM_007759
Tcfap2c	-1,4125359	NM_009335 NM_001159696
Hoxc10	-1,4168879	NM_010462
Fancl	-1,4200065	NM_025923
Hoxa11	-1,4210995	NM_010450
Rhd	-1,4232289	NM_011270
Rpl39l	-1,4267818	NM_026594
Tdgf1	-1,4281471	NM_011562
Nanog	-1,4289896	NM_028016
Mageb16 Mageb16- ps1	-1,4344478	NM_028025 NM_001113734 NR_033647
Amt	-1,4414841	NM_001013814
Car2	-1,4479705	NM_009801
Tagln	-1,4492296	NM_011526
Tdh	-1,4505651	NM_021480
Utf1	-1,4647549	NM_009482
Gm1524	-1,4747031	
Etv2	-1,4766554	NM_007959
Fbxo15	-1,4941282	NM_015798
Myl7	-1,5289024	NM_022879
Pou5f1	-1,6116041	NM_013633
Asz1	-1,6118456	NM_023729
Lefty2	-1,7150738	NM_177099
Hist1h2ab	-1,716222	NM_175660
Rpl10l	-1,8324351	NM_001162933
Dppa5a	-2,0821822	NM_025274
Hbb-bh1	-2,146624	NM_008219
LOC280487	-2,4395635	